

MARCELO MENDES RABELO

**TOXICIDADE LETAL E SUBLETAL DE TOXINAS
E PLANTAS Bt A *Spodoptera eridania***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

R114t Rabelo, Marcelo Mendes, 1991-
2016 Toxicidade letal e subletal de toxinas e plantas Bt a
Spodoptera eridania / Marcelo Mendes Rabelo. – Viçosa, MG,
2016.
iv, 30f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.22-26.

1. Insetos - Hormese. 2. *Spodoptera eridania*. 3. *Bacillus thuringiensis*. 4. Plantas - Toxinas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22 ed. 595.78

MARCELO MENDES RABELO

TOXICIDADE LETAL E SUBLETAL DE TOXINAS E PLANTAS Bt A
Spodoptera eridania

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

APROVADA: 19 de julho de 2016.

Silvana Vieira de Paula Moraes

Raul Narciso Carvalho Guedes

Oscar Fernando Santos Amaya
(Coorientador)

Eliseu José Guedes Pereira
(Orientador)

RESUMO

RABELO, Marcelo Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016.
Toxicidade letal e subletal de toxinas Bt a *Spodoptera eridania*.
Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientador: Oscar Fernando Santos Amaya

O aumento nos níveis populacionais e danos originados pela lagarta desfolhadora *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) em plantações de soja e algodão Bt podem estar relacionados a efeitos subletais exercidos pelas próprias toxinas produzidas por essas plantas. Para testar essa hipótese foram realizados estudos de suscetibilidade de *S. eridania* às toxinas Cry1Ac, Cry1Fa e Cry2Aa. Também foi investigado a resposta à exposição de concentrações subletais da toxina Cry1Ac usando toxina purificada e o desempenho larval em folhas de soja e algodão Bt e em diluições do tecido liofilizado desses hospedeiros. Os resultados indicam que *S. eridania* apresenta baixa suscetibilidade às toxinas Cry1Ac e Cry1Fa, e alta à toxina Cry2Aa. As concentrações subletais da toxina Cry1Ac purificada, em folhas de soja Bt e em tecido liofilizado produziram aumento significativo na biomassa larval da população. Esses experimentos reúnem três evidências independentes de que a toxina Cry1Ac pode induzir o fenômeno de hormese em *S. eridania*. Em conjunto, os resultados sugerem que populações desta lagarta poderão aumentar em soja e algodão Bt caso adequadas estratégias de manejo integrado não sejam adotadas. Futuros estudos deverão investigar as possíveis consequências de exposições subletais a toxinas Bt durante desenvolvimento larval no histórico de vida de *S. eridania* para interpretar o balanço destas no controle populacional de insetos pragas.

ABSTRACT

RABELO, Marcelo Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016.
Toxicity lethal and sublethal of Bt toxins and plants to *Spodoptera eridania*.
Advisor: Eliseu José Guedes Pereira. Coadvisor: Oscar Fernando Santos Amaya

The increasing population levels and damage by the Southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae), on Bt soybean and cotton crops might be related to sublethal effects of Bt toxins produced by these plants. In order to test this hypothesis, we determine susceptibility of *S. eridania* larvae to Cry1Ac, Cry1Fa and Cry2Aa toxins. We also investigated larval response to sublethal concentrations of Cry1Ac measuring larval growth development using the purified toxin, as well as Cry1Ac soybean and cotton leaves, and dilution of lyophilized tissue from these Bt plants. Our results indicate that *S. eridania* have low susceptibility to Cry1Ac and Cry1Fa toxins, and high susceptibility to Cry2Aa toxin. Sublethal concentrations of Cry1Ac purified toxin, Bt soybean leaves and lyophilized tissue significantly increased the larval biomass. These experiments provide three independent lines of evidence that the Cry1Ac toxin can induce hormesis-like phenomenon in *S. eridania*. Taken together, these results suggest that population levels of this species could increase in Bt soybean and cotton if proper strategies integrated pest management are not adopted. Future studies should investigate the potential consequences of sublethal exposure to Bt toxins during larval development on the life history of *S. eridania* to interpret the overall effects in controlling insect pest populations.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1.	Origem e manutenção de <i>S. eridania</i>	4
2.2.	Cultivo das plantas usadas nos experimentos	4
2.3.	Bioensaios com toxinas	5
2.3.1.	Susceptibilidade de <i>S. eridania</i> às toxinas Cry1Ac, Cry1Fa e Cry2Aa	5
2.3.1.	Resposta a concentrações subletais de Cry1Ac em dieta artificial	7
2.4.	Bioensaios com tecidos foliares de algodão e soja	7
2.4.1.	Folhas frescas	7
2.4.2.	Tecido foliar liofilizado	8
2.5.	Níveis de proteína, lipoxigenase e inibidor de proteases em folhas de soja	9
2.5.1.	Análise de lipoxigenases e determinação da concentração de proteína	10
2.5.2.	Determinação de inibidores de proteases	11
2.6.	Análises dos dados	12
3.	RESULTADOS	13
3.1.	Bioensaios com toxina	13
3.1.1.	Susceptibilidade de <i>S. eridania</i> às toxinas Cry1Ac, Cry1Fa e Cry2Aa	13
3.1.2.	Resposta a concentrações subletais de Cry1Ac em dieta artificial	13
3.2.	Bioensaios com tecidos foliares de algodão e soja	14
3.2.1.	Folhas frescas	14
3.2.2.	Tecido foliar liofilizado	15
3.3.	Níveis de proteína, lipoxigenase e inibidor de proteases em folhas de soja	15
4.	DISCUSSÃO	16
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
6.	REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

A adoção de plantas transgênicas que expressam toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* no manejo de pragas trouxe consideráveis benefícios para a agricultura mundial, esses incluem principalmente a redução no uso de inseticidas convencionais no controle de lagartas desfolhadoras [1-3]. Salvo alguns casos de resistência [4-7], as culturas Bt tem sido utilizadas com sucesso no controle de pragas-alvo. Contudo, existem algumas dúvidas sobre o possível impacto que estas culturas podem causar sobre fitófagos de menor suscetibilidade a toxinas Bt, especialmente em culturas como algodão e soja, onde várias espécies de lepidópteros ingerem constantemente essas toxinas em concentrações muitas vezes subletais [8, 9].

