

ALÍRIO FELIPE ALVES NETTO

**POTENCIAL DO ALGODÃO TRANSGÊNICO *Bacillus thuringiensis* Vip3A
CONTRA *Spodoptera frugiperda* RESISTENTE A Bt Cry E *Helicoverpa armigera***

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

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira

Coorientadora: Flaviane de Oliveira Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A474p
2024

Alves Netto, Alirio Felipe, 1992-
Potencial do algodão transgênico *Bacillus thuringiensis*
Vip3A contra *Spodoptera frugiperda* resistente a Bt Cry e
Helicoverpa armigera / Alirio Felipe Alves Netto. – Viçosa,
MG, 2024.
1 tese eletrônica (55 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Entomologia, 2024.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.622>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Algodão - Doenças e pragas - Controle.
2. Lagarta-do-caruncho - Controle. 3. Plantas transgênicas -
Resistência a doenças e pragas. I. Pereira, Eliseu José Guedes,
1976-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.
III. Título.

CDD 22. ed. 633.5197

ALÍRIO FELIPE ALVES NETTO

**POTENCIAL DO ALGODÃO TRANSGÊNICO *Bacillus thuringiensis* Vip3A
CONTRA *Spodoptera frugiperda* RESISTENTE A Bt Cry E *Helicoverpa armigera***

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

APROVADA: 06 de setembro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **ALÍRIO FELIPE ALVES NETTO**
Data: 30/09/2024 14:28:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alírio Felipe Alves Netto
Autor

Documento assinado digitalmente
 **ELISEU JOSE GUEDES PEREIRA**
Data: 01/10/2024 11:28:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eliseu José Guedes Pereira
Orientador

Aos meus queridos pais e avós, cujos exemplos de honestidade, persistência e fé têm sido uma fonte constante de inspiração e força.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda sabedoria, por guiar meus passos e iluminar meu caminho ao longo deste doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Entomologia e ao Laboratório de Interação Inseto-Planta, pela minha formação.

Ao meu orientador, Eliseu José Guedes Pereira, por ser um exemplo de ser humano íntegro e profissional, pelos inúmeros ensinamentos, pela atenção e pela orientação.

À minha coorientadora, Flaviane de Oliveira Ribeiro, pelo seu apoio e orientação durante o doutorado.

Aos meus pais, Nivaldo Pereira da Cruz e Gilda Martins, cujo amor incondicional, apoio constante e sacrifícios incansáveis possibilitaram a realização deste doutorado.

Aos meus avós, Alírio Felipe Alves e Nersolina Martins Alves, cujas experiências e valores de vida me tornaram profundamente quem eu sou hoje.

À minha madrinha, Maria Lucília Alves, que, desde o meu nascimento, foi mais que uma madrinha, guiando-me com sua orientação compassiva.

À família Bouzada, por proporcionar momentos descontraídos e alegres, como verdadeiros amigos.

Aos colegas do Laboratório de Interação Inseto-Planta, pela amizade e colaboração durante estes quatro anos de convivência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Para aqueles que possuem a fé,
nenhuma explicação é necessária;
para aqueles sem fé, nenhuma
explicação é possível”.*

(Jean-Henri Fabre)

RESUMO

NETTO, Alírio Felipe Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2024. **Potencial do algodão transgênico *Bacillus thuringiensis* Vip3A contra *Spodoptera frugiperda* resistente a Bt Cry e *Helicoverpa armigera*.** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientadora: Flaviane de Oliveira Ribeiro.

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das principais culturas comerciais e sua alta produtividade é ameaçada por ataque de pragas como as lagartas *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Ataque dessas lagartas às estruturas reprodutivas do algodoeiro pode levar a perdas irreparáveis e o uso de cultivares com transgenia de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para produção de toxinas inseticidas como Cry e Vip pode ser útil contra as lagartas. Neste estudo se avaliou a eficácia potencial de diferentes cultivares de algodão Bt com toxinas Cry e Vip contra *H. armigera* e *S. frugiperda* em vários estágios larvais consumindo diversos órgãos/estruturas da planta em diferentes estágios fenológicos da cultura. Foram realizados bioensaios tempo-mortalidade com os insetos nos tecidos frescos dos órgãos/estruturas coletados das plantas cultivadas no campo. Os algodoeiros transgênicos Bt produzindo a toxina Vip3Aa (Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa, Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa, Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa) mataram as lagartas de *H. armigera* e *S. frugiperda* mais rápido que os algodoeiros com apenas toxinas Cry (Cry1Ac+Cry2Ab e Cry1Ab+Cry2Ae). As folhas dos algodoeiros Bt nos estágios fenológicos até 45 dias após a emergência mataram as lagartas mais rápido (2 dias) que folhas e outras estruturas reprodutivas. A susceptibilidade dos estágios larvais aos algodões Bt foi maior nas lagartas pequenas (L1, <0,5 cm) e decresceu nas médias (L3, 1,0–1,5 cm) e nas grandes (L5, >3,5 cm). A resistência a Bt da população de *S. frugiperda* não alterou significativamente o tempo letal mediano das lagartas L5, mas o fez variavelmente, em direção, amplitude ou ambos, nas lagartas dos estágios L1 e L3. Nas primeiras, o tempo letal foi alongado 15–43%, seja nos algodoeiros Cry ou nos Cry e Vip, sobretudo Cry1Ac + Cry1Fa + Vip3Aa. Nas lagartas L3, houve aumento de 12–22% no tempo letal nos algodoeiros Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab+Cry2Ae e Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa, e redução de 13–23% nos algodoeiros Bt Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa e Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa. Contudo, os tecidos de todos dos algodoeiros Bt testados causaram mortalidade acumulada em 7 dias de 100% das lagartas de *S. frugiperda*, independente da resistência delas a Bt Cry e do estágio

larval (L1, L3 ou L5) e se elas consumiram folha, botão floral, ou maçã das plantas de uma ampla gama de estágios fenológicos. Nessas condições, a mortalidade natural das lagartas foi <5%, mostrando que alta mortalidade seguramente se deve às toxinas Bt produzidas nos tecidos dos algodoeiros transgênicos. Para *H. armigera*, após 7 dias alimentando em folhas, botões florais, flores, ou maçãs do algodoeiros Bt, a mortalidade acumulada das lagartas foi alta, 80–100 %, com pequena variação em função dos tipos de transgenia Bt, estágios fenológicos e órgãos da planta. Esses resultados indicam que os algodoeiros com a transgenia Bt Cry ou com Cry e Vip possuem alta eficácia potencial contra *H. armigera* e *S. frugiperda* estejam as lagartas pequenas, médias ou grandes consumindo diferentes estruturas da planta de diversos estágios fenológicos de desenvolvimento da cultura.

Palavras-chave: Manejo de pragas; Lepidoptera; resistência; transgenia de plantas.

ABSTRACT

NETTO, Alírio Felipe Alves, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September de 2024. **Potential of Vip3A *Bacillus thuringiensis* transgenic cotton against Cry-Bt-resistant *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa armigera*.** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientadora: Flaviane de Oliveira Ribeiro.

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is one of the main commercial crops globally and its high productivity is threatened by pest insects such as the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* and fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Feeding of these caterpillars on the reproductive structures of cotton can lead to serious losses, and the use of transgenic cotton cultivars producing insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) such as Cry and Vip can be useful against the larvae. This study assessed the potential efficacy of different Bt cotton cultivars with Cry and Vip toxins against *S. frugiperda* and *H. armigera*. The influence of various larval stages and cotton plant organs/structures in different cotton growth stages were investigated. In time-mortality bioassays with plant tissues freshly collected from the field, Bt transgenic cotton plants producing the Vip3Aa toxin (Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa, Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa, Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa) killed cotton bollworm larvae faster than those with only Cry toxins (Cry1Ac + Cry2Ab and Cry1Ab + Cry2Ae). As for plant structures, the leaves of Bt cotton plants in the phenological stages up to 45 days after emergence killed the caterpillars faster (2 days) than leaves and other reproductive structures. Regarding the larval stages, susceptibility to Bt cotton was higher for small larvae (L1, <0.5 cm) and decreased in midsize larvae (L3, 1.0–1.5 cm) and large ones (L5, >3.5 cm). The Bt resistance of the *S. frugiperda* population did not significantly alter the median lethal time of the L5 larvae. Still, it did so variably, in direction, amplitude, or both, in the larvae of the L1 and L3 stages. In the former, the lethal time was lengthened by 15–43%, either in Cry cotton or in Cry and Vip, primarily Cry1Ac + Cry1Fa + Vip3Aa. In L3 bolls, there was a 12–22% increase in lethal time in Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab+Cry2Ae, and Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa cotton cultivars, and a 13–23% reduction in Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa and Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa Bt cotton cultivars. However, the tissues of all of the Bt cotton plants tested caused cumulative mortality in 7 days of 100% of the *S. frugiperda* caterpillars, regardless of their resistance to Bt Cry and the larval stage (L1, L3, or L5) and whether they consumed leaf, flower bud, or apple from plants of a wide range of phenological stages.

Under these conditions, the natural mortality of the caterpillars was <5%, showing that high mortality is surely due to the Bt toxins produced in the tissues of transgenic cotton plants. For *H. armigera*, after 7 days of feeding on leaves, flower buds, flowers, or apples of Bt cotton, the accumulated mortality of the caterpillars was high, 80–100 %, with little variation as a function of the types of Bt transgenics, phenological stages, and plant organs. These results indicate that cotton plants with Bt Cry transgenics or with Cry and Vip have high potential efficacy against *H. armigera* and *S. frugiperda* in small, medium, or large caterpillars consuming different plant structures from different phenological stages of crop development. For *H. armigera*, after 7 days of feeding on leaves, flower buds, flowers, or boll of Bt cotton, the accumulated mortality of the bollworms was high, 80–100 %, with little variation as a function of Bt transgenic types, phenological stages, and plant organs. These results indicate that cotton Bt cultivar producing Cry or Cry and Vip Bt toxins have high potential efficacy against *H. armigera* and *S. frugiperda* no matter whether small, medium, or large larvae consume different cotton plant structures from different cotton growth stages.

Keywords: Pest management; Lepidoptera; resistance; transgenic crops.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
SUMÁRIO	10
INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO 1.....	18
Potencial de controle de <i>Helicoverpa armigera</i> pelo algodão Bt.....	18
de terceira geração	18
1.1. INTRODUÇÃO	20
1. 2. MATERIAL E MÉTODOS	21
1.2.1. Origem e manutenção dos insetos	21
1.2.1. Cultivares de algodoeiro e cultivo das plantas.....	21
1.2.2. Bioensaios tempo-mortalidade.....	22
1.2.2.1. Estágio GS1:11.....	22
1.2.2.2. Estágio GS5:55.....	23
1.2.2.3. Estágio GS6:55.....	23
1.2.2.4. Estágio GS7:79.....	23
1.2.3. Análise dos dados.....	24
1.3. RESULTADOS	24
1.4. DISCUSSÃO	26
1.5. CONCLUSÕES	28
1. 6. REFERÊNCIAS	28
TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO 1	32
Tabela 1.1. Informações das composições de toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) presentes nas plantas de algodão utilizadas neste estudo.	32
Tabela 1.2. Informações sobre os estágios fenológicos do algodoeiro que foram utilizados na pesquisa.....	33
Tabela 1.3. Teste F dos efeitos dos fatores estágio larval de <i>Helicoverpa armigera</i> , transgenia de algodoeiro Bt, e fenologia/órgão da planta.	33
Figura 1.1. Porcentagem de mortalidade de <i>Helicoverpa armigera</i> de acordo com o estágio larval e a transgenia Bt do algodoeiro.	34
Figura 1.2. Porcentagem de mortalidade de <i>Helicoverpa armigera</i> de acordo com a transgenia Bt do algodoeiro e a fenologia e o órgão da planta.	35
Figura 1.3. Rapidez do efeito letal a <i>Helicoverpa armigera</i> em função da transgenia Bt, fenologia/órgão da planta e tamanho da lagarta.....	36

CAPÍTULO 2	37
Resistência a toxinas Bt Cry pode comprometer o potencial de controle de <i>Spodoptera frugiperda</i> por algodoeiros Bt?	37
Resumo	37
Abstract	39
2.1. INTRODUÇÃO	40
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.2.1. Origem e manutenção dos insetos	42
2.2.2. Cultivares de algodoeiro e seu cultivo	42
2.2.3. Delineamento experimental e bioensaios tempo-mortalidade	43
2.2.3. Análise dos dados	44
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.4. CONCLUSÕES	48
2.5. REFERÊNCIAS	48
TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO 2	50
Tabela 2.1. Teste <i>F</i> dos efeitos dos fatores população e estágio larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> , transgenia de algodoeiro Bt e fenologia/órgão da planta.	50
Figura 2.1. Tempo letal de <i>Spodoptera frugiperda</i> afetado pelo estágio larval e resistência das lagartas a <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) e a transgenia Bt do algodoeiro.	51
Figura 2.2. Tempo letal de <i>Spodoptera frugiperda</i> afetado pela interação da resistência das lagartas a <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) com a transgenia Bt do algodoeiro e a fenologia e o órgão da planta.	52
Figura 2.3. Mortalidade acumulada de <i>Spodoptera frugiperda</i> de acordo com a resistência das lagartas a <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) e com a transgenia Bt do algodoeiro e a fenologia e o órgão da planta.	53
CONCLUSÕES GERAIS	54

INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Malvales contém a família Malvaceae, consistindo em vários gêneros, incluindo o gênero (*Gossypium* spp.). Este gênero inclui mais de 45 espécies diploides ($2n = 26$) e pelo menos cinco alotetraploides ($2n = 4x = 52$). A hibridização entre diploides do genoma A (algodão do Velho Mundo) e do genoma D (algodão do Novo Mundo), resultou na espécie (*Gossypium hirsutum* L.) (designação do genoma AD), que é considerado um alopoliploide derivado da hibridização e duplicação do genoma completo (WGD), em torno de 1 a 2 milhões de anos atrás. O algodoeiro (*G. hirsutum* L.), teve sua domesticação possivelmente na península de Yucatán do Norte (Ning et al., 2024).

Mais de 100 países do mundo cultivam o algodoeiro em regiões tropicais e subtropicais (Alam et al., 2024). Os principais países produtores de algodão são, China 24%, Índia 23%, Brasil 13%, Estados Unidos 11%, Paquistão 6%. No Brasil, na safra 2023/24 foram cultivados 1,7 milhões de hectares. A produção total alcançou 3,2 milhões de toneladas, os principais estados produtores são, Mato Grosso 71%, Bahia 20%, Goiás 2%, Minas Gerais 1%, São Paulo 0.1% (USDA, 2023; IBGE, 2024).

O algodoeiro é uma cultura de importância global, tendo como principal finalidade a produção de fibras para a indústria têxtil (He et al., 2023). Além disso, subprodutos do algodão, como o óleo de semente e farelo, têm valor significativo em outras indústrias, por ser fonte da nutrição animal (Nam et al., 2023). Mais de 35,6 milhões de hectares são utilizado para a produção de algodão no mundo, possibilitando renda para mais de 32 milhões de produtores e beneficiando mais de 100 milhões de famílias em 100 países em 5 continentes (FAO, 2023).

O custo de produção do algodão é significativamente maior em comparação com o milho e a soja. Esse valor elevado se deve principalmente ao uso intensivo de fertilizantes e agrotóxicos, que somam 3.583,65 e 4.273,63, respectivamente, superando consideravelmente os custos desses insumos nos outros cultivos. Essa diferença evidencia o alto investimento necessário para a produção de algodão (IMEA, 2024).

Um dos principais desafios para se obter alta produtividade de fibras no cultivo de algodão é a proteção das plantas contra os danos causados por uma ampla variedade de pragas. O espectro de pragas que afetam as diferentes estruturas reprodutivas do algodoeiro é extenso, abrangendo mais de 200 espécies de insetos e

ácaros. Dentre as lagartas que causam prejuízos significativos, o complexo de lagartas das maçãs, especialmente *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), é o mais importante pela sua resistência a inseticidas sintéticos e tolerância relativa a muitas toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Em seguida, destaca-se o complexo de *Spodoptera* spp., com *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) sendo a principal espécie. Embora *S. frugiperda* seja amplamente conhecida como praga-chave do milho, ela também é frequentemente uma praga significativa para o algodoeiro, principalmente em sistemas intensivos de cultivo como praticado em muitas regiões do Brasil. Apesar de sua preferência por plantas da família Poaceae, como o milho, a *S. frugiperda* está cada vez mais impactando outras culturas importantes, como algodão e soja (Wang et al., 2023).

A *Helicoverpa armigera* é considerada uma das espécies de lagartas mais destrutivas do mundo. Ela possui ampla gama de hospedeiros e alta capacidade de adaptação a métodos de controle, como inseticidas sintéticos. Isso ressalta a necessidade de estratégias de manejo eficazes para controlar essas pragas no cultivo do algodão. A *Helicoverpa armigera* está amplamente presente na Ásia, Oceania, África e Europa (Stavarakaki et al., 2024). A presença do inseto no Brasil foi registrada pela primeira vez em 2013 no estado de Goiás, e como o passar dos anos a lagarta avançou para diversas partes do Brasil e da América (Czepak et al., 2013; Marques et al., 2023), inclusive em Porto Rico (Kriticos et al., 2015).

Devido à capacidade de ampla movimentação no ambiente através de voo de longa distância pelos adultos e dispersão em curta distância pelas lagartas nas plantas, ataques de *H. armigera* e *S. frugiperda* são uma ameaça para a produção de algodão. Os danos causados podem ser irreparáveis em certos estágios fenológicos, principalmente se um intenso ataque ocorrer próximo à colheita. Nos primeiros instares, as lagartas se alimentam das folhas e nos últimos instares as lagartas atacam as partes reprodutivas das plantas. As lagartas se movem bastante entre as plantas, um comportamento que tende a levar à queda prematura de muitos desses órgãos, causando perdas diretas no produto final. Quando o ataque ocorre nas flores, pode resultar em má formação e menor desenvolvimento das maçãs, nessas, as lagartas consomem as sementes e fibras em desenvolvimento, reduzindo a sua qualidade e a quantidade. As perdas causadas por essas lagartas alcançam estimativas de 2 bilhões de dólares em diferentes culturas em diversas regiões do mundo (Nagachandrabose, 2022).

Utilizar medidas de controle efetivas contra *H. armigera* e *S. frugiperda* é importante para atingir altas produtividades e acalmar a ansiedade associada à aversão ao risco por parte dos cotonicultores. Uma adequada prática é uso de um método de controle planejado pela utilização do algodão transgênico Bt. Essa transgenia foi obtida através de técnicas de engenharia genética, inserindo no genoma da planta gene(s) da bactéria *Bacillus thuringiensis*, daí Bt. Esse(s) gene(s) codifica(m) para a produção de proteína(s) inseticida(s) que torna a cultura resistente a certas pragas. Naturalmente, na bactéria, diversas proteínas inseticidas (toxinas) são acumuladas em cristais paraesporais (δ -endotoxinas) na fase reprodutiva, daí a denominação Cry, enquanto outro tipo de proteína é secretado na fase vegetativa (exotoxina) e é denominado Vip (*vegetative insecticidal protein*). O mecanismo da ação tóxica de Bt se dá quando esporos, cristais, ou células bacterianas são ingeridos por um inseto suscetível na superfície da planta em que foi aplicado o bioinseticida Bt ou a toxina (proteína) produzida no tecido da planta transgênica Bt. Por ser alcalino o intestino médio das lagartas, o pH promove a solubilização dos cristais e a liberação da proteína inseticida. Ao ser ativada (clivada) por proteases da lagarta, a toxina se liga a receptores proteicos específicos na membrana das células do epitélio intestinal. Acredita-se que unidades da toxina se juntem para formar um oligômero com estrutura de poro capaz de se inserir na membrana celular. Esses poros permitem que íons e água passem livremente para dentro das células, resultando em lise celular. Com isso, a parede intestinal se torna disfuncional e pode ocorrer invasão por microrganismos com infecção generalizada, culminando na morte da lagarta (Bravo et al., 2007; Jehangir & Ali, 2023).

Para proteger as estruturas reprodutivas da planta de algodão contra *H. armigera* e *S. frugiperda*, as plantas de algodão Bt devem expressar uma quantidade letal de toxina Bt. Ou melhor, as partes da planta onde a lagarta se alimenta devem ser letais a ela principalmente durante a frutificação, quando o dano das lagartas é crítico. Vários fatores como o local de inserção do gene no cromossomo, o tipo de promotor, grau de metilação da sequência nucleotídica do gene, estágio de desenvolvimento da planta, o ambiente celular interno e o ambiente externo podem contribuir para expressão variável das toxinas Bt nos tecidos das plantas de algodão (Cheema et al., 2016); Ahmad et al., 2019).

A redução na letalidade dos tecidos dos algodoeiros Bt em estágios fenológicos avançados da planta e seus órgãos pode resultar em falha de controle de

H. armigera e *S. frugiperda*. Se as toxinas Bt não forem suficientemente potentes ou forem produzidas em quantidades subletais nas estruturas reprodutivas do algodoeiro consumidas pelas lagartas, elas podem causar injúrias nas plantas e prejuízos ao cotonicultor, com consequências para a sustentabilidade da tecnologia Bt (Jamil et al., 2021; Noor et al., 2022) e da cotonicultura em geral e com *spinoff* de consequências indesejáveis na cadeia fornecedora de produtos de algodão.

Portanto, essa pesquisa visa determinar o potencial de controle das lagartas em algodoeiro ou o risco da sua falha pelos cultivares disponíveis no mercado. A tese está estruturada em dois capítulos principais. No Capítulo 1, estudou-se o potencial de controle de *H. armigera* pelo algodão Bt de terceira geração, explorando as capacidades e limitações do algodão Bt de terceira geração no manejo dessa praga específica. Já no Capítulo 2, foi investigado se a resistência a toxinas Bt Cry pode comprometer o potencial de controle de *S. frugiperda* por algodoeiros Bt. O intuito desse foi avaliar os possíveis impactos da resistência das lagartas a toxinas Bt no potencial dos algodoeiros Bt comercializados para controle das lagartas nos cultivos. Esses capítulos oferecem uma visão abrangente sobre a eficácia e os desafios do uso de algodões Bt no controle das principais lagartas na cultura do algodoeiro.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, S., Cheema, H. M. N., Khan, A. A., Khan, R. S. A., & Ahmad, J. N. (2019). Resistance status of *Helicoverpa armigera* against Bt cotton in Pakistan. *Transgenic Research*, 28(2), 199–212. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00114-9>
- Alam, J., Salim, M., Islam, N., Hasan, A. K., & Kader, M. A. (2024). Detopping reduces field duration of cotton while increases the yield and quality of cotton fiber. *Journal of Agriculture and Food Research*, 16, 101135. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101135>
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- CHEEMA, H. M. N., KHAN, A. A., KHAN, M. I., ASLAM, U., RANA, I. A., & KHAN, I. A. (2016). Assessment of Bt cotton genotypes for the Cry1Ac transgene and its expression. *The Journal of Agricultural Science*, 154(1), 109–117. <https://doi.org/10.1017/S0021859615000325>
- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivan, L. M., Guimarães, H. O., & Carvalhais, T. (2013). Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:

- Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(1), 110–113.
<https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000100015>
- FAO. (2023, March). Making cotton sustainable requires science, investment and governance.
- He, Z., Nam, S., Liu, S., & Zhao, Q. (2023). Characterization of the Nonpolar and Polar Extractable Components of Glanded Cottonseed for Its Valorization. *Molecules*, 28(10), 4181. <https://doi.org/10.3390/molecules28104181>
- IBGE. (2024, August). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. <https://Sidra.Ibge.Gov.Br/Tabela/1618>.
- IMEA. (2024). Custo de Produção Algodão. <https://www.imea.com.br/imea-site/relatorios-mercado-detalle?c=1&s=696277432068079616>
- Jamil, S., Shahzad, R., Rahman, S. U., Iqbal, M. Z., Yaseen, M., Ahmad, S., & Fatima, R. (2021). The level of Cry1Ac endotoxin and its efficacy against *H. armigera* in Bt cotton at large scale in Pakistan. *GM Crops & Food*, 12(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1799644>
- Jehangir, N., & Ali, S. (2023). The insecticidal efficacy and performance of Bt Cotton under variable abiotic stresses – A review on recent findings. *Plant Stress*, 8, 100151. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100151>
- Kriticos, D. J., Ota, N., Hutchison, W. D., Beddow, J., Walsh, T., Tay, W. T., Borchert, D. M., Paula-Moreas, S. V., Czepak, C., & Zalucki, M. P. (2015). The Potential Distribution of Invading *Helicoverpa armigera* in North America: Is It Just a Matter of Time? *PLOS ONE*, 10(3), e0119618.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119618>
- Marques, L. H., Ishizuka, T. K., Pereira, R. R., Istchuk, A. N., Rossetto, J., Moscardini, V. F., e Silva, O. A. N. B., Santos, A. C., Nowatzki, T., Dahmer, M. L., Sethi, A., Storer, N. P., Gontijo, P. C., Netto, J. C., Weschenfelder, M. A. G., de Almeida, P. G., & Bernardi, O. (2023). Performance of cotton expressing Cry1Ac, Cry1F and Vip3Aa19 insecticidal proteins against *Helicoverpa armigera*, *H. zea* and their hybrid progeny, and evidence of reduced susceptibility of a field population of *H. zea* to Cry1 and Vip3Aa in Brazil. *PLOS ONE*, 18(7), e0289003.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289003>
- Nagachandrabose, S. (2022). Management of cotton bollworms *Helicoverpa armigera* and *Earias vittella* by entomopathogenic nematodes. *Journal of Cotton Research*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s42397-022-00119-6>
- Nam, S., Easson, M., Jordan, J. H., He, Z., Zhang, H., Santiago Cintrón, M., & Chang, S. (2023). Unveiling the Hidden Value of Cotton Gin Waste: Natural Synthesis and Hosting of Silver Nanoparticles. *ACS Omega*, 8(34), 31281–31292.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03653>

- Ning, W., Rogers, K. M., Hsu, C.-Y., Magbanua, Z. V., Pechanova, O., Arick, M. A., Kayal, E., Hu, G., Peterson, D. G., Udall, J. A., Grover, C. E., & Wendel, J. F. (2024). Origin and diversity of the wild cottons (*Gossypium hirsutum*) of Mound Key, Florida. *Scientific Reports*, 14(1), 14046. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64887-8>
- Noor, K., CHEEMA, H. M. N., KHAN, A. A., & KHAN, R. S. A. (2022). Expression profiling of transgenes (Cry1Ac and Cry2A) in cotton genotypes under different genetic backgrounds. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(10), 2818–2832. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.07.033>
- Stavarakaki, M., Ilias, A., Simoglou, K. B., Mironidis, G. K., Zimmer, C. T., Souza, D., & Roditakis, E. (2024). Revision of *Helicoverpa armigera* insecticide resistance status in Greece. *Crop Protection*, 175, 106446. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106446>
- USDA. (2023). Cotton and Products Update. United States Department of Agriculture. https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Cotton%20and%20Products%20Update_Brasilia_Brazil_BR2023-0032
- Wang, W.-W., He, P.-Y., Liu, T.-X., Jing, X.-F., & Zhang, S.-Z. (2023). Comparative studies of ovipositional preference, larval feeding selectivity, and nutritional indices of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on 6 crops. *Journal of Economic Entomology*, 116(3), 790–797. <https://doi.org/10.1093/jee/toad065>

CAPÍTULO 1

Potencial de controle de *Helicoverpa armigera* pelo algodão Bt de terceira geração

Resumo

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das principais culturas comerciais e sua alta produtividade é ameaçada por ataque de pragas como a lagarta *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Ataque dessas lagartas às estruturas reprodutivas do algodoeiro pode levar a perdas irreparáveis e o uso de cultivares com transgenia de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para produção de toxinas inseticidas como Cry e Vip pode útil contra as lagartas. Neste estudo avaliou a eficácia potencial de diferentes cultivares de algodão Bt com toxinas Cry e Vip contra *H. armigera* em vários estágios larvais e órgãos/estruturas da planta em diferentes estágios fenológicos da cultura. Em bioensaios tempo-mortalidade com tecidos das plantas colhidos dos campo, os algodoeiros transgênicos Bt produzindo a toxina Vip3Aa (Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa, Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa, Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa) mataram as lagartas de *H. armigera* mais rápido que os com apenas toxinas Cry (Cry1Ac+Cry2Ab e Cry1Ab+Cry2Ae). Quanto às estruturas das plantas, as folhas dos algodoeiros Bt, nos estágios fenológicos até 45 dias após a emergência, mataram as lagartas mais rapidamente (2 dias) do que as folhas e outras estruturas reprodutivas. Relativo aos estágios larvais, a susceptibilidade aos algodões Bt foi maior nas lagartas pequenas (L1, <0,5 cm) e decresceu nas médias (L3, 1,0–1,5 cm) e nas grandes (L5, >3,5 cm). Contudo, após 7 dias alimentando em folhas, botões florais, flores, ou maçãs do algodoeiros Bt, a mortalidade acumulada das lagartas foi alta, 80–100 %, com pequena variação em função dos tipos de transgenia Bt, estágios fenológicos e órgãos da planta. Esses resultados indicam que os algodoeiros com a transgenia Bt Cry, ou com Cry e Vip, possuem alta eficácia potencial contra *H. armigera*, estejam as lagartas pequenas, médias ou grandes consumindo diferentes estruturas da planta em diversos estágios fenológicos de desenvolvimento da cultura.