Atualmente em soja e algodão o controle de lagartas desfolhadoras está sendo realizado por meio de plantas transgênicas que produzem as toxinas Cry1Ac, Cry1Fa e Cry2Ab. A eficácia de controle conferida por esses cultivares Bt sobre alguns desfolhadores pragas-chave de soja e algodão, tem evidenciado a importância econômica de outras espécies como *Spodoptera eridania*. Esta espécie antes era mencionada como praga secundária e hoje citada entre as lagartas desfolhadoras capazes de ocasionar perdas econômicas nessas culturas Bt [8-10]. Este surgimento de pragas secundárias requer maior uso de inseticidas, colocando em risco a viabilidade econômica dos cultivos de algodão e soja Bt.

O surgimento de *S. eridania* como espécie de importância econômica em cultivos de soja e algodão Bt pode estar associado a quatro fatores: i) a baixa suscetibilidade que *S. eridania* apresenta às toxinas Bt presentes nos cultivares transgênicos [11]; (ii) a diminuição da mortalidade dessa praga em condições de

campo devido à introdução de soja e algodão Bt que promoveu redução na aplicação de inseticidas de amplo espectro antes usados no controle das pragas chaves [12, 13]; (iii) menor competição interespecífica pelos recursos em hospedeiros que expressam toxinas Bt [14]; iv) as concentrações não letais de toxinas Bt produzidas por essas plantas poderiam estar estimulando o crescimento populacional de *S. eridania* [8]. Essas suposições aliadas a alta capacidade de adaptação a diferentes habitats e a característica polífaga da espécie [15] podem estar promovendo a mudança de status de praga secundária para praga chave.

As consequências da exposição de insetos a concentrações subletais de toxinas Bt ainda não são conclusivas [16, 17]. Experimentos fornecendo toxinas Bt a insetos diretamente em plantas e em dieta artificial tem mostrado respostas negativas [18], positivas [19] e sem efeito algum [16]. Em *S. eridania* os trabalhos com toxinas Bt tem se concentrado em verificar apenas os possíveis efeitos negativos decorrentes dessa interação, ignorando os possíveis efeitos benéficos, como foi recentemente sugerido para *S. eridania* em cultivos de soja Bt [8].

Desta forma, conhecer a resposta de *S. eridania* as concentrações subletais produzidas pelas plantas de soja e algodão Bt se torna de grande importância para mitigar e delinear estratégias de manejo desta praga em culturas Bt. Na obtenção destas informações é importante considerar que o impacto no desenvolvimento dos insetos fitófagos pode não ser unicamente mediado pela ação das toxinas Bt, mas também, pela alteração da qualidade da planta, gerada por modificações causadas pela inserção do transgene [8, 20]. Alterações desse tipo já foram verificadas em milho Bt, as modificações genéticas indicam uma alteração nos níveis de aminoácidos, tornando a planta mais nutritiva para *Rhopalosiphum maidis*, explicando parcialmente o aumento da performance deste inseto [20].

Em função disso, avaliar o equilíbrio de alguns componentes de defesa e nutricionais entre plantas Bt e não-Bt, tais como atividade de lipoxigenases, inibidores de enzimas digestivas, teor de proteína, é importante para discernir o efeito das toxinas sobre a praga. Em soja a necessidade desse tipo de investigação é justificada pelo fato da variedade Bt não possuir uma isolinha não-Bt, sendo as comparações realizadas com uma variedade não-Bt de ciclo e desenvolvimento semelhante.

Neste contexto, foi investigado a suscetibilidade de *S. eridania* às toxinas Cry1Ac, Cry1Fa e Cry2Aa e produzidas pelas plantas de soja e algodão Bt. Além disto, estudamos a resposta de *S. eridania* à exposição a concentrações subletais da toxina Cry1Ac e algumas características de história de vida de larvas alimentadas em folhas de soja e algodão Bt e em diluições do tecido liofilizado desses hospedeiros. Finalmente, foram comparados os níveis de inibidores de proteases, atividade específica de lipoxigenases e a concentração de proteínas na planta de soja Bt e não-Bt. Os resultados indicam que a toxina Cry1Ac em concentrações subletais tem um efeito estimulatório na biomassa de larvas de *S. eridania*, o que reforçaria a hipótese que algumas toxinas de *B. thuringiensis* em concentrações subletais podem estimular o crescimento populacional de pragas não-alvo ou que perderam a suscetibilidade a estas toxinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem e manutenção de *S. eridania*

Em dezembro de 2014, posturas e larvas de *S. eridania* foram coletadas no município de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) em campos de soja e feijão, respectivamente. Os insetos coletados foram transferidos para bandejas, acondicionados em caixa de isopor e encaminhados ao laboratório.

Neonatas provenientes das posturas ou as larvas coletadas do campo foram individualizadas em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP) e alimentadas com dieta artificial a base de feijão [21], até a pupação. Aproximadamente 100 pupas foram acondicionadas em gaiolas de PVC (40 cm de altura x 30 cm de diâmetro) para acasalamento dos adultos. Estes foram alimentados com solução a base de 10% de açúcar e 5% de ácido ascórbico embebido em algodão. As gaiolas foram revestidas internamente com papel sulfite para proporcionar um substrato de oviposição. Os ovos foram coletados a cada dois dias, por um período de 10 dias após início da oviposição, e armazenados em sacolas plásticas até a eclosão. Um grande grupo de neonatas (mais 1000) foi transferido para dieta artificial em copos plásticos de 500 ml até o 2º instar e depois os insetos foram individualizados em bandejas de PVC conforme relatado acima. As criações foram mantidas em ambiente controlado de temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14L:10E.

2.2. Cultivo das plantas usadas nos experimentos

Nos experimentos foram utilizados os cultivares transgênicos de soja M8330IPRO (MON87701) e MSOY8866 (Monsoy LTDA, São Paulo, SP, Brasil).

Ambas possuem tolerância ao herbicida glifosato, porém, somente o cultivar M8330IPRO produz a toxina Cry1Ac com ação inseticida contra algumas lagartas na cultura da soja, principalmente *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*. O algodão transgênico utilizado foi o evento piramidado MON 15985 × MON 88913 (Delta Opal) que produz as toxinas Cry1Ac e Cry2Ab e sua isolinha (Delta Opal) não-Bt (D&PL Brasil LTDA, Uberlândia, MG, Brasil). O plantio de soja e algodão Bt e seus controles não-Bt foi realizado em 29 de novembro de 2014. A soja foi semeada em campo e o algodão em vasos de 20 litros, utilizando uma mistura de solo e substrato comercial Plantmax na proporção (2:1). A cada 7 dias, um novo plantio foi realizado para que as folhas utilizadas nos experimentos tivessem sempre a mesma idade. Os cultivos foram conduzidos de acordo com as práticas recomendadas para a região [22]. As plantas foram irrigadas diariamente e fertilizadas por ocasião do plantio e em cobertura com 100 kg/ha de NPK (4-14-8). O controle de plantas daninhas que foi realizado de forma manual e o controle de pragas foi realizado sem o uso de pesticidas.