Palavras-chave: Biotecnologia, Manejo de pragas, Resistência, Lepidoptera

Abstract

Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is one of the main commercial crops globally and its high productivity is threatened by pest insects such as the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Bollworm attacks on the reproductive structures of cotton can lead to serious losses, and the use of transgenic cultivars producing insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) such as Cry and Vip can be useful against the bollworms. This study assessed the potential efficacy of different Bt cotton cultivars with Cry and Vip toxins against *H. armigera*. Various larval stages and cotton plant organs/structures in different cotton growth stages were provided to the insects. In time-mortality bioassays with plant tissues freshly collected from the field, Bt transgenic cotton plants producing the Vip3Aa toxin (Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa, Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa, Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa) killed cotton bollworm larvae faster than those with only Cry toxins (Cry1Ac + Cry2Ab2 and Cry1Ab + Cry2Ae). As for plant structures, the leaves of Bt cotton plants in the phenological stages up to 45 days after emergence killed the caterpillars faster (2 days) than leaves and other reproductive structures. Regarding the larval stages, susceptibility to Bt cotton was higher for small larvae (L1, <0.5 cm) and decreased in midsize larvae (L3, 1.0–1.5 cm) and large ones (L5, >3.5 cm). However, after 7 days of feeding on leaves, flower buds, flowers, or boll of Bt cotton, the accumulated mortality of the bollworm was high, 80–100 %, with little variation as a function of Bt transgenic types, phenological stages, and plant organs. These results indicate that cotton Bt cultivar producing Cry or Cry and Vip Bt toxins have high potential efficacy against *H. armigera*, no matter whether small, medium, or large larvae consume different cotton plant structures from different phenological stages of crop development.

Keywords: Biotechnology, Pest management, Resistance, Lepidoptera.

1.1. INTRODUÇÃO

O algodão, (*Gossypium hirsutum* L.) (Malvaceae), continua sendo uma das cultura comercial mais importante do mundo. Os principais países produtores são, Brasil, EUA, China, Índia e Paquistão (Malinga & Laing, 2022; Mahmood et al., 2024). Na safra 2023/24, foram cultivados 1.944,5 mil hectares de algodão no Brasil, resultando em 3,66 milhões de toneladas de pluma (CONAB, 2024).

O ataque de pragas é considerado fator importante para a redução da produtividade do algodão e a lagarta *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada praga em mais de 200 culturas, sendo destaque na cultura do algodão. A *H. armigera* está presente no campo desde a emergência até a colheita, causando perdas principalmente de estruturas reprodutivas do algodoeiro como botões florais, flor e maçã (Anuradha et al., 2023; Páez Jerez et al., 2023).

Cultivares comerciais de algodoeiro transgênico *Bacillus thuriangiensis* (Bt) é uma das ferramentas disponíveis no mercado para o controle de *H. armigera*. De acordo com o tipo número de toxinas Bt expressas na planta, os algodoeiros podem ser categorizados como sendo de segunda ou terceira geração. Os primeiros expressam duas toxinas, uma Cry1 e outra Cry2 (Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F, Cry2Ab, Cry2Ae). Já algodão Bt de terceira geração expressa três toxinas incluindo duas das toxinas anteriores e Vip3Aa (Elkins et al., 2024).

O sucesso no controle das lagartas utilizando plantas de algodoeiro Bt depende diretamente da capacidade das plantas em expressar quantidades letais de toxinas Bt de forma contínua e eficaz. A expressão das toxinas Bt durante o cultivo das plantas pode variar tanto espacial quanto temporalmente na planta e interessa a letalidade nas diversas estruturas reprodutivas. Fatores ambientais, genéticos ou fisiológicos podem levar à variação na expressão das toxinas Bt nos tecidos do algodoeiro, o que pode interferir no controle da praga. Baixa letalidade das toxinas Bt pode possibilitar a sobrevivência dos insetos, o que é mais preocupante quando esses se alimentam das estruturas reprodutivas como botão floral, flor e maçã, podendo levar a perdas diretas na produção (Adamczyk & Sumerford, 2001; Dong & Li, 2007; Likhitha et al., 2023).

Neste trabalho, avaliamos a sobrevivência de *H. armigera* nas diferentes estruturas, folha, botão floral, flor e maçã em variedades de algodoeiro Bt que expressam toxinas Cry e Vip.

1. 2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Origem e manutenção dos insetos

Em março de 2023, aproximadamente 2000 lagartas de *H. armigera* oriundas de campos de algodão foram fornecidas pela Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso (Fundação MT), localizada no município de Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil. Os insetos foram enviados ao Laboratório de Interação Inseto-Planta da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram mantidos até o uso nos ensaios.

Os insetos foram mantidos usando métodos padrões adaptados de Greene et al., (1976). As mariposas foram colocadas em gaiolas de PVC de 40 cm de altura x 30 cm de diâmetro, com papel sulfite nas paredes internas e tampadas com tecido de tule. Para alimentação dos adultos, foi fornecida em algodão embebido em uma placa de Petri uma solução aquosa contendo 10% de mel. As folhas de papel e o tecido de tule contendo as posturas das mariposas foram coletadas durante quatro vezes por uma semana. As posturas das mariposas foram armazenadas em pacotes plásticos até a eclosão. As larvas neonatas foram transferidas em grupos para dieta artificial (Greene et al., 1976) em copos plásticos de 500 ml até o 3º instar (L3) e depois individualizados (1 lagarta/recipientes) em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP) até empuparem. As pupas foram separadas por sexo para informar a proporção de fêmeas e machos e foram transferidas para as gaiolas de reprodução para emergência dos adultos e acasalamento. A criação foi mantida em ambiente controlado com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12L:12E. Havia três grupos de insetos criados escalonadamente para se obter, em uma mesma data, lagartas nos estágios L1, L3 e L5 para utilização nos ensaios.

1.2.1. Cultivares de algodoeiro e cultivo das plantas

Plantas de diversos cultivares de algodoeiro Bt e Não-Bt (CTNBIO, 2024; ISAAA, 2024), representativos dos principais utilizados no Brasil, foram cultivadas em campo na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão Diogo Alves de Melo do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

(20°48'45"S, 42°56'15"W, altitude 600 m), no período de 11/11/2023 a 30/04/2024. As informações dos cultivares se encontram na (Tabela 1.1).

O espaçamento entre linhas usado foi de 0,90 m com 8 plantas por metro, com área total para cada cultivar de 100 m². Durante a instalação e manutenção do cultivo foram empregadas práticas culturais segundo Borém & Freire (2014), porém sem aplicação de inseticidas.

1.2.2. Bioensaios tempo-mortalidade

Os ensaios foram realizados de novembro de 2023 a maio de 2024 no laboratório de Interação Inseto-Planta (LABIIP) na UFV, Viçosa, Minas Gerais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de 3 estágios larvais das lagartas e 6 cultivares de algodoeiro em 4 estágios fenológicos e 4 órgãos ou estruturas da planta. A unidade experimental constitui-se de um recipiente plástico de 2 x 3 cm² agrupados em bandejas plásticas que continham 16 unidades desses recipientes para facilitar o manuseio. Os 4 diferentes estágios fenológicos do algodoeiro foram utilizados de acordo com a escala BBCH (Munger et al., 1998) (Tabela 1.2). As lagartas foram de 1º, 3º e 5º instar de *H. armigera* e as estruturas do algodão foram folha, botão floral, flor e maçã. Essas foram oferecidas às lagartas e substituídas por outras frescas colhidas das plantas quando necessário em um período de 7 dias. As bandejas com as unidades experimentais foram mantidas nas condições ambientais utilizadas para a criação dos insetos (25 ± 1°C, umidade relativa do ar de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12L:12E). As avaliações de mortalidade foram realizadas a cada 24 h, por um período de até 7 dias, caso não ocorresse mortalidade completa antes desse prazo.

1.2.2.1. Estágio GS1:11

Quando as plantas de algodão estavam com a primeira folha desdobrada (7-10 dias após a emergência), foram colhidas 48 folhas de cada cultivar. As folhas colhidas foram imediatamente acondicionadas em caixas de isopor e levadas ao laboratório. Para cada uma das unidades experimentais, Foi colocada 1 folha com 3 lagartas de 1º instar (L1) ou, no caso de lagartas de 3º instar (L3), 1 folha com 2

lagartas e, para o 5º instar (L5), 1 folha com 1 lagarta. Ao todo, para cada cultivar, foram testadas 48, 32 ou 16 lagartas nos estágios L1, L2 ou L3, respectivamente.

1.2.2.2. Estágio GS5:55

No início da fase reprodutiva, GS5:55 (1º botão floral), (35-45 dias após a emergência), folhas e botões florais foram retirados do terço inferior das plantas, localizado no 1º ramo simpodial, na primeira posição. Para cada cultivar foram colhidas 48 folhas e 48 botões florais, os quais foram imediatamente acondicionados em caixa de isopor, levados ao laboratório e colocados em cada uma das unidades experimentais. Os procedimentos foram semelhantes ao descrito anteriormente, sendo testadas 48, 32 ou 16 lagartas nos estágios L1, L3 ou L5, respectivamente, por estrutura por cultivar.

1.2.2.3. Estágio GS6:55

Na fase reprodutiva, quando surgiu a flor, que acontece cerca 60–75 dias após a emergência, em cada cultivar coletou-se 48 folhas, 48 botões florais e 48 flores do terço médio das plantas, no 5º ramo simpodial, na primeira posição. As estruturas foram acondicionadas como descrito anteriormente, usando-se 48, 32 ou 16 lagartas nos estágios L1, L3 ou L5, respectivamente, por estrutura por cultivar.

1.2.2.4. Estágio GS7:79

Ao surgir nos algodoeiros maçãs, 90–110 dias após a emergência, coletou-se novamente de cada cultivar 48 folhas, 48 botões florais, 48 flores e 48 maçãs. Essas estruturas foram obtidas do terço superior das plantas, localizado no 9º ramo simpodial, na primeira posição. De forma semelhante realizaram-se os procedimentos de coleta, transporte para o laboratório e acondicionamento nas unidades experimentais. O número de insetos testados nos ensaios também foi o mesmo dos ensaios anteriores.

1.2.3. Análise dos dados

Usando o procedimento não-paramétrico de Kaplan e Meier (1958), foram obtidas curvas de sobrevivência dos insetos para cada uma das estruturas vegetais em cada um dos estágios fenológicos (4) de cada um dos cultivares (6) e para cada um dos estágios larvais (3) que foram estudados. Ao todo obteve-se 180 curvas de sobrevivência e tomou-se dados de mortalidade dos insetos após 7 dias nos tecidos vegetais e do tempo necessário para ocorrer a morte (letalidade) de 50% das lagartas (TL_{50}). A primeira variável mede a eficácia do tecido vegetal do algodoeiro Bt para causar o efeito desejado em 7 dias. A segunda variável mede a eficiência (potência ou capacidade) do algodoeiro Bt para causar a morte, sendo mais eficiente aquele que causar o efeito em menos tempo (Hall & Wellner, 1980; Kaplan & Meier, 1958).

Essas variáveis foram analisadas usando modelos lineares generalizados. Usou-se a distribuição Binomial com a função de ligação log para a proporção de mortalidade e a distribuição Gama com a função de ligação log para o tempo até ocorrer 50% de mortalidade do grupo nos tecidos das plantas (Gbur et al., 2012). O modelo linear foi composto pelos fatores anteriormente descritos, incluindo o estágio larval do inseto (3), o cultivar da planta (6) e seus estágios fenológicos e órgãos ou estruturas (10). O modelo completo incluiu todos os efeitos principais dos fatores e das interações, reduzindo-o a componentes (efeitos dos fatores e de interação) que possuem significância ($P < 0,05$) e contribuição substancial para descrever os dados com mínima deviança residual (Gbur et al. 2012). O modelo mínimo adequado (parcimonioso) foi geralmente aquele cujo valor do Qui-Quadrado da falta de ajuste aproxima do número de graus de liberdade residual ou que tem o mínimo valor do critério de informação de (Akaike, 1974) corrigido para o tamanho da amostra (Hurvich & Tsai, 1989). Quando foi significativo o efeito das interações, ele foi desdobrado separando-se as médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

1.3. RESULTADOS

Ao se alimentarem por 5-7 dias nos tecidos dos algodoeiros Bt e Não-Bt, as lagartas de *H. armigera* apresentaram resposta que variou com os fatores em estudo (Tabela 1.3). A resposta dos insetos, medida em termos de mortalidade e tempo letal mediano, variou significativamente em função dos fatores estágio larval do inseto (L),

transgenia do algodoeiro (A), e fenologia/órgão da planta (FO), com significativas interações duplas e triplas entre alguns desses fatores (Tabela 1.3).

A interação entre estágio larval e transgenia Bt do algodoeiro ($L \times A$) foi significativa para a mortalidade (Tabela 1.3). Isso indica que o efeito da transgenia Bt nessa variável depende do estágio larval do inseto-alvo. A mortalidade das lagartas também dependeu da interação da transgenia do algodoeiro com a fenologia e órgão da planta ($A \times F \times O$) (Tabela 1.3). Essas interações eram esperadas devido às complexas relações do inseto com a planta de algodoeiro, que dependem do estágio de desenvolvimento do inseto e das características da fenologia e arquitetura da planta. O desdobramento dessas interações mostrou que, em variedades Não-Bt, a mortalidade natural das lagartas foi cerca de 6% e 1% em L1 e L3 e L5, respectivamente (Figura 1.1). Esses valores, apesar de estatisticamente diferentes entre si, são inferiores ao limite máximo de 20% de mortalidade, convencionalmente aceitos para a validade de bioensaios em laboratório. Para os algodoeiros Bt, ao contrário, não houve diferença significativa na mortalidade dos estágios larvais (Figura 1.1). Essa semelhança na mortalidade das lagartas de *H. armigera* de tamanhos pequeno, médio e grande evidencia que o tamanho da lagarta não afetou na eficácia dos algodoeiros Bt.

No desdobramento da interação entre fenologia do algodoeiro, órgão da planta e transgenia Bt, destaca-se a baixa mortalidade natural das lagartas nos algodoeiros Não-Bt independentemente do estágio fenológico ou órgão da planta (Figura 1.2). Para as variedades de algodoeiros Bt, a mortalidade das lagartas foi consistentemente acima de 70%, alcançando 100% na maioria combinações de transgenia Bt, estágios fenológicos e órgãos da planta. A partir do primeiro botão floral, 35–45 dias após a emergência, no estágio fenológico GS5, as lagartas na variedade de algodoeiro Bt Cry1Ab+Cry2Ae apresentaram mortalidade entre 70% e 89% (Figura 1.2). Esses valores foram inferiores aos das demais variedades e ocorreram nos estágios GS6, 60–75 dias, nos órgãos botão floral e flor, e consistentemente em GS7, 90–110 dias após a emergência, em folha, botão floral, flor e maçã (Figura 1.2). Contudo, mesmo inferiores estatisticamente, esses valores foram próximos de 80% no estágio GS7, eficácia considerada aceitável. Esses resultados indicam que a atual transgenia Bt do algodoeiro é eficaz contra *H. armigera* na maioria das situações e que a eficácia somente diminuiu para 80% nos órgãos da planta em estágios a partir da fase reprodutiva de algodoeiros com a transgenia Bt Cry1Ab+Cry2Ae (Figura 1.2).

O tempo letal mediano (TL_{50}) é outra variável-resposta que informa sobre a eficiência (rapidez) da variedade de algodoeiro Bt para causar o efeito de mortalidade nas lagartas. Contudo, esses fatores causaram efeitos principais independentemente, como indicaram os resultados do teste F (Tabela 1.3). Para causar a morte da metade das lagartas, os algodoeiros Bt Cry1Ac+Cry2Ab e Cry1Ab+CryAe, da 2ª geração, levaram cerca de 1 dia a mais em relação aos da 3ª geração, que produzem a toxina Bt Vip3Aa (Figura 1.3A). Quanto à fenologia e órgãos da planta, as folhas nos estágios iniciais até 45 dias mataram as lagartas cerca de 2 dias mais rápido que os demais órgãos nos demais estágios fenológicos testados (Figura 1.3B). Os valores de tempo letal mediano foram de 5, 6 e 7 dias para lagartas nos estágios de desenvolvimento larval L1, L3 e L5, respectivamente (Figura 1.3), e a ordem decrescente de susceptibilidade foi lagarta pequena (0,5 cm), seguida da média (1,0 cm) e depois grande (3,5 cm). Portanto, os algodões Bt foram eficazes contra as lagartas independente do estágio ou tamanho larval apesar de elas diferirem em suscetibilidade a Bt.

1.4. DISCUSSÃO

A mortalidade natural das lagartas nos tecidos de variedades de algodoeiros não-Bt foi baixa (<6%), o que se deve à ausência de toxinas Bt nesses tecidos. Esse resultado é de fundamental importância para as conclusões desta pesquisa sobre a eficácia dos algodoeiros Bt (Gore et al., 2001). A mortalidade e o tempo letal para lagartas de *H. armigera* variou significativamente entre algodoeiros Bt, dependendo do estágio larval, da transgenia do algodoeiro e da fenologia e órgão da planta. O efeito significativo da interação entre o estágio larval da lagarta e a transgenia do algodão indicou que a eficácia das toxinas Bt é influenciada pelo estágio de desenvolvimento das lagartas. Em contraste, a mortalidade em plantas Bt foi alta e não variou significativamente entre os diferentes estágios larvais, sugerindo que as toxinas Bt produzidas nesses tipos de algodoeiros transgênicos são eficazes em matar lagartas independentemente do seu tamanho ou estágio de desenvolvimento (Knight et al., 2013).

Essas informações encontradas são importantes porque demonstram que os algodoeiros Bt podem oferecer uma forma de controle eficaz contra *H. armigera*, potencialmente reduzindo a necessidade de aplicações frequentes de inseticidas

sintéticos. No entanto, a mortalidade das lagartas também dependeu a transgenia do algodão, a fenologia do algodoeiro e o órgão da planta. Foi observado que, em variedades Bt, a mortalidade das lagartas foi consistentemente alta, geralmente acima de 70%, mas houve uma ligeira diminuição na eficácia em plantas Bt Cry1Ab+Cry2Ae durante os estágios fenológicos mais avançados (GS6 e GS7) e em órgãos reprodutivos como botões florais e flores, com taxas de mortalidade variando entre 70% e 89% (Adamczyk & Sumerford, 2001).

Receava-se que a expressão das toxinas Bt pudesse diminuir em estágios fenológicos avançados e em certos órgãos da planta, devido à alocação e partição de recursos metabólicos pela planta durante o desenvolvimento reprodutivo (Liu et al., 2019). Os resultados desta pesquisa mostraram que os algodoeiros Bt foram eficazes na maior parte do ciclo de cultivo, sugerindo que esse não parece ser um grande problema no caso dos algodoeiros Bt que produzem a toxina VipAa. Contudo, nos bioensaios realizados, os insetos não puderam escolher o órgão ou tecidos vegetais para se alimentarem, situação que pode ser um pouco diferente no campo, onde as lagartas possuem certa autonomia de movimentação e podem evitar consumir tecidos com alta concentração de toxinas (Bahar et al., 2019). Para os monitores e manejadores de pragas do algodão é importante ser manter vigilante para a algum eventual escape por sobrevivência que possa ocorrer devido ao comportamento de evitação a Bt das lagartas.

O tempo letal mediano (TL₅₀) reforçou as observações de mortalidade, mostrando que as variedades de algodoeiro Bt de terceira geração, que expressam a toxina Vip3Aa, foram mais rápidas em causar mortalidade nas lagartas, com um tempo letal mediano (TL₅₀) menor comparado às variedades de segunda geração, que expressam Cry1Ac+Cry2Ab e Cry1Ab+Cry2Ae. Isso sugere que a nova geração de algodoeiros Bt deve proporcionar uma mortalidade mais rápida, o que pode ser importante para reduzir a chance de injúrias à cultura, porém aumenta a pressão de seleção para o desenvolvimento de resistência em populações de *H. armigera* a Bt. Além disso, a maior eficácia das folhas nos estágios fenológicos iniciais, que mataram as lagartas cerca de 2 dias mais rápido do que outros órgãos em estágios fenológicos posteriores, indica que a fase inicial de desenvolvimento do algodoeiro deve reduzir grande parte da população de *H. armigera* (Marques et al., 2023). Apesar disso é preciso atenção a ataques severos em estágios fenológicos avançados, os quais

podem causar grande prejuízo, como aqueles que ocorreram em 2022/2023, próximo à colheita do algodão no oeste da Bahia.

1.5. CONCLUSÕES

Os algodoeiros transgênicos Bt com a toxina Vip3Aa são mais potentes que os com apenas toxinas Cry contra lagartas de *H. armigera*.

As toxinas Bt produzidas nas folhas dos algodoeiros nos estágios fenológicos até 45 dias matam as lagartas mais rápido (2 dias) do que nas folhas e outras estruturas reprodutivas.

A susceptibilidade aos algodões Bt é maior nas lagartas pequenas (L1, <0,5 cm) e decresce pouco nas médias (L3, 1,0–1,5 cm) e nas grandes (L5, >3,5 cm).

A eficácia das lagartas após 7 dias é alta, 80–100 %, variando pouco em função tipos de transgenia Bt, estágios fenológicos e órgãos da planta.

Os algodoeiros com a transgenia Bt Cry ou com Cry e Vip possuem alta eficácia potencial contra *H. armigera*, estejam lagartas pequenas, médias ou grandes comendo diferentes estruturas da planta de diversos estágios fenológicos de desenvolvimento da cultura.

1. 6. REFERÊNCIAS

- Adamczyk, J. J., & Sumerford, D. V. (2001). Potential factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard &®& cotton. Journal of Insect Science. <https://doi.org/10.1093/jis/1.1.13>
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control, 19(6), 716–723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
- Anuradha, P., E, M. S., Priyanka, M., Emaiya, R., Karthik, P., Suganthi, A., & Krishnamoorthy, S. V. (2023). Determination of chlorantraniliprole for managing *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* in cotton ecosystem. Environmental Research, 239, 117301. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117301>
- Borém, A., & Freire, E. C. (2014). Algodão do plantio à colheita (UFV, Ed.).
- CONAB. (2024). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos.

- CTNBIO. (2024). Liberações Comerciais. http://ctnbio.mctic.gov.br/liberacao-comercial/-/document_library_display/SqhWdohU4BvU/view/614407?_110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU_redirect=http%3A%2F%2Fctnbio.mctic.gov.br%2Fliberacao-comercial%2F-%2Fdocument_library_display%2FSqhWdohU4BvU%2Fview%2F614405%3F_110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU_redirect%3Dhttp%253A%252F%252Fctnbio.mctic.gov.br%252Fliberacao-comercial%253Fp_p_id%253D110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU%2526p_p_lifecycle%253D0%2526p_p_state%253Dnormal%2526p_p_mode%253Dview%2526p_p_col_id%253Dcolumn-2%2526p_p_col_count%253D3#/liberacao-comercial/consultar-processo
- Dong, H. Z., & Li, W. J. (2007). Variability of Endotoxin Expression in Bt Transgenic Cotton. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193(1), 21–29. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2006.00240.x>
- Elkins, B. H., Portilla, M., Allen, K. C., Little, N. S., Mullen, R. M., Paulk, R. T., & Read, Q. D. (2024). Sublethal effects of a commercial Bt product and Bt cotton flowers on the bollworm (*Helicoverpa zea*) with impacts to predation from a lady beetle (*Hippodamia convergens*). *PLOS ONE*, 19(5), e0302941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302941>
- Gbur, E. E., Stroup, W. W., McCarter, K. S., Durham, S., Young, L. J., Christman, M., West, M., & Kramer, M. (2012). Analysis of Generalized Linear Mixed Models in the Agricultural and Natural Resources Sciences. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/2012.generalized-linear-mixed-models>
- Greene, G. L., Leppla, N. C., & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69, 448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- Hall, W. J., & Wellner, J. A. (1980). Confidence Bands for a Survival Curve from Censored Data. *Biometrika*, 67(1), 133. <https://doi.org/10.2307/2335326>
- HURVICH, C. M., & TSAI, C.-L. (1989). Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*, 76(2), 297–307. <https://doi.org/10.1093/biomet/76.2.297>
- ISAAA, I. S. for the A. of A. A. (2024, July 8). GM Approval Database. <https://www.isaaa.org/Gmapprovaldatabase/Advsearch/Default.Asp?CropID=7&TraitTypeID=2&DeveloperID=Any&CountryID=BR&ApprovalTypeID=>
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), 457. <https://doi.org/10.2307/2281868>
- Likhitha, P., Undirwade, D. B., Kulkarni, U. S., Kolhe, A. V., & Moharil, M. P. (2023). Cry toxin expression in different plant parts of Bt cotton at different phenological stages.

Egyptian Journal of Biological Pest Control, 33(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00742-8>

- Mahmood, M. A., Ahmed, N., Hussain, A., Naqvi, R. Z., Amin, I., & Mansoor, S. (2024). Dominance of Cotton leaf curl Multan virus-Rajasthan strain associated with third epidemic of cotton leaf curl disease in Pakistan. *Scientific Reports*, 14(1), 13532. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63211-8>
- Malinga, L. N., & Laing, M. D. (2022). Efficacy of Biopesticides in the Management of the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Noctuidae), under Field Conditions. *Insects*, 13(8), 673. <https://doi.org/10.3390/insects13080673>
- Munger, P., Bleiholder, H., Hack, M., Stauß, M. H. R., Van den Boom, T., & Weber, E. (1998). Phenological growth stages of the cotton plant (*Gossypium hirsutum* L.): Codification and description according to the BBCH Scale. *J Agron Crop Sci.*, 180, 143–149.
- Páez Jerez, P. G., Alves, A. C. L., Quinteros Cortes, J. E., Ribeiro, L. M., Hill, J. G., Vera, M. T., Gonzatto, M. P., Pitta, R. M., & Pereira, E. J. G. (2023). Diamide seed treatment may protect early soybean growth stages against *Helicoverpa armigera*. *Crop Protection*, 168, 106214. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106214>
- Adamczyk, J. J., & Sumerford, D. V. (2001). Potential factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard® cotton. 6 pp. In *Journal of Insect Science*. <http://www.insectscience.org/1.13>.
- Bahar, M. H., Stanley, J., Backhouse, D., Mensah, R., Del Socorro, A., & Gregg, P. (2019). Survival of *Helicoverpa armigera* larvae on and Bt toxin expression in various parts of transgenic Bt cotton (Bollgard II) plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(5), 415–423. <https://doi.org/10.1111/eea.12792>
- Gore, J., Leonard, B. R., & Adamczyk, J. J. (2001). Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) Survival on “Bollgard” and “Bollgard II” Cotton Flower Bud and Flower Components. In *J. Econ. Entomol.* (Vol. 94, Issue 6). <https://academic.oup.com/jee/article/94/6/1445/2217525>
- Knight, K., Head, G., & Rogers, J. (2013). Season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab proteins in Bollgard II cotton in Australia. *Crop Protection*, 44, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.10.014>
- Liu, Z., Eltayib H, M. A. A., Wu, H., Zhou, M., Zhang, X., Chen, Y., & Chen, D. (2019). Bt insecticidal efficacy variation and agronomic regulation in Bt cotton. In *Journal of Cotton Research* (Vol. 2, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s42397-019-0042-1>
- Marques, L. H., Ishizuka, T. K., Pereira, R. R., Istchuk, A. N., Rossetto, J., Moscardini, V. F., e Silva, O. A. N. B., Santos, A. C., Nowatzki, T., Dahmer, M. L., Sethi, A., Storer, N. P., Gontijo, P. C., Netto, J. C., Weschenfelder, M. A. G., de Almeida, P. G., & Bernardi, O. (2023). Performance of cotton expressing Cry1Ac, Cry1F and Vip3Aa19 insecticidal proteins against *Helicoverpa armigera*, *H. zea* and their hybrid progeny,

and evidence of reduced susceptibility of a field population of *H. zea* to Cry1 and Vip3Aa in Brazil. PLoS ONE, 18(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289003>

TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO 1

Tabela 1.1. Informações das composições de toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) presentes nas plantas de algodão utilizadas neste estudo.