2.3. Bioensaios com toxinas

2.3.1. Susceptibilidade de *S. eridania* às toxinas Cry1Ac, Cry1Fa e Cry2Aa

As toxinas Cry1Ac, Cry1Fa, Cry2Aa, utilizadas nos bioensaios foram obtidas do laboratório da Dra. Marinne P. Carey (Case Western Reserve University, OH). CryAc e Cry1Fa foram ativadas com tripsina e purificada em HPLC, enquanto Cry2Aa foi usada na forma de protoxina, sendo todas elas fornecidas na forma liofilizada. Estoques dessas toxinas foram mantidos a -80 °C, sendo usado tampão de 50 mM de CAPS; pH = 11; 2 mM de DTT para Cry1 e tampão 25 mM CAPS;

pH = 10,3 com 1Mm benzimidina – HCl, 0,1 mM EDTA e 0,2 mM DTT para Cry2Aa visando solubilização das proteínas antes dos bioensaios. A susceptibilidade das neonatas foi determinada por exposição a várias concentrações das toxinas[23]. Os bioensaios foram realizados em bandejas de 128 células (cada célula com 16 mm de diâmetro, 16 mm de profundidade; CD International, Pitman, NJ). Um mililitro de dieta foi disposto dentro de cada célula, deixando-a solidificar à temperatura ambiente por 30 min. Para estabelecer curvas concentração-resposta foram utilizadas sete concentrações da toxina purificada mais o controle. As diluições das toxinas foram preparadas em Triton-X 100 a 0,1% para atingir distribuição uniforme da solução sobre a superfície da dieta. Cada célula foi tratada superficialmente com 30 μ L da concentração indicada. O controle consistiu em células tratadas com 30 μ L de Triton-X 100 a 0,1%.

As células tratadas foram deixadas secar à temperatura ambiente por 60 min, para posteriormente, com ajuda de um pincel fino colocar uma neonata (> 24 h de eclosão) dentro de cada célula. As células foram cobertas com tampas ventiladas (CD International, Pitman, NJ). A mortalidade foi avaliada aos sete dias de exposição. As larvas que não conseguiram passar ao segundo instar de desenvolvimento ou seu peso foi inferior a 0,1 mg foram consideradas mortas [23]. O peso das larvas sobreviventes foi registrado para determinar a porcentagem de inibição de crescimento em relação às larvas do tratamento controle. As bandejas dos bioensaios foram mantidas em câmara de crescimento com escotofase de 24 h, temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$. Para cada toxina, os bioensaios foram repetidos de duas a quatro vezes em datas diferentes, sendo usadas 16 neonatas em cada repetição.

2.3.1. Resposta a concentrações subletais de Cry1Ac em dieta artificial

Para determinar possíveis efeitos subletais de Cry1Ac no desempenho larval de *S. eridania*, realizamos bioensaios concentração-resposta seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente nesta dissertação [23]. Baseando-se nos resultados do experimento anterior (suscetibilidade de *S. eridania* à Cry1Ac), testamos as concentrações de 2, 3, 6, 10, 50, 625, 2500 e 10000 ng/cm² de toxina Cry1Ac purificada. Para cada concentração o ensaio foi repetido de duas a quatro vezes, em datas diferentes, usando 16 neonatas em cada repetição. Os parâmetros estimados foram os mesmos descritos no experimento de suscetibilidade [23].

2.4. Bioensaios com tecidos foliares de algodão e soja

2.4.1. Folhas frescas

Os experimentos foram conduzidos a partir de outubro de 2015 usando plantas de soja e algodão Bt e seus controles não-Bt. As folhas de soja foram recolhidas no estágio V3 e V4 [24] e de algodão, até a estágio V5 [25]. Para este experimento foram utilizadas bandejas de PVC com 16 cavidades (Advento do Brasil, Diadema, SP), sendo que para cada cavidade foram transferidas duas neonatas que eram alimentadas com as folhas de acordo com o tratamento. As folhas foram trocadas diariamente até a pupação das larvas. As bandejas foram mantidas em sala de criação climatizada (Temperatura $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo 14:10 h, L:E).

Em cada hospedeiro (soja ou algodão), as variedades Bt e não-Bt foram comparadas em termos de biomassa larval e sobrevivência aos 7, 11 e 15 dias de idade. A biomassa de pupas e tempo de desenvolvimento de neonata até pupa

também foram registrados. O experimento com soja foi composto por 12 repetições por variedade (28 larvas/repetição) e o experimento com algodão foi composto por 64 repetições por variedade (3 larvas/repetição).

2.4.2. Tecido foliar liofilizado

Para verificar os possíveis efeitos subletais da soja Cry1Ac e a adequabilidade do algodão Cry1Ac + Cry2Ab ao conceito de alta dose (i.e., efeito inseticida de Cry2Ab, dado que Cry1Ac não apresentou letalidade a *S. eridania*), foram conduzidos bioensaios com tecido liofilizado de ambos os hospedeiros. O algodão se adequaria ao conceito de alta dose, caso mais de 99% das larvas susceptíveis morresse ao se alimentarem de dieta contendo o tecido vegetal do hospedeiro Bt diluído em 25 vezes [26].

As folhas de soja foram recolhidas no estágio V3 e V4 [24] e de algodão, até o estágio V5 [25]. As folhas foram lavadas e o pecíolo foi descartado. O tecido foi pesado (peso fresco) e armazenado a -80 °C. As folhas já congeladas foram liofilizadas até atingirem peso constante (peso seco). O tecido liofilizado foi triturado em liquidificador e peneirado para obtenção de um pó fino. Os bioensaios foram realizados pela adição deste pó liofilizado à dieta artificial. Para cada hospedeiro e variedade o tecido em pó foi adicionado em dieta artificial até atingir as diluições de 25, 50, 100, 200 e 400 vezes de tecido fresco em dieta artificial.

O tecido em pó foi adicionado à dieta a temperatura inferior a 55 °C. O volume de água perdido durante o processo de liofilização foi reestabelecido, em quantidade equivalente à concentração de pó liofilizado utilizado em cada diluição. Esse processo impediu que tratamentos com maior ou menor quantidade de tecido liofilizado tivessem umidade diferente. O tecido em pó, água e dieta foram

homogeneizados com auxílio de agitador do tipo vortex e a mistura resultante foi vertida em placas de Petri. Logo que resfriada foram recortados discos de 2 cm de diâmetro e transferidos para potes plásticos de 200 ml. Neonatas de *S. eridania* foram individualmente transferidas para cada pote usando um pincel fino. Cada diluição de tecido liofilizado foi composta por 4 repetições (10 neonatas/repetição). O ensaio foi mantido em sala de criação com temperatura de 27 ± 2 °C, 70% de umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo 14:10 h, L:E. A sobrevivência e biomassa foram avaliados aos 7 dias após a inoculação.