Composição de princípios ativos (toxinas Bt) de resistência a lagarta	Nome comercial da tecnologia transgênica	Evento(s) transgênico(s)	Variedade de algodoeiro	Empresa produtora da semente	Empresa detentora do evento transgênico	Ano de liberação comercial
Não-Bt	-	GHB614 x T304-40 x GHB119	FM 944 GL	BASF	BASF	2012
Cry1Ac + Cry2Ab2	Bollgard II	MON 159857	DP 1637 B2 RF	Bayer	Bayer	2009
Cry1Ac + Cry2Ab2 + Vip3Aa19	Bollgard III	MON15985 x MON88913 x COT102	DP 1949	Bayer	Bayer	2016
Cry1Ab + Cry2Ae	GLT	T304-40 x GHB119	FM 906 (GLT)	BASF	BASF	2011
Cry1Ab + Cry2Ae + Vip3Aa19	GLTP	GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102	FM 985 (GLTP)	BASF	BASF	2017
Cry1F + Cry1Ac, + Vip3Aa19	WideStrike 3	DAS-21023-5 x DAS-24236-5 x SYN-IR102-7	TMG 91	Corteva	Corteva	2018

Tabela 1.2. Informações sobre os estágios fenológicos do algodoeiro que foram utilizados na pesquisa.

Código do estágio fenológico	Dias após a emergência	Descrição
GS1:11	7-10	Primeira folha verdadeira
GS5:55	35-45	Início da fase reprodutiva, 1º botão floral
GS6:67	60-75	Fase reprodutiva, 5ª flor
GS7: 79	90-110	Fase reprodutiva, 9ª maçã

Referência: Munger, P., Bleiholder, H., Hack, M., Stauß, M. H. R., Van den Boom, T., & Weber, E. (1998). Phenological growth stages of the cotton plant (*Gossypium hirsutum* L.): Codification and description according to the BBCH Scale. J Agron Crop Sci., 180, 143–149.

Tabela 1.3. Teste F dos efeitos dos fatores estágio larval de *Helicoverpa armigera*, transgenia de algodoeiro Bt, e fenologia/órgão da planta.

Variável resposta	Efeito	GL Num	GL Den	F	P
Tempo letal mediano (TL ₅₀)	Estágio larval do inseto (L)	2	124	34,03	< 0,01
	Transgenia do Algodoeiro (A)	4	124	3,42	0,01
	Fenologia/Órgão da planta (FO)	9	124	11,57	< 0,01
Mortalidade acumulada	Estágio larval do inseto (L)	2	108	42,4	< 0,01
	Transgenia do Algodoeiro (A)	5	108	< 0,01	> 0,99
	Fenologia/Órgão da planta (FO)	7	108	0,04	0,99
	L × A	10	108	4,00	< 0,01
	A × F × O	32	108	5,57	< 0,01

GL Num, graus de liberdade do numerador. GL Den, graus de liberdade do denominador

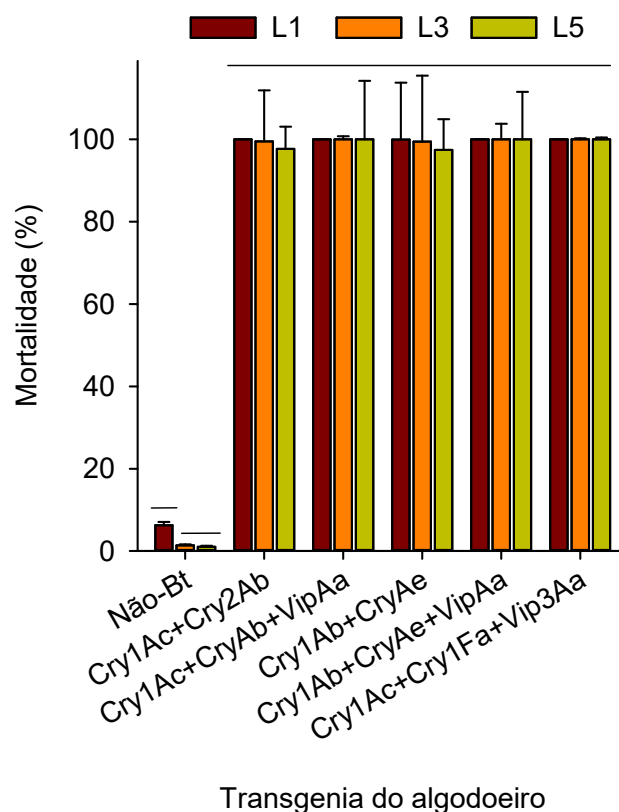


Figura 1.1. Porcentagem de mortalidade de *Helicoverpa armigera* de acordo com o estágio larval e a transgenia Bt do algodoeiro. As lagartas alimentaram nos tecidos da planta por 7 dias, quando se contabilizou a mortalidade. Médias e erros padrões com a mesma linha não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

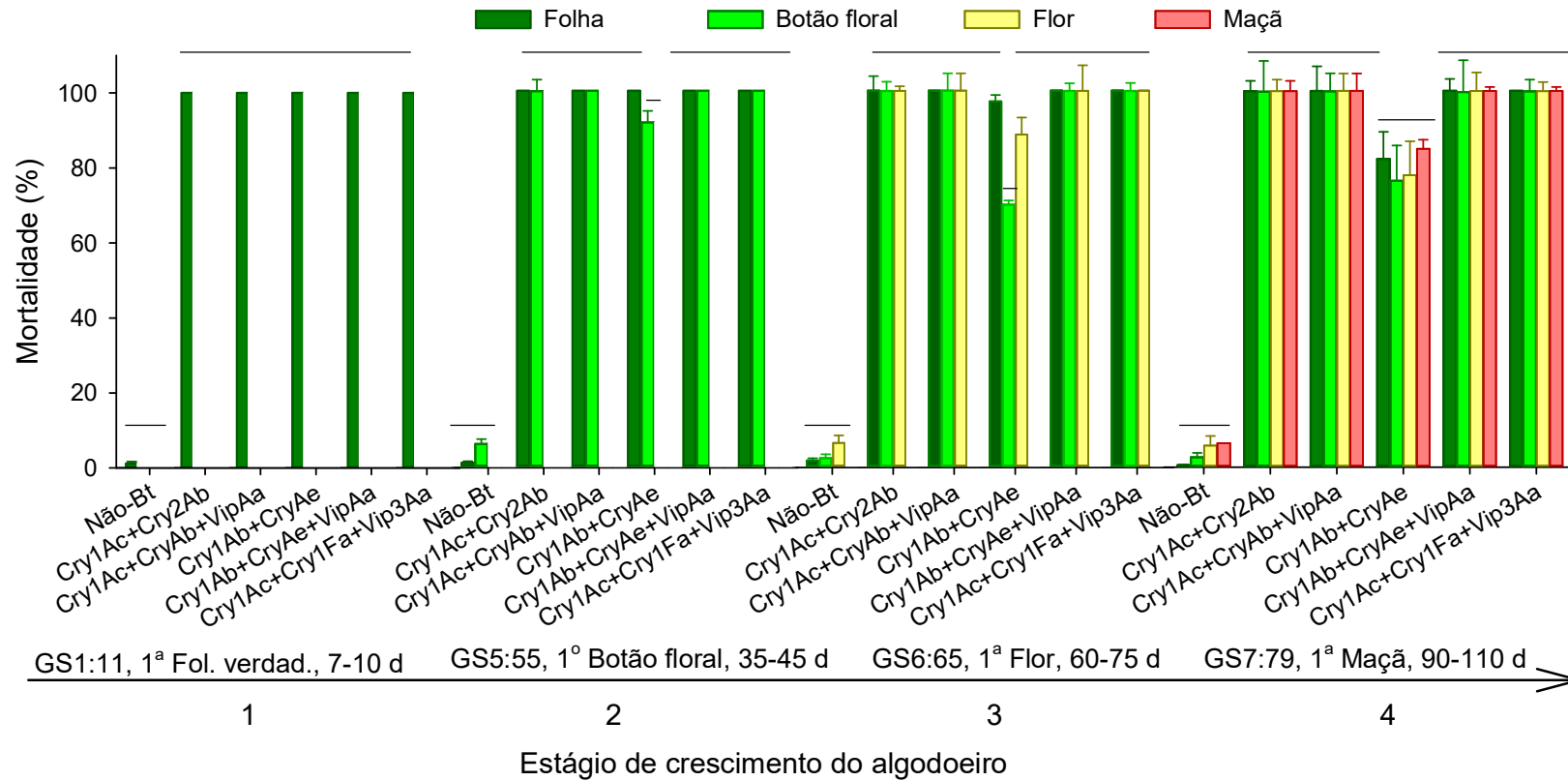


Figura 1.2. Porcentagem de mortalidade de *Helicoverpa armigera* de acordo com a transgenia Bt do algodoeiro e a fenologia e o órgão da planta. Médias e erros padrões com a linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). O número de insetos testados em cada ensaio foi 480 para os algodoeiros não-Bt e 96 cada uma para cada uma das variedades Bt e cada um dos estágios de crescimento do algodoeiro.

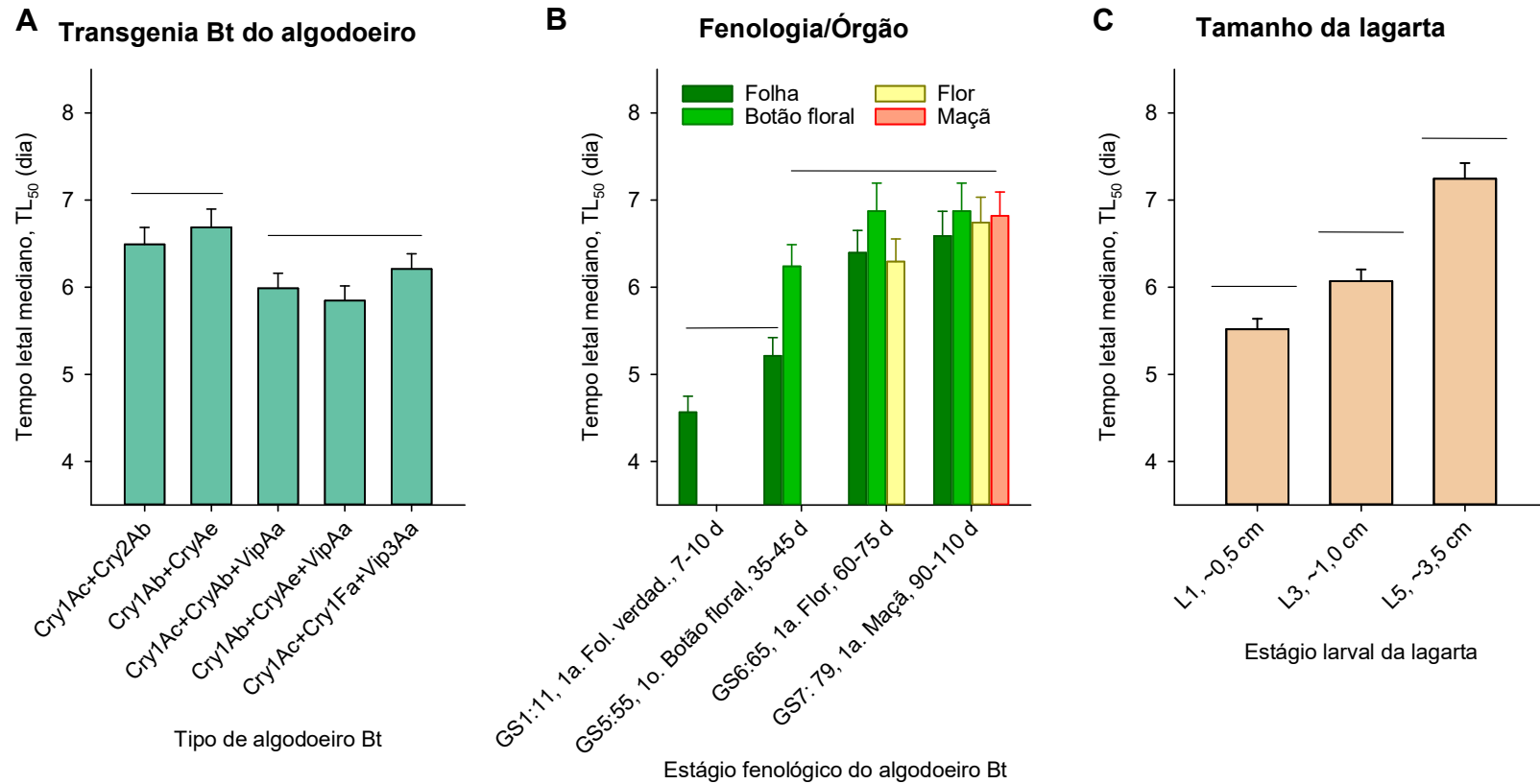


Figura 1.3. Rapidez do efeito letal a *Helicoverpa armigera* em função da transgenia Bt, fenologia/órgão da planta e tamanho da lagarta. Médias e erros padrões com a mesma linha não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

CAPÍTULO 2

Resistência a toxinas Bt Cry pode comprometer o potencial de controle de *Spodoptera frugiperda* por algodoeiros Bt?

Resumo

O cultivo de algodão é amplamente afetado por pragas como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) que pode causar danos severos nos cultivos. As lagartas de *S. frugiperda* atacam inicialmente as folhas mais jovens do algodoeiro e, à medida que se desenvolvem, consomem estruturas reprodutivas como botões florais, flores e maçãs, o que pode levar a perdas substanciais na produção de algodão. A introdução de algodões transgênicos, que expressam toxinas Cry e Vip de *Bacillus thuringiensis* (Bt), foi uma importante inovação no controle dessa praga. No entanto, a resistência da toxinas Cry, documentada em algumas populações de *S. frugiperda*, ameaça a eficácia do controle oferecido por essa tecnologia. Este estudo investigou a eficácia de diferentes cultivares de algodoeiro Bt na mortalidade de *S. frugiperda*, considerando variáveis como a resistência pré-existente a toxina Bt, os estágios larvais, os órgãos da planta, e os estágios fenológicos. As plantas foram cultivadas normalmente no campo sem aplicação de inseticida e, em diferentes estágios fenológicos foram colhidos e imediatamente oferecidos aos insetos no laboratório por 7 dias. Os algodoeiros com a toxina Vip3Aa mataram as lagartas de *S. frugiperda* mais rápido (3–4 dias) que algodoeiros com toxinas somente Cry. Esse efeito ocorreu sobretudo nas lagartas pequenas ou médias (L1 ou L3, <1,5 cm) que nos ensaios foram mais suscetíveis aos algodoeiros Bt que as grandes (L5, >3,5 cm). A resistência a Bt da população do inseto não alterou significativamente o tempo letal mediano das lagartas L5, mas o fez variavelmente, em direção, amplitude ou ambos, nas lagartas dos estágios L1 e L3. Nas lagartas de L1, o tempo letal foi alongado em 15-43%, seja nos algodoeiros Cry ou nos Cry e Vip, sobretudo Cry1Ac + Cry1Fa + Vip3Aa. Nas lagartas L3, houve aumento de 12–22% no tempo letal nos algodoeiros Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab+Cry2Ae e Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa, e redução de 13–23% nos algodoeiros Bt Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa e Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa. Contudo, os tecidos de todos dos algodoeiros Bt testados causaram mortalidade acumulada em 7

dias de 100% das lagartas, independentemente da resistência delas a Bt Cry e do estágio larval (L1, L3 ou L5) e se elas consumiram folha, botão floral, ou maçã das plantas de uma ampla gama de estágios fenológicos. Nessas condições, a mortalidade natural das lagartas foi <5%, mostrando que alta mortalidade seguramente se deve às toxinas Bt produzidas nos tecidos dos algodoeiros transgênicos.

Palavras-chave: Resistência, manejo de pragas, transgenia.

Abstract

Cotton cultivation is widely affected by pests such as *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm, Lepidoptera: Noctuidae), which can cause severe crop damage. Fall armyworms initially attack the younger leaves of the cotton plant, and they consume reproductive structures such as flower buds, flowers, and bolls as they develop, which can lead to substantial losses in cotton production. The introduction of transgenic cotton cultivars, which produce Cry and Vip toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt), was an important innovation for controlling lepidopteran pests in cotton. However, the resistance of Cry toxins, documented in some populations of *S. frugiperda*, threatens the effectiveness of the control offered by this technology. This study investigated the efficacy of different Bt cotton cultivars on *S. frugiperda* mortality, considering variables such as pre-existing resistance to Bt toxin, larval stages, plant organs, and phenological stages. The plants were normally cultivated in the field without insecticide application, and, in different phenological stages, they were harvested and immediately offered to the insects in the laboratory for 7 days. Cotton plants with Vip3Aa toxin killed *S. frugiperda* caterpillars faster (3–4 days) than cotton plants with Cry-only toxins. This effect occurred mainly in small or medium armyworms (L1 or L3, <1.5 cm) that in the trials were more susceptible to Bt cotton than large ones (L5, >3.5 cm). The Bt resistance of the insect population did not significantly alter the median lethal time of L5 larvae. Still, it did so variably, in direction, amplitude, or both, in the larvae of the L1 and L3 stages. In the former, the lethal time was lengthened by 15–43%, either in Cry cotton or in Cry and Vip, prima Cry1Ac + Cry1Fa + Vip3Aa. In L3 bollworms, there was a 12–22% increase in lethal time in Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab+Cry2Ae, and Cry1Ac+Cry1Fa+Vip3Aa kinds of Bt cotton, and a 13–23% reduction in Cry1Ac+Cry2Ab+Vip3Aa and Cry1Ab+Cry2Ae+Vip3Aa kinds of Bt cotton. However, the tissues of all of the Bt cotton plants tested caused cumulative mortality in 7 days of 100% of the caterpillars, regardless of their resistance to Bt Cry and the larval stage (L1, L3 or L5) and whether they consumed leaf, flower bud, or apple from plants of a wide range of phenological stages. Under these conditions, the natural mortality of the caterpillars was <5%, showing that high mortality is surely due to the Bt toxins produced in the tissues of transgenic cotton plants.

Keywords: Resistance, pest management, transgenic crops.

2.1. INTRODUÇÃO

Os desafios com fatores de estresse bióticos impactam o cultivo do algodoeiro globalmente e podem resultar em grandes prejuízos a cada safra se não for mitigada adequadamente a ação desses fatores. Dentre eles, se destaca o ataque de insetos-praga, principalmente os das ordens Coleoptera e Lepidoptera. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga polífaga e invasiva, considerada uma grande ameaça à economia global. Além do ataque a cultivos de milho e soja, o inseto causa grande ansiedade nos manejadores de praga nos cultivos de algodão, não somente nas Américas, mas também no Hemisfério Oriental, onde se estabeleceu na última década. O inseto possui grande capacidade dispersiva e migratória, com autonomia de voo de até 1.600 km, além de grande polifagia, alta taxa reprodutiva e curto tempo de geração, características que contribuíram para o receio global com ataques de *S. frugiperda* em diversas culturas (Salem et al., 2024).

O ataque aos cultivos de algodão por *S. frugiperda* geralmente ocorrem a partir do estabelecimento dos primeiros instares larvais, após a eclosão. As lagartas recém-eclodidas advindas de massa de ovos colocada pela mariposa normalmente se localizam no terço médio inferior das plantas de algodão, onde alimentam-se das folhas novas. Com o passar dos dias, as lagartas crescem e se desenvolvem e a partir desse processo fisiológico, elas mudam de hábito alimentar e por consequência aumentam a quantidade de estruturas consumidas. As larvas em instares mais avançados podem ser encontradas no terço médio superior das plantas, onde se alimentam das estruturas reprodutivas como botões florais, flores e maçãs. A alimentação das lagartas em botões florais e flores, prejudica o desenvolvimento e a fecundidade das flores, impossibilitando a formação das maçãs. A maior parte da alimentação da *S. frugiperda* no algodoeiro ocorre durante os últimos três instares larvais, quando é responsável por aproximadamente 98% da desfolha e por danos causados nas maçãs. Até 80% das estruturas reprodutivas podem ser consumidas até os últimos instares (Hardke et al., 2015).

Proteger o cultivo do algodão contra o ataque da *S. frugiperda* durante todo o seu desenvolvimento é importante para alcançar alta produtividade da cultura. O algodoeiro geneticamente modificado que produz as toxinas Cry e Vip pode ser eficaz no controle das lagartas, tornando-se uma das principais formas de manejo dessa praga. Essa tecnologia transgênica dos algodoeiros Bt é fundamental na agricultura

contemporânea por oferecer comodidade no combate a infestações das lagartas (Tandy et al., 2023). Contudo, casos já documentados de resistência a toxinas Cry1 e Cry2 em populações de *S. frugiperda* pode comprometer a eficácia de controle das lagartas em alguns tipos de algodão Bt, principalmente aqueles com transgenia somente para produção de toxinas da classe das Cry (Santos-Amaya et al., 2015; Tavares et al., 2021).

Os algodões Bt foram plantados comercialmente pela primeira vez no Brasil em 2005 (CTNBio, 2024). Para que a tecnologia do algodão Bt seja eficaz contra lagartas nos cultivos do algodão, os níveis de produção de toxina Bt na planta devem estar em quantidades letais em diferentes estruturas como folha, botão floral, flor e maçã, onde as lagartas se alimentam à medida que crescem e se desenvolvem. Há relatos de observações da ocorrência de lagartas de *S. frugiperda* em certos tipos de algodão Bt, porém pouco se conhece da sobrevivência delas ao longo do desenvolvimento do inseto e da planta. A sobrevivência das lagartas em plantas de algodoeiro Bt pode estar associada ao(s) tipo(s) ou à baixa concentração de toxina produzida pela planta em determinados estágios fenológicos ou estruturas vegetais. Variação na produção da toxina Bt em plantas de algodão pode ocorrer devido a fatores como mutações no gene Bt, problemas na regulação da expressão gênica e interação entre genótipo da planta e o ambiente em que é cultivada (Liu et al., 2019).

Assim, nesta foi avaliado se a resistência a Bt em populações de *S. frugiperda* põe em risco o potencial de controle por algodoeiros Bt ao longo do desenvolvimento da cultura. Considerou-se diversos fatores que podem influenciar na suscetibilidade do inseto na sua interação com a planta Bt, incluindo, além da população resistente e suscetível a Bt, estágio larval, tipo de algodão Bt, idade da planta e estrutura onde o inseto pode se alimentar.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Origem e manutenção dos insetos

Em abril de 2021, aproximadamente 2000 lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas em campos de milho Bt expressando os genes Cry1 e Cry2 no município de São Desidério, Bahia. Os insetos coletados foram colocados em recipientes plásticos (uma lagarta por recipiente), acondicionados em caixas de isopor e levados ao Laboratório de Interação Inseto-Planta da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Uma segunda população de *S. frugiperda* foi utilizada na pesquisa. Os insetos foram originalmente fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo, localizada no município de Sete Lagoas, MG. Essa população é mantida em laboratório na ausência de pressão de seleção por toxinas Bt desde o ano 2000. A criação dessas lagartas é mantida no Laboratório de Interação Inseto-Planta da UFV. Antes da realização dos ensaios, os insetos de ambas as populações foram criados por uma geração em folhas de algodoeiro não Bt e posteriormente mantidos com dieta artificial como descrito a seguir.

Para criação dos insetos em laboratório, as mariposas são colocadas em gaiolas de PVC de 40 cm de altura x 30 cm de diâmetro, com papel sulfite nas paredes internas para oviposição. Para alimentação das mariposas, foi oferecida embebida em algodão hidrófilo dieta líquida a base de 10% de açúcar e 5% de ácido ascórbico em água. As folhas de papel contendo as posturas foram coletadas no segundo e no quarto dia a partir do início do período de oviposição. Posteriormente, foram armazenadas em sacolas plásticas até a eclosão. Grupos de neonatas foram transferidos para dieta artificial (Kasten Jr. et al., 1978) em copos plásticos de 500 ml até o 2º instar e depois individualizados em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP) até empuparem. As criações foram mantidas em ambiente controlado com temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 15\%$ e fotoperíodo de 14L:10E.

2.2.2. Cultivares de algodoeiro e seu cultivo

Plantas de algodoeiro dos mesmos cultivares descritos no capítulo anterior (Tabela 1.1, p. 32) foram utilizados nesta pesquisa. As plantas foram cultivadas em

campo na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão Diogo Alves de Melo do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG (20°48'45"S, 42°56'15"W, altitude 600 m), no período de 11/11/2022 a 30/05/2023.

O espaçamento entre linhas usado foi de 0,90 m com 8 plantas por metros com área total para cada cultivar de 100 m². Durante a instalação e manutenção do cultivo foram empregadas práticas culturais segundo Borém & Freire (2014) porém sem aplicação de inseticidas.

2.2.3. Delineamento experimental e bioensaios tempo-mortalidade

A pesquisa foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial de 2 populações do inseto x 3 estágios larvais x 6 cultivares x 4 estágios fenológicos em 4 órgãos ou estruturas vegetais do algodoeiro. Nos ensaios, um mínimo de 32 insetos foi utilizado, cada indivíduo representando a unidade para contagem do número de sucessos (mortes) e do tempo para ocorrência do evento de interesse. Os ensaios foram realizados escalonadamente de novembro de 2022 a maio de 2023 no laboratório de Interação Inseto-Planta (LABIIP) na UFV, Viçosa, Minas Gerais. Os quatros diferentes estágios fenológicos do algodoeiro foram utilizados de acordo com a escala BBCH (Munger et al., 1998). Foram utilizadas lagartas de 1º, 3º e 5º instar de *S. frugiperda* e as estruturas do algodoeiro foram folha, botão floral, flor e maçã. Essas estruturas vegetais foram fornecidas aos insetos na unidade experimental (recipiente plástico de 3 x 2 x 2 cm³) e foram substituídas quando necessário, como descrito no capítulo anterior. Após a montagem dos ensaios, as unidades experimentais foram mantidas nas mesmas condições ambientais utilizadas para a criação dos insetos (25 ± 1°C, umidade relativa do ar de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12L:12E). As avaliações de mortalidade foram realizadas a cada 24 horas, por um período de até 7 dias, caso não ocorresse mortalidade completa antes desse prazo.

Foram realizados quatro bioensaios ao longo do desenvolvimento fenológico do algodoeiro. O 1º bioensaio foi realizado na fase vegetativa GS1:11 (1ª folha verdadeira) e os procedimentos foram os mesmos daqueles descritos no capítulo anterior. O 2º bioensaio ocorreu no início da fase reprodutiva GS5:55, testando-se folhas e botões florais, os quais foram retirados do terço inferior das plantas, no 1º ramo simpodial, na primeira posição. O 3º bioensaio foi realizado no estágio GS6:65

utilizando-se folhas, botões florais e flores. Esses foram retirados do terço médio das plantas, localizado no 5º ramo simpodial, na primeira posição. O 4º bioensaio foi realizado em GS7: 79, com folhas, botões florais, flores e maçãs. Essas estruturas foram retiradas do terço superior das plantas, localizado no 9º ramo simpodial, na primeira posição. Os procedimentos para coleta, montagem e avaliação dos bioensaios foram realizados como descrito no capítulo anterior desta tese.

2.2.3. Análise dos dados

Os dados de número de mortes ao longo do tempo para ocorrência do evento para cada um dos ensaios realizados foram analisados usando o procedimento não-paramétrico de Kaplan e Meier (1958) para obter curvas de sobrevivência dos insetos. Isso foi feito para cada uma das estruturas vegetais e estágios fenológicos (10) de cada um dos cultivares (6) e para cada um dos estágios larvais (3) e cada uma das (2) populações de *S. frugiperda* que foram estudados. Ao todo obteve-se 360 curvas de sobrevivência e delas utilizou-se a mortalidade dos insetos após 7 dias nos tecidos vegetais e do tempo necessário para ocorrer a morte (letalidade) de 50% das lagartas (TL₅₀). A primeira variável mede a eficácia do tecido vegetal do algodoeiro Bt para causar o efeito desejado em determinado tempo. A segunda variável mede a eficiência (potência ou capacidade) do algodoeiro Bt para causar a morte, sendo mais eficiente aquele que causar o efeito em menos tempo (Hall & Wellner, 1980; Kaplan & Meier, 1958).