2.5. Níveis de proteína, lipoxigenase e inibidor de proteases em folhas de soja

As análises bioquímicas das folhas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da UFV. Para as análises foram usadas plantas de soja Bt e não-Bt cultivadas em vasos de 8 litros e mantidos conforme já descrito (ver seção de plantio e descrição de plantas usadas nos experimentos). Ao atingirem o estágio V4 [24], plantas de cada variedade de soja foram isoladas e infestadas com larvas de *S. eridania* de 4º instar. As larvas foram privadas de alimento por um período de 12 h anterior a montagem do experimento. Os insetos foram confinados em sacos de organza no primeiro trifólio completamente expandido, contando a partir do ápice da planta. As larvas permaneceram em contato com a planta durante a noite, por um período de 12 h, tempo suficiente para que causassem herbivoria significativa nas folhas.

As folhas injuriadas foram removidas, acondicionadas em pacotes de alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, em seguida os pacotes foram armazenados em ultra freezer (-80 °C). O controle foi obtido de folhas de plantas de soja Bt e não-Bt, porém não infestadas. Para análise, as folhas congeladas

foram imersas em nitrogênio líquido e maceradas com auxílio de almofariz e pistilo até obtenção de pó fino.

2.5.1. Análise de lipoxigenases e determinação da concentração de proteína

A atividade de lipoxigenases (LOX) sobre o ácido linoleico foi determinada pela formação do sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido (produto da reação), através do aumento da absorbância a 234 nm [27] Usando 0,2 mg /mL de albumina de soro bovino (BSA) como padrão, obteve-se a concentração de proteína do extrato foliar das variedades de soja. O substrato utilizado foi obtido a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, preparada com ácido linoleico. Adicionou-se ao pó vegetal o tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 6,0, na proporção de 1:3 (p/v) (1 g de folha:3 mL de tampão). Em seguida, o homogenado foi centrifugado a 18000 g, por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade de lipoxigenases e da concentração de proteínas.

A mistura de reação foi constituída de 1000 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM; pH 6,5, 20 µL do extrato vegetal e 10 µL de linoleato de sódio 10 mM. A absorbância foi obtida a cada 30 s, a 234 nm, pelo período de 2,5min. Para o cálculo da velocidade foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 25000 M⁻¹cm⁻¹ para o produto formado. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 2 x 2, sendo eles soja Bt e não-Bt, danificadas ou sem danos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições (1 planta/repetição), o valor de absorbância de cada repetição foi obtido pela média dos valores obtidos em três análises.

2.5.2. Determinação de inibidores de proteases

Para identificar possíveis diferenças nos níveis de inibidores de proteases, o extrato bruto de folhas de soja foi analisado utilizando tripsina bovina. Adicionou-se ao pó vegetal de folhas de soja o tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM, na proporção de 1:3 (p/v) (1 g de folha:3 mL de tampão). O homogenado foi centrifugado a 17200 g por 30 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado para a determinação dos inibidores de proteases.

A atividade tríptica, na presença de inibidores, foi realizada da seguinte forma: i) para o teste de inibição foram adicionados em um microtubo de 2 mL, 50 µL do extrato vegetal, 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂, e 50 µL da solução de tripsina $4,7 \times 10^{-5}$ M; ii) para o controle da enzima, foram adicionados em outro microtubo de 2 mL, 550 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl₂ e 50 µL da solução de tripsina $4,7 \times 10^{-5}$ M; iii) para o branco, utilizou-se 1000 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8,2, contendo 20 mM CaCl₂ e 500 µL de L-BApNA.

A absorbância das soluções foi determinada a 410 nm durante 2,5 min de reação. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 2 x 2, sendo eles soja Bt e não-Bt, danificadas ou sem danos. Cada tratamento foi composto por cinco repetições (1 planta/repetição), o valor de cada repetição foi obtido pela média dos valores obtidos em três análises.

2.6. Análises dos dados

Nos biensaíais, o peso larval foi transformado em porcentagem de inibição de crescimento em relação ao controle. Os dados de mortalidade e inibição de crescimento foram analisados por análise probit [28] usando POLO-PC [29].

Os valores de biomassa, sobrevivência aos 7, 11 e 15 dias e o tempo de desenvolvimento larval de *S. eridania* em folhas de soja e algodão Bt e não-Bt foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste F ao nível de 5% de significância. A biomassa e sobrevivência de larvas que se alimentaram de dieta contendo diluições do tecido liofilizado de plantas foram analisados da mesma forma descrita anteriormente. O teor de inibidores de proteases e atividade de lipoxigenase foram analisados em arranjo fatorial (2 x 2) (ver metodologia item 2.5); dados que não atenderam a pressuposições da ANOVA foram transformados em log de x. Os dados de concentração de proteínas em plantas de soja também foram submetidos à análise de variância e comparada pelo teste F ao nível de 5%. Os testes foram realizados utilizando o programa Sistema de Análise de Variância Para Dados Balanceados (SISVAR).

3. RESULTADOS

3.1. Bioensaios com toxina

3.1.1. Susceptibilidade de *S. eridania* às toxinas Cry1Ac, Cry1Fa e Cry2Aa

Como indicado por valores de P superiores a 0,05, o modelo de próbite se ajustou satisfatoriamente aos resultados da grande maioria dos bioensaios, permitindo estimativas dos parâmetros que descrevem a susceptibilidade da população às proteínas de Bt testadas (Tabela 1). Tanto mortalidade quanto inibição de crescimento mostraram que *S. eridania* possui alta suscetibilidade a Cry2Aa ($CL_{50} = 11$ e $CE_{50} = 0,9$ ng.cm⁻²) e baixa suscetibilidade às toxinas Cry1Ac e Cry1Fa. A concentração máxima de Cry1Ac testada (10000 ng.cm⁻²) não causou mortalidade ou inibição de crescimento e a concentração máxima de Cry1Fa (3000 ng.cm⁻²) causou apenas inibição de crescimento com alto valor de CE_{50} (253,7 ng.cm⁻²).

3.1.2. Resposta a concentrações subletais de Cry1Ac em dieta artificial

As concentrações testadas de Cry1Ac foram 2, 3, 6, 10, 39, 50, 625, 2500 e 10000 ng.cm⁻², as quais não causam efeito letal em *S. eridania* como indicado nos experimentos de susceptibilidade (Tabela 1). Surpreendentemente, as concentrações inferiores a 39 ng.cm⁻² de toxina incrementaram a biomassa larval (Figura 1). A máxima diferença na biomassa entre larvas tratadas com Cry1Ac e não tratadas ocorreu na concentração de 10 ng.cm⁻² e foi de 37%. A partir da concentração de 50 ng.cm⁻² ocorreu redução significativa na biomassa larval até atingir 62% de inibição de crescimento na máxima concentração testada (10000

ng.cm⁻²). A sobrevivência em todas as concentrações testadas foi superior a 90%, sendo semelhante ao controle (sem exposição a toxina).

3.2. Bioensaios com tecidos foliares de algodão e soja

3.2.1. Folhas frescas

Observou-se que a biomassa larval de *S. eridania* aos sete dias foi menor nas larvas alimentadas com algodão Bt em comparação com as larvas mantidas em algodão não-Bt ($F_{1,45} = 80,9$; $P < 0,01$) (Figura 2a). Semelhantemente, o algodão Bt também teve efeito significativo na mortalidade larval ($F_{1,62} = 101,5$; $P < 0,01$), sendo que aos sete dias causou mortalidade de 86% e antes dos 11 dias provocou a morte de todos os indivíduos (Figura 3).

Contrariamente ao efeito de inibição e mortalidade causado pelo algodão Bt, a soja Bt causou aumento na biomassa larval dos indivíduos em comparação com a soja não-Bt (Figura 2b). Essa diferença de biomassa foi significativa para larvas de sete ($F_{1,22} = 18,6$; $P < 0,01$), onze ($F_{1,22} = 48,8$; $P < 0,01$) e quinze ($F_{1,22} = 7,68$; $P = 0,01$) dias. Em todas essas idades a sobrevivência foi maior de 65% ($P > 0,05$). Entretanto, a duração do período de neonata até pupa foi, em média, dois dias menor em insetos que se alimentaram de soja Bt comparado com aqueles que se alimentaram de soja não-Bt ($F_{1,26} = 15,4$; $P < 0,01$). Contudo, a diferença no ganho de massa larval não se refletiu na biomassa de pupas ($192,01 \pm 7,44$ mg) ($F_{1,10} = 0,52$; $P > 0,05$).

3.2.2. Tecido foliar liofilizado

O tecido foliar algodão produzindo Cry1Ac + Cry2Ab diluído em 25, 50, 100, 200 e 400 vezes não causou mortalidade significativa em larvas de *S. eridania* aos sete dias de exposição ($P > 0,05$). Entretanto, mesmo que a mortalidade não tenha sido alta ($< 20\%$), as lagartas sobreviventes tiveram alta inibição de crescimento (Figura 4a). Interessantemente, todas as diluições do tecido foliar de soja produzindo Cry1Ac causaram aumento significativo na biomassa larval em comparação com a soja não-Bt, usada como controle (Figura 4b). Semelhante ao observado no bioensaio com tecido liofilizado de algodão, não houve diferença na sobrevivência de larvas em dieta com tecido liofilizado de soja Bt e não-Bt ($P > 0,05$), sendo que em todos os testes essa sobrevivência foi superior a 80%.

3.3. Níveis de proteína, lipoxigenase e inibidor de proteases em folhas de soja

As análises bioquímicas de compostos de defesa à herbivoria e teor proteico de plantas de soja indicaram que não existe interação entre os fatores variedade de soja e presença ou não de dano ($P > 0,05$), desta forma, os tratamentos foram analisados de forma independente. A atividade específica de lipoxigenases e o teor de inibidores de proteases não diferiu entre folhas de soja Bt e soja não-Bt ($P > 0,05$). Entretanto, após 12 h de herbivoria por larvas de *S. eridania*, ambas as variedades de soja Bt e não-Bt responderam igualmente, aumentando atividade de lipoxigenases ($F_{1,16} = 13,5$; $P = 0,02$) e o nível de inibidores de proteases ($F_{1,16} = 7,13$; $P = 0,01$) (Figura 5a,b). De forma semelhante, não foi observado diferença na concentração de proteínas entre plantas de soja Bt e soja não-Bt e em nenhuma variedade houve estímulo pós herbivoria ($F_{1,19} = 0,09$; $P = 0,095$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que *S. eridania* possui baixa suscetibilidade às toxinas Cry1Ac e Cry1Fa, o que provavelmente pode estar associado ao tipo e número de receptores presentes na membrana do intestino médio das larvas dessa espécie ou à sua baixa afinidade às toxinas Bt da classe Cry1. A baixa toxicidade de Cry1Ac para espécies do gênero *Spodoptera* (*S. eridnia*, *S. cosmioides*, *S. frugiperda*) já foi reportado em experimentos realizados com toxinas em dieta artificial [9, 30] e, também, em seleção de cepas de Bt para controle de lagartas pertencentes a esse gênero [11].

É bem documentado que a ligação entre toxinas Bt e seus receptores no intestino larval é específica e pode variar dependendo das toxinas e do inseto [31]. Assim, já que a toxina Cry2Aa não compartilha os mesmos sítios de ligação com as toxinas Cry1A ou Cry1F em insetos alvo [31], isso poderia explicar em parte a maior inibição e mortalidade obtida com a toxina Cry2Aa em detrimento à toxicidade das demais toxinas. Dentre as toxinas estudadas, apenas as Cry2A (i.e., Cry2Aa e Cry2Ab) apresentaram toxicidade a *S. eridania*. Cry2A foi capaz de causar mortalidade e inibição de crescimento nas concentrações testadas, fato positivo na redução dos danos por essas lagartas desfolhadoras, mas que requer cuidado ao desenvolver cultivares transgênicas com tais toxinas para o controle dessa praga. A curva de inibição de crescimento (Tabela 1) para a toxina Cry2Aa apresentou maior inclinação (1.15 ± 0.18) em comparação a toxina Cry1F (0.87 ± 0.08). Valores altos de inclinação da curva indicam que pequenas variações na concentração da toxina promovem grandes variações na inibição do crescimento da praga alvo, revelando maior homogeneidade de resposta do inseto à toxina e

requerendo sua estável expressão nos tecidos da planta Bt para controle eficaz da praga [32].

As menores concentrações testadas da toxina Cry1Ac causaram uma resposta bifásica em larvas de *S. eridania*, que foi caracterizado por um aumento gradativo na biomassa larval até um pico em 39 ng.cm⁻², e depois inibitório em concentrações superiores (Figura 1). Essa resposta de estímulo e de inibição da biomassa na população em função das concentrações testadas é relacionado ao fenômeno de hormese, o qual é caracterizado por um efeito estimulatório em baixas concentrações e inibitório em altas concentrações de um determinado composto [33-35].