Essas variáveis foram analisadas usando modelos lineares generalizados Fiel ao delineamento experimental em esquema fatorial da pesquisa. Usou-se a distribuição Binomial com a função de ligação log para a proporção de mortalidade e a distribuição Gama com a função de ligação log para o tempo até ocorrer 50% de mortalidade do grupo nos tecidos das plantas (Gbur et al., 2012). O modelo linear foi composto pelos fatores anteriormente descritos, incluindo a população do inseto (2), o estágio larval do inseto (3), o cultivar da planta (6) e seus estágios fenológicos e órgãos ou estruturas (10). O modelo completo incluiu todos os efeitos principais dos fatores e das interações, reduzindo-o aos componentes (efeitos dos fatores e de interação) que apresentaram significância ($P < 0,05$) e contribuição substancial para descrever os dados com mínima deviância residual (Gbur et al. 2012). O modelo mínimo adequado (parcimonioso) foi geralmente aquele cujo valor do Qui-Quadrado

da falta de ajuste aproxima do número de graus de liberdade residual ou que tem o mínimo valor do critério de informação de Akaike (1974) corrigido para o tamanho da amostra (Hurvich & Tsai, 1989). Quando foi significativo o efeito das interações, ele foi desdobrado separando-se as médias pelo teste de Tukey ou pelo teste F ($P < 0,05$). Além disso, para melhor entender a direção e magnitude do efeito da resistência a Bt Cry no desempenho dos algodoeiros Bt contra as lagartas, calculou-se às seguintes variáveis com base nos valores de TL_{50} : i) fator de resistência ($FRC = TL_{50Res} \div TL_{50Sus}$), ii) tamanho do efeito da resistência a Bt no TL_{50} dos insetos ($TEF = TL_{50Res} - TL_{50Sus}$), e iii) efeito percentual (negativo ou positivo) no tempo letal dos insetos ($\%ETL = 100 \times (FRC - 1)$).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lagartas de *S. frugiperda* ao se alimentarem por cerca de uma semana nos tecidos dos algodões Bt e não-Bt apresentam dinâmica de mortalidade que variaram em função dos fatores em estudo (Tabela 2.1). O tempo letal mediano (TL_{50}) variou significativamente em função da população do inseto (P), estágio larval do inseto (L), transgenia do algodoeiro (A), e fenologia e órgão da planta ($F \times O$), com efeitos significativos de interações duplas, triplas e até quádrupla dos fatores (Tabela 2.1). O efeito significativo da interação entre população do inseto, estágio larval e transgenia Bt do algodoeiro ($P \times L \times A$), indica que o tempo necessário para os algodoeiros Bt causarem 50% de mortalidade das lagartas depende da população, do estágio larval do inseto e da transgenia da planta. Além disso, o efeito da interação entre população do inseto, transgenia do algodoeiro e fenologia e órgão da planta ($P \times A \times F \times O$) também foi significativo no tempo letal mediano (Tabela 2.1). Essas interações eram esperadas, dado as complexas relações entre o inseto e a planta de algodão, as quais dependem do genótipo (população) do inseto e seu estágio de desenvolvimento e das características da fenologia e órgãos da planta. Por outro lado, a mortalidade acumulada não apresentou variação significativa para a maioria dos fatores e suas interações, exceto na interação quádrupla ($P \times A \times F \times O$) (Tabela 2.1). Isso requer desdobramento para entender o efeito dos níveis dos fatores na mortalidade acumulada das lagartas.

Ao desdobrar a interação $P \times L \times A$ (Figura 2.1), observa-se um padrão geral nos valores de TL_{50} das lagartas nos algodoeiros Bt para as populações do inseto.

Nos algodoeiros com a toxina Vip3Aa, os valores de TL_{50} foram de 3–4 dias para as lagartas L1 e L3, cerca da metade dos valores de TL_{50} (5–6 dias) para lagartas desses estágios nos algodoeiros somente com toxinas Cry. Para as lagartas no estágio L5, a diferença entre esses tipos de algodoeiros Bt foi pequena a inexistente, com respectivos valores de cerca de 5 e 6 dias para os algodoeiros com Vip3Aa e os sem a toxina (Figura 2.1). Além disso, os valores de TL_{50} das lagartas no estágio L5 foram geralmente maiores que nos demais estágios, havendo certa interação com a característica de resistência a Bt da população de *S. frugiperda*. A resistência a Bt da população alterou menos de 8% no tempo letal mediano das lagartas L5, efeito não significativo, ao contrário daquele nas lagartas dos estágios L1 e L3, nas quais o efeito variou em direção ou amplitude ou ambos (Figura 2.1). O tempo letal das lagartas L1 foi alongado em 0,44–1,38 dias, 15–43 %, seja nos algodoeiros Bt produzindo somente toxinas Bt Cry ou naqueles produzindo toxinas Bt Cry e Vip, com destaque para o que produz Cry1Ac + Cry1Fa + Vip3Aa, cujo aumento foi 43% (Figura 2.1). Para lagartas L3, o efeito dependeu da transgenia Bt da planta. Houve aumento de 12–22 % no tempo letal nos algodoeiros Cry1Ac + Cry2Ab, Cry1Ab + Cry2Ae e Cry1Ac + Cry1Fa + Vip3Aa, e redução de 13–23 % nos algodoeiros Bt Cry1Ac + Cry2Ab + Vip3Aa, Cry1Ab + Cry2Ae + Vip3Aa (Figura 2.1).

A (Figura 2.2) mostra o tempo letal mediano dos insetos das populações suscetível e resistente nas diversas variedades de algodão e nos órgãos da planta de acordo com os estágios de crescimento. Observa-se que os valores de TL_{50} variaram significativamente entre as populações suscetível e resistente, e entre as variedades de algodoeiro Bt, estágios fenológicos e órgãos ou estruturas da planta. Para a população suscetível, as variedades de algodoeiro que expressam a toxina Vip3Aa mostraram um tempo letal mediano menor em comparação com as variedades que não expressam essa toxina, principalmente as com as combinações de Cry1A, Cry2A e Vip3Aa (Figura 2). Essas diferenças foram maiores até o estágio fenológico 3 (GS6:65, 5ª Flor, 60-75 dias após a emergência), mas, em menor extensão, continuaram a existir posteriormente até 90-110 dias após a emergência e com alguma variação nos órgãos ou estruturas da planta. Isso indica um maior potencial para eficácia dessas variedades no controle das lagartas, principalmente e nos órgãos como folhas e botões florais.

Padrão semelhante de efeito dos algodoeiros Bt com ou sem a toxina Vip3A ocorreu para a população resistente a Bt (Figura 2.2), e houve também um efeito

significativo, porém, pequeno, de 1–2 dias, no tempo letal para as lagartas resistentes em comparação às suscetíveis a Bt. O efeito se manifestou em aumento ou diminuição no tempo letal das lagartas, dependendo do estágio fenológico e do órgão ou estrutura da planta e variedade de algodoeiro Bt. As diferenças no tempo letal de lagartas resistentes e suscetíveis ocorreram quando elas se alimentaram de folhas e botões florais nos estágios fenológicos 1–3, e em flores e maçãs, no estágio 4 das plantas (Figura 2.2). Essa complicada resposta mostra que ocorrem complexas interações que influenciam no resultado da fitofagia de lagartas de *S. frugiperda*, as quais podem ou não carrear resistência a Bt ao interagirem com os algodoeiros Bt. Em geral, nas plantas em início de ciclo, a resistência a Bt pode erodir parte do potencial de controle das lagartas pelo algodão Bt, colocando mais em risco de falha de controle as variedades com apenas toxinas Cry do que aquelas com as toxinas Bt Cry e Vip3Aa.

Alguém pode se questionar se o tamanho dos efeitos e a complexidade das interações acima relatados pode afetar de forma preocupante a capacidade de controle de lagartas pelos algodoeiros Bt disponíveis no mercado. Na (Figura 2.3), é mostrada a porcentagem de mortalidade acumulada de *S. frugiperda* em função das populações suscetível e resistente a Bt, para cada transgenia Bt do algodoeiro, e em órgãos ou estruturas das plantas de diversos estágios fenológicos. Observa-se que, nos estágios de desenvolvimento do algodoeiro até 110 dias após emergência (GS1, GS5, GS6 e GS7) e nos diferentes órgãos da planta (folha, botão floral, flor e maçã), as cultivares transgênicas de algodoeiro que expressam toxinas Cry e Vip causaram 100 % de mortalidade em lagartas de ambas as populações de *S. frugiperda* (Figura 2. 3.) Esse resultado indica que as toxinas Cry e Vip, produzidas nas variedades de algodoeiro Bt, são altamente eficazes contra *S. frugiperda*, independentemente de: 1) a população ser suscetível ou resistente a Bt Cry, e 2) se a lagarta é pequena (L1) ou grande (L5). Em contraste, ao se alimentarem nos tecidos de diversos órgãos ou estruturas vegetais dos algodões Não-Bt em diferentes estágios fenológicos, as lagartas tiveram mortalidade mínima, menos de 5% (Figura 2.3). Esses resultados são evidências de que o efeito na mortalidade pode seguramente ser atribuído às toxinas Bt produzidas nos tecidos dos algodoeiros transgênicos.

2.4. CONCLUSÕES

Os algodoeiros com a toxina Vip3Aa são mais potentes contra *S. frugiperda* que algodoeiros somente com toxinas Cry, sobretudo as lagartas pequena ou médias (L1 ou L3, <1,5 cm), que são suscetíveis que as grandes (L5, >3,5 cm).

A suscetibilidade aos algodoeiros Bt varia com a resistência a Bt da população do inseto, a variedade de algodoeiro Bt, o seu estágio fenológico e o órgão ou estrutura da planta.

A resistência a Bt da população altera a suscetibilidade das lagartas pequenas e médias nos algodoeiros Bt, as podem aumentar ou diminuir a suscetibilidade aos algodoeiros Bt Cry e Bt Cry e Vip3Aa, dependendo da variedade da transgenia Bt, da estrutura da planta consumida pelo inseto durante o desenvolvimento da cultura.

O tamanho dos efeitos da resistência a Bt da população não compromete a capacidade de controle de lagartas pelos algodoeiros Bt, que se aproxima de 100% mortalidade acumulada independentemente se a população é suscetível ou resistente a Bt Cry e as lagartas (pequenos ou grandes) e se consomem folha, botão floral, ou maçã das plantas em diversos estágios fenológicos.

2.5. REFERÊNCIAS

- Hardke, J. T., Lorenz, G. M., & Leonard, B. R. (2015). Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Ecology in Southeastern Cotton. *Journal of Integrated Pest Management*, 6(1), 10–10. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmv009>
- Liu, Z., ELTAYIB H, M. A. A., WU, H., ZHOU, M., ZHANG, X., CHEN, Y., & CHEN, D. (2019). Bt insecticidal efficacy variation and agronomic regulation in Bt cotton. *Journal of Cotton Research*, 2(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s42397-019-0042-1>
- Salem, S. A. R., Alhousini, E. M. E., Al-Amgad, Z., & Mahmoud, M. A. B. (2024). Efficiency of spinetoram on biological, biochemical, and histological parameters in the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Egypt. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 131(2), 489–499. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00835-4>
- Santos-Amaya, O. F., Rodrigues, J. V. C., Souza, T. C., Tavares, C. S., Campos, S. O., Guedes, R. N. C., & Pereira, E. J. G. (2015a). Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5(1), 18243. <https://doi.org/10.1038/srep18243>

- Tandy, P., Lamour, K., Placidi de Bortoli, C., Nagoshi, R., Emrich, S. J., & Jurat-Fuentes, J. L. (2023). Screening for resistance alleles to Cry1 proteins through targeted sequencing in the native and invasive range of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 116(3), 935–944. <https://doi.org/10.1093/jee/toad061>
- Tavares, C. S., Santos-Amaya, O. F., Oliveira, E. E., Paula-Moraes, S. V., & Pereira, E. J. G. (2021). Facing Bt toxins growing up: Developmental changes of susceptibility to Bt corn hybrids in fall armyworm populations and the implications for resistance management. *Crop Protection*, 146, 105664. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105664>

TABELAS E FIGURAS DO CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Teste *F* dos efeitos dos fatores população e estágio larval de *Spodoptera frugiperda*, transgenia de algodoeiro Bt e fenologia/órgão da planta.