Interessantemente, esse aumento de biomassa larval também foi evidenciado quando a população de *S. eridania* foi alimentada com folhas de soja Cry1Ac. Nesses experimentos, a biomassa larval foi significativamente maior aos 7, 11 e 15 dias em relação com as mantidas na soja não-Bt. Esse resultado indica que a toxina Cry1Ac produz um efeito estimulatório nessa população de *S. eridania*. Além disso, nos ensaios com diluições do tecido de soja Cry1Ac liofilizado todas as concentrações também causaram aumento significativo da biomassa larval em relação ao controle. Contrariamente a esses resultados, existe outro estudo indicando inibição da biomassa larval em *S. eridania* causada por soja Cry1Ac [36]. Contudo, nossos resultados mostraram em três experimentos independentes (bioensaios com toxina purificada, folhas de soja e tecido de soja Cry1Ac liofilizado) que a toxina Cry1Ac produz um efeito estimulatório na biomassa larval nessa população de *S. eridania*. Resultados semelhantes foram reportados em uma população de *Plutella xylostella*, que desenvolveu não só resistência a Cry1Ac mas

também a capacidade de utilizar a própria toxina como componente nutricional [19].

Esse efeito causado na biomassa da população de *S. eridania*, pode estar associado com um acúmulo de energia impulsionado por um desafio tóxico [33, 37]. Essa realocação de recursos é uma teoria já estabelecida, e infere que o estresse pelo qual o indivíduo é exposto gera um desbalanço fisiológico e energético favorecendo uma característica em detrimento de outra [38, 39]. Neste caso, as consequências de aumento da biomassa larval induzida por Cry1Ac em *S. eridania* pode refletir em outras fases de desenvolvimento do inseto, por exemplo, em *S. frugiperda* que aumento na biomassa larval induzido por Cry1Fa desencadeou em aumento no desempenho [40]. Embora na população de *S. eridania* usada neste estudo o aumento na biomassa larval não se refletiu em aumento da biomassa pupal, a hipótese de que possa existir consequências em outras fases do inseto não pode ser descartada, já que existem evidências em outras espécies, onde tem se registrado semelhança na biomassa pupal, mas, diminuição e/ou aumento no desempenho reprodutivo ao final do ciclo de vida [6]. Portanto, é necessária a continuação de estudos que descrevam se no balanço final existe um efeito positivo no desempenho reprodutivo causado pela toxina Cry1Ac em *S. eridania*.

É de certa forma esperado que o fenômeno de hormese associado às toxinas Bt não seja observado com mais frequência porque os bioensaios para verificar a suscetibilidade de espécies de lepidópteros-praga foquem mais no efeito negativo associado ao uso de altas concentrações de toxina [41]. Historicamente, as curvas de dose-resposta foram assumidas como sendo inclinações crescentes, a partir de um ponto que cause o mínimo de danos às espécies estudadas [42]. Alguns estudos [43-45] à semelhança do nosso, obtiveram resultados que indicam que os testes de

toxicidade devem ser feitos explorando as curvas dose-resposta de forma bidirecional, usando tanto baixas quanto altas doses.

Ao testar a adequabilidade do algodão Bt Cry1Ac + Cry2Ab ao conceito de alta dose para *S. eridania*, se evidenciou que o evento não atende esse critério, como indicado pela sobrevivência larval registrada nos bioensaios com tecido liofilizado diluído 25 vezes, a qual foi superior 1%, limiar usado para determinar o atendimento dessa condição [26]. Este resultado somado à baixa suscetibilidade de *S. eridania* a Cry1Ac, sugere que se deve dar atenção especial à constante exposição desta praga a Cry1Ac e Cry2Ab, exposição esta que poder estar favorecendo surtos populacionais, como tem sido relatado por alguns agricultores de soja dos estados de Mato Grosso e Paraná, e resistência cruzada a outras toxinas Bt, como sugerido em estudos recentes [5, 46, 47].

Nossos experimentos com algodão foram realizados com o uso de folhas provenientes do estágio vegetativo da planta, sendo que nessa condição as lagartas não sobreviveram. Entretanto, em algodoeiro existe uma redução na expressão das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab₂, que ocorre na fase reprodutiva e na senescência da planta [48]. Se larvas de *S. eridania*, assim como ocorre com *S. frugiperda*, escolherem alimentar em estruturas da planta de algodão com menor concentração de toxina Bt, tais como botões florais, flores e maçãs, tal escolha pode garantir sucesso no desenvolvimento larval [49]. Se porventura, larvas de *S. eridania* sobreviverem em estruturas reprodutivas do algodoeiro que já possui expressão de toxina comprometida pela idade da planta, provavelmente existirá uma exposição que pode levar a um efeito subletal da toxina Cry2Ab nas lagartas. Com o passar das gerações, as populações expostas a concentrações subletais presentes em seus hospedeiros podem diminuir a suscetibilidade a Cry2Ab e outras toxinas do mesmo

grupo. Alteração na expressão de toxina já foi relatado prejudicar o controle de *Helicoverpa armigera* em algodão Cry1Ac, o que levou a diminuição da sensibilidade de algumas populações a toxinas presentes em seu hospedeiro [50, 51].

A fim de investigar se o aumento na biomassa larval de *S. eridania* em soja Bt é resultado de diferenças na composição da planta, nós investigamos algumas características defensivas à fitofagia e nutricionais às larvas, antes e após a herbivoria. Como resposta, observamos que não existe diferença em atividade de lipoxigenases (LOX), inibidores de proteases (IPs) e proteínas entre variedades de soja Bt ou não-Bt e que atividade de LOX e o teor de IPs é induzido pela herbivoria. Dessa forma, essas variáveis não constituem uma potencial explicação para a diferença na biomassa larval de *S. eridania*, encontrada em nosso estudo, o que nos leva a pensar que a toxina Cry1Ac é a responsável pelo aumento da biomassa larval na população de *S. eridania*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que documenta que a soja Bt Cry1Ac desenvolvida para controle de lepidópteros desfolhadores pode causar um efeito estimulatório no desempenho de outra praga não alvo desta cultivar Bt. Além disso, mostramos que o algodão transgênico Cry1Ac + Cry2Ab não atinge o critério de alta dose para *S. eridania*, devendo isso ser levado em consideração no manejo dessa praga emergente em algodão. Os resultados desta pesquisa alertam para o aumento da importância de *S. eridania* nos cultivos de soja e algodão Bt, devido ser uma espécie de importância econômica ascendente e com alto potencial destrutivo e que não é controlada eficientemente pela soja Bt Cry1Ac e algodão Bt Cry1Ac + Cry2Ab. Um dos grandes desafios será a implantação de estratégias de manejo desta espécie no Brasil, considerando-se o sistema intensivo de produção, onde se cultiva soja Bt associado a outros cultivos Bt na mesma região. Novas estratégias de manejo integrado de *S. eridania* devem ser adotadas afim de reduzir suas populações nesses cultivos e garantir a durabilidade da tecnologia Bt. Os resultados desta pesquisa oferecem ainda oportunidades para a realização de mais estudos sobre efeito subletal de toxinas Bt em organismos não alvo, sobretudo insetos com potencial de se transformarem em pragas-chaves.

6. REFERÊNCIAS

1. James C: **Global review of commercialized transgenic crops: 1998**, vol. 94: Citeseer; 1998.
2. Cattaneo MG, Yafuso C, Schmidt C, Huang C-y, Rahman M, Olson C, Ellers-Kirk C, Orr BJ, Marsh SE, Antilla L: **Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield**. Proceedings of the National Academy of Sciences 2006, **103**(20):7571-7576.
3. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P: **Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications**. Plant Biotechnology Journal 2011, **9**(3):283-300.
4. Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carriere Y: **Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data**. Journal of Economic Entomology 2009, **102**(6):2011-2025.
5. Tabashnik BE, Brevault T, Carriere Y: **Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres**. Nature Biotechnology 2013, **31**(6):510-521.
6. Santos-Amaya OF, Rodrigues JVC, Souza TC, Tavares CS, Campos SO, Guedes RNC, Pereira EJG: **Resistance to dual-gene Bt maize in Spodoptera frugiperda: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events**. Scientific Reports 2015, **5**.
7. Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, dos Santos AC, Omoto C: **Field-evolved resistance to Cry1F maize by Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil**. Crop Protection 2014, **64**:150-158.
8. Bortolotto OC, Silva GV, Bueno AdF, Pomaria AF, Martinelli S, Head GP, Carvalho RA, Barbosa GC: **Development and reproduction of Spodoptera eridania (Lepidoptera: Noctuidae) and its egg parasitoid Telenomus remus (Hymenoptera: Platygasteridae) on the genetically modified soybean (Bt) MON 87701 x MON 89788** Bulletin of Entomological Research 2015, **105**(2):259-260.
9. Bernardi O, Sorgatto RJ, Barbosa AD, Domingues FA, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C: **Low susceptibility of Spodoptera cosmioides, Spodoptera eridania and Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein**. Crop Protection 2014, **58**:33-40.
10. Oliveira de Freitas Bueno RC, Bueno AdF, Moscardi F, Postali Parra JR, Hoffmann-Campo CB: **Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for**

- pest management decisions.** Pest Management Science 2011, **67**(2):170-174.
11. dos Santos KB, Neves P, Meneguim AM, dos Santos RB, dos Santos WJ, Boas GV, Dumas V, Martins E, Praca LB, Queiroz P et al: **Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** Biological Control 2009, **50**(2):157-163.
 12. Krishna VV, Qaim M: **Bt cotton and sustainability of pesticide reductions in India.** Agricultural Systems 2012, **107**:47-55.
 13. Catarino R, Ceddia G, Areal FJ, Park J: **The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops.** Plant Biotechnology Journal 2015, **13**(5):601-612.
 14. Pemsil DE, Voelker M, Wu L, Waibel H: **Long-term impact of Bt cotton: findings from a case study in China using panel data.** International Journal of Agricultural Sustainability 2011, **9**(4):508-521.
 15. Delaney KJ: ***Nerium oleander* indirect leaf photosynthesis and light harvesting reductions after clipping injury or *Spodoptera eridania* herbivory: High sensitivity to injury.** Plant Science 2012, **185**:218-226.
 16. Zhao Y, Zhang S, Luo J-Y, Wang C-Y, Lv L-M, Wang X-P, Cui J-J, Lei C-L: **Bt proteins Cry1Ah and Cry2Ab do not affect cotton aphid *Aphis gossypii* and ladybeetle *Propylea japonica*.** Scientific Reports 2016, **6**.
 17. Devos Y, Álvarez-Alfageme F, Gennaro A, Mestdagh S: **Assessment of unanticipated unintended effects of genetically modified plants on non-target organisms: a controversy worthy of pursuit?** Journal of Applied Entomology 2016, **140**(1-2):1-10.
 18. Pessoa R, Rossi GD, Busoli AC: **Transgenic cotton-fed *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) affects the parasitoid *Encarsia desantisi viggiani* (Hymenoptera: Aphelinidae) development.** Neotropical Entomology 2016, **45**(1):102-106.
 19. Sayyed AH, Cerda H, Wright DJ: **Could Bt transgenic crops have nutritionally favourable effects on resistant insects?** Ecology Letters 2003, **6**(3):167-169.
 20. Faria CA, Waeckers FL, Pritchard J, Barrett DA, Turlings TCJ: **High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteran pests.** Plos One 2007, **2**(7).
 21. Greene G, Leppla N, Dickerson W: **Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium.** Journal of Economic Entomology 1976, **69**(4):487-488.

22. Ribeiro A: **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª. aproximação**: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais; 1999.
23. Marcon P, Young LJ, Steffey KL, Siegfried BD: **Baseline susceptibility of European corn borer (*Lepidoptera* : *Crambidae*) to *Bacillus thuringiensis* toxins**. *Journal of Economic Entomology* 1999, **92**(2):279-285.
24. Farias J, Nepomuceno A, Neumaier N: **Ecofisiologia da soja**. Embrapa Soja Circular Técnica 2007.
25. Marur CJ, Ruano O: **Escala do algodão**. Informe da Pesquisa, IAPAR 2002.
26. Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, dos Santos AC, Omoto C: **Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera*: *Noctuidae*) on TC1507 Bt maize in Brazil**. *Pest Management Science* 2016, **72**(5):974-979.
27. Chan HW-S: **Soya-bean lipoxygenase: an iron-containing dioxygenase**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 1973, **327**(1):32-35.
28. Finney D: **Probit Analysis 3rd edition Cambridge University Press London**. 1971.
29. LeOra Software. **POLO-PC: a user guide to probit or logit analysis**. Berkeley CLS: 2007.
30. Luttrell RG, Wan L, Knighten K: **Variation in susceptibility of noctuid (*Lepidoptera*) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis***. *Journal of Economic Entomology* 1999, **92**(1):21-32.
31. Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A: ***Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection**. *FEMS Microbiology Reviews* 2013, **37**(1):3-22.
32. Schmidt FB: **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera*: *Noctuidae*) a Lufenuron na cultura do milho**. Universidade de São Paulo.
33. Guedes RNC, Cutler GC: **Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management**. *Pest Management Science* 2014, **70**(5):690-697.
34. Calabrese EJ, Baldwin LA: **Hormesis: The dose-response revolution**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2003, **43**:175-197.
35. Calabrese EJ: **Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists**. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2008, **27**(7):1451-1474.