Variável	Efeito	GL Num	GL Den	<i>F</i>	<i>P</i>
Tempo letal	População do inseto (P)	1	172	29.57	< 0,01
Mediano (TL ₅₀)	Estágio larval (L)	2	172	258.8	< 0,01
	Transgenia do algodoeiro (A)	4	172	169.81	< 0,01
	Fenologia/Órgão vegetal (F × O)	9	172	99.88	< 0,01
	P × L	2	172	12.25	< 0,01
	L × A	8	172	13.18	< 0,01
	P × A	4	172	7.05	< 0,01
	P × L × A	8	172	3.77	< 0,01
	P × A × F × O	81	172	4.86	< 0,01
Mortalidade acumulada	População do inseto (P)	1	212	< 0,01	0,99
	Estágio larval (L)	2	212	< 0,01	0,99
	Transgenia do algodoeiro (A)	5	212	< 0,01	> 0,99
	Fenologia/Órgão vegetal (F × O)	9	212	< 0,01	> 0,99
	P × L	2	212	< 0,01	> 0,99
	L × A	10	212	0,05	> 0,99
	P × A	5	212	< 0,01	> 0,99
	P × L × A	10	212	0.52	0,87
	P × A × F × O	97	212	1.59	< 0,01

GL Num, graus de liberdade do numerador. GL Den, graus de liberdade do denominador

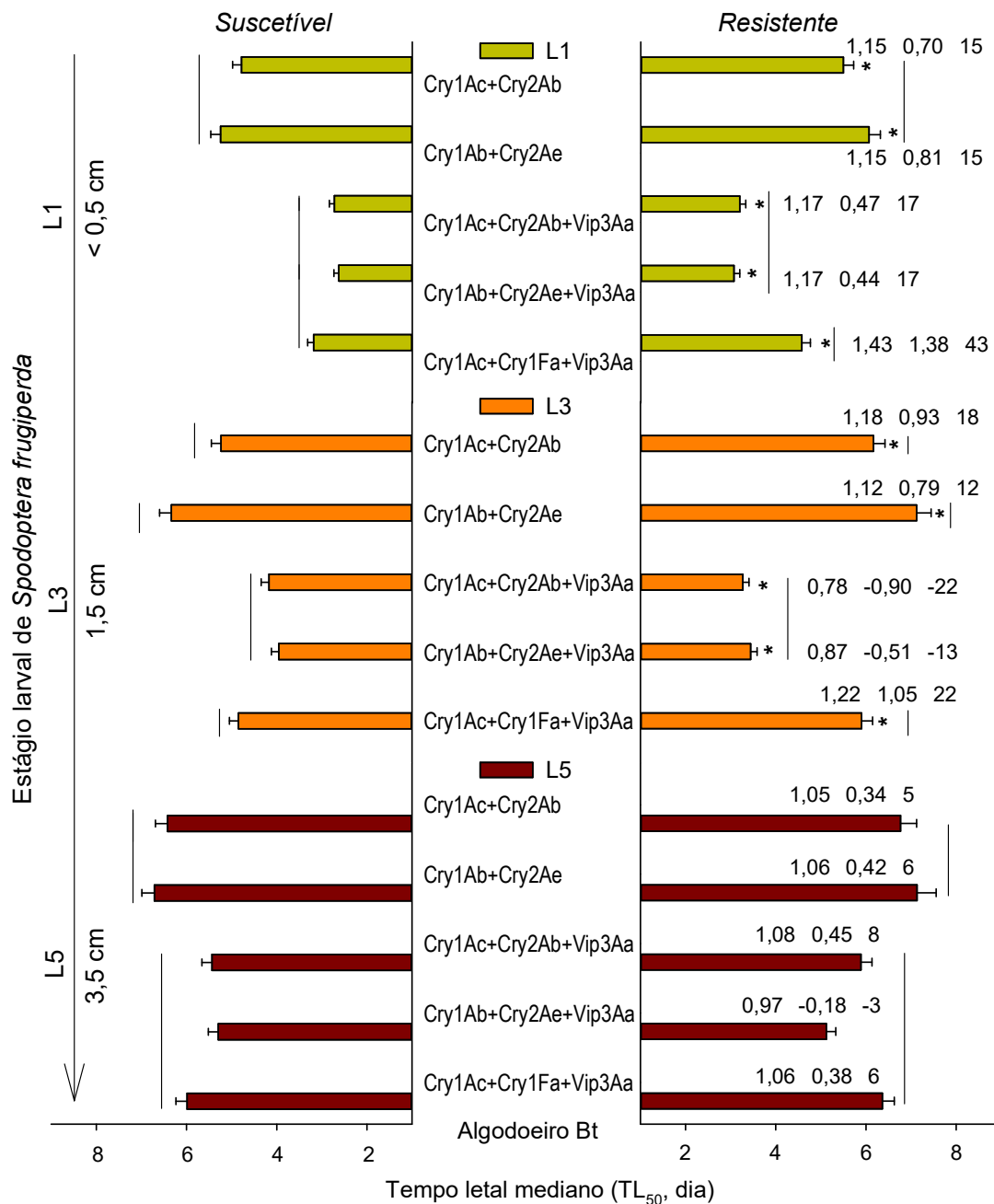


Figura 2.1. Tempo letal de *Spodoptera frugiperda* afetado pelo estágio larval e resistência das lagartas a *Bacillus thuriangiensis* (Bt) e a transgenia Bt do algodoeiro. Em cada estágio larval, médias e erros padrões com o mesmo segmento de linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Asterisco (*) indica efeito significativo da resistência a Bt no tempo letal pelo teste F do desdobramento ($P < 0,05$). Respectivamente, os valores nos painéis correspondem às seguintes variáveis: i) fator de resistência ($FRC = TL_{50Res} \div TL_{50Sus}$), ii) tamanho do efeito da resistência a Bt no TL_{50} dos insetos ($TEF = TL_{50Res} - TL_{50Sus}$), e iii) efeito percentual (negativo ou positivo) no tempo letal dos insetos ($\%ETL = 100 \times (FRC - 1)$).

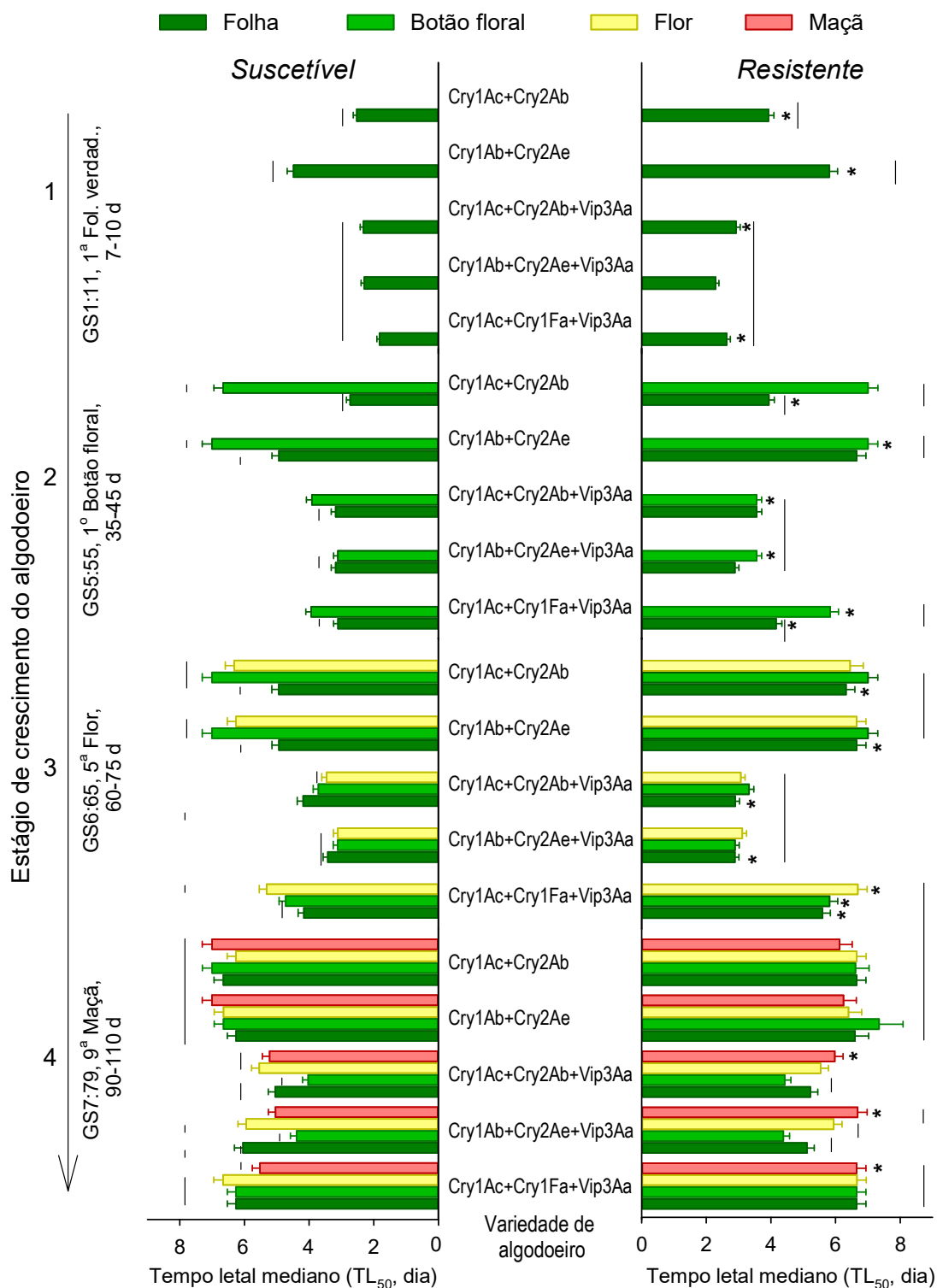


Figura 2.2. Tempo letal de *Spodoptera frugiperda* afetado pela interação da resistência das lagartas a *Bacillus thuringiensis* (Bt) com a transgenia Bt do algodoeiro e a fenologia e o órgão da planta. Médias e erros padrões com o mesmo segmento de linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Asterisco (*) indica diferença significativa em suscetibilidade entre as populações pelo teste F ($P < 0,05$).

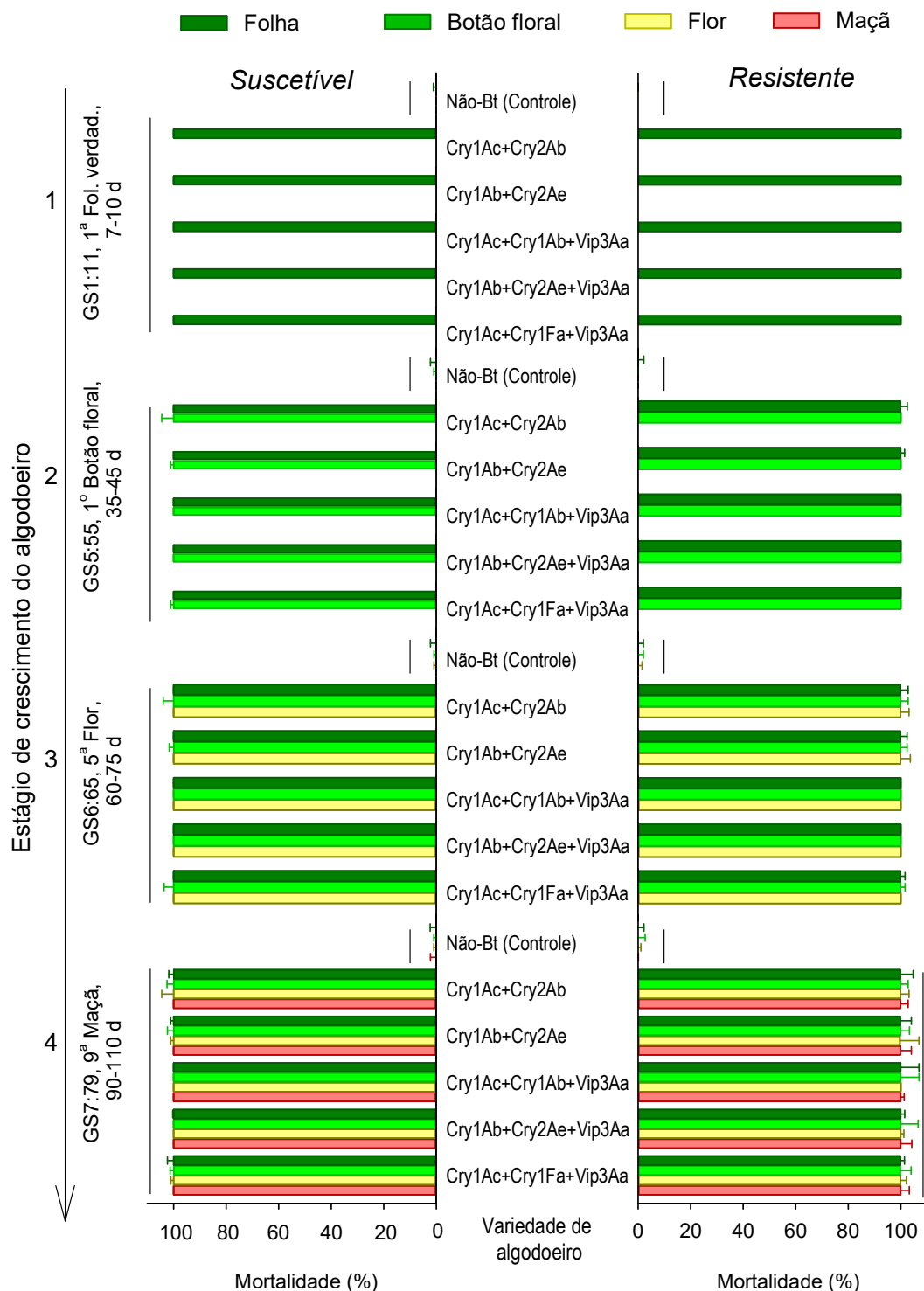


Figura 2.3. Mortalidade acumulada de *Spodoptera frugiperda* de acordo com a resistência das lagartas a *Bacillus thuringiensis* (Bt) e com a transgenia Bt do algodoeiro e a fenologia e o órgão da planta. Médias e erros padrões com a linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). O número de insetos de cada população testados em cada ensaio foi 480 para os algodoeiros não-Bt e 96 para cada estrutura vegetal de cada variedade Bt e cada estágio de crescimento do algodoeiro.

CONCLUSÕES GERAIS

Os algodoeiros transgênicos Bt com a toxina Vip3Aa, são mais potentes contra as lagartas de *H. armigera* e *S. frugiperda*, sobretudo as pequenas ou médias (estágio L1 ou L3, <1,5 cm), que são mais suscetíveis que as grandes (estágio L5, >3,5 cm).

As toxinas Bt produzidas nas folhas dos algodoeiros Bt nos estágios fenológicos até 45 dias matam as lagartas mais rápido (2 dias) que tais toxinas na folhas e outras estruturas reprodutivas.

A eficácia dos tecidos dos algodoeiros Bt contra lagartas de *H. armigera* em 7 dias é alta, 80–100 %, e varia pouco com os tipos de transgenia Bt, estágios fenológicos e órgãos da planta.

Os algodoeiros Bt Cry ou com Cry e Vip possuem alta eficácia potencial contra *H. armigera*, estejam lagartas pequenas, médias ou grandes em diferentes estruturas da planta de diversos estágios fenológicos de desenvolvimento da cultura.

A resistência a Bt Cry da população altera a suscetibilidade das lagartas de *S. frugiperda* nos algodoeiros Bt nos estágios larvais L1 e L3. As lagartas podem aumentar ou diminuir a suscetibilidade aos algodoeiros Bt Cry e Bt Cry e Vip3Aa, dependendo da transgenia Bt do cultivar e estrutura da planta consumida pelo inseto durante o desenvolvimento da cultura.

O tamanho do efeito da resistência a Bt Cry na suscetibilidade dos insetos não compromete a eficácia dos algodoeiros Bt contra *S. frugiperda*. Tal eficácia aproxima de 100% depois de 7 dias, independentemente se a população é suscetível ou resistente a Bt Cry e as lagartas (pequenas ou grandes) consomem folha, botão floral, ou maçã das plantas em diversos estágios fenológicos.