36. Bernardi O: **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701× MON 89788 no Brasil.** Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz; 2012.
37. Guedes RNC, Smaghe G, Stark JD, Desneux N: **Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs.** Annual Review of Entomology 2016, **61**: 43-62.
38. Jager T, Barsi A, Ducrot V: **Hormesis on life-history traits: is there such thing as a free lunch?** Ecotoxicology 2013, **22**(2):263-270.
39. Forbes VE: **Is hormesis an evolutionary expectation?** Functional Ecology 2000, **14**(1):12-24.
40. Campos SO: **Hormese induzida por Cry1Fa em Spodoptera frugiperda.** Universidade Federal de Viçosa, Dissertação 2015:20.
41. Kendig EL, Le HH, Belcher SM: **Defining hormesis: evaluation of a complex concentration response phenomenon.** International Journal of Toxicology 2010, **29**(3):235-246.
42. Cutler GC: **Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study.** Dose-Response 2013, **11**(2):dose-response. 12-008. Cutler.
43. Janmaat AF, Bergmann L, Ericsson J: **Effect of low levels of Bacillus thuringiensis exposure on the growth, food consumption and digestion efficiencies of Trichoplusia ni resistant and susceptible to Bt.** Journal of Invertebrate Pathology 2014, **119**:32-39.
44. Kullik SA, Sears MK, Schaafsma AW: **Sublethal effects of Cry 1F Bt corn and clothianidin on black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development.** Journal of Economic Entomology 2011, **104**(2):484-493.
45. Calabrese EJ, Blain R: **The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview.** Toxicology and Applied Pharmacology 2005, **202**(3):289-301.
46. Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik BE: **Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management.** Nature Biotechnology 2015, **33**(2):161-168.
47. Wei J, Guo Y, Liang G, Wu K, Zhang J, Tabashnik BE, Li X: **Cross-resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm.** Scientific Reports 2015, **5**.
48. Adamczyk JJ, Adams LC, Hardee DD: **Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double Bacillus thuringiensis toxin cotton genotypes.** Journal of Economic Entomology 2001, **94**(6):1589-1593.

49. Adamczyk Jr J GS, Armstrong J, Mullins W, Braxton L, Lassiter R, Siebert M **Evaluations of Bollgard®, Bollgard II®, and Widestrike® technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae)**. Florida Entomologist 2008, **91**((4)):531-536.
50. Kranthi KR, Naidu S, Dhawad CS, Tatwawadi A, Mate K, Patil E, Bharose AA, Behere GT, Wadaskar RM, Kranthi S: **Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in Bt-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Hubner) (Noctuidae : Lepidoptera)**. Current Science 2005, **89**(2):291-298.
51. Olsen KM, Daly JC, Holt HE, Finnegan EJ: **Season-long variation in expression of Cry1Ac gene and efficacy of Bacillus thuringiensis toxin in transgenic cotton against Helicoverpa armigera (Lepidoptera : Noctuidae)**. Journal of Economic Entomology 2005, **98**(3):1007-1017.

Tabela 1. Inibição de crescimento e mortalidade de *Spodoptera eridania* em função da concentração-resposta às toxinas Cry2Aa, Cry1Fa e Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*.

Variável	Toxina	n ^c	Inclinação ± EP	CE ₅₀ ou CL ₅₀ ^{a,b} (IC 95%)	CE ₉₀ ou CL ₉₀ ^{a,b} (IC 95%)	CE ₉₉ ou CL ₉₉ ^{a,b} (IC 95%)	χ ²	P
Inibição de crescimento	Cry2Aa	512	1,15 ± 0,18	0,9 (0,29 – 1,7)	11,8 (8,27 - 17,9)	94,7 (49,7 - 304,2)	4,05	0,54
	Cry1Fa	436	0,87 ± 0,08	253,7 (105,8 - 672,4)	> 3000	> 3000	9,54	0,09
	Cry1Ac	384	nc ^d	>10000	> 10000	> 10000	-	-
Mortalidade	Cry2Aa	512	1,46 ± 0,12	11,0 (6,7 - 16,2)	82,2 (51,7 – 167,3)	422,9 (199,29 – 1533,93)	7,9	0,16
	Cry1Fa	499	nc	> 3000	> 3000	> 3000	nc	-
	Cry1Ac	384	nc	> 10000	> 10000	> 10000	nc	-

^ang (nanogramas)/cm² de toxina na superfície da dieta.

^bCE: Concentração efetiva para causar inibição em 50, 90 ou 99 % dos indivíduos testados durante o período de 7 dias. CL: Concentração efetiva para causar mortalidade em 50, 90 ou 99 % dos indivíduos testados durante o período de 7 dias.

^cn: Número de insetos testados.

^dnc: Não calculado por falta de resposta mesmo na maior concentração testada.

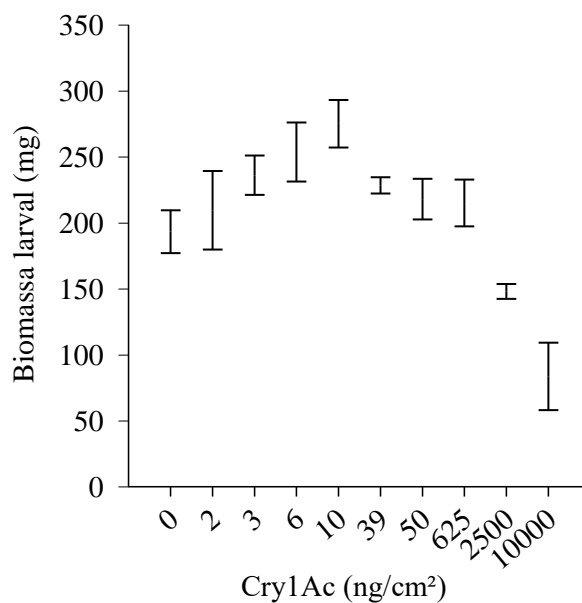


Figura 1. Biomassa larval de *S. eridania* com 7 dias de idade expostas a concentrações subletais da toxina Cry1Ac, aplicada sobre a dieta artificial. Os dados são médias \pm erro padrão (n = 384).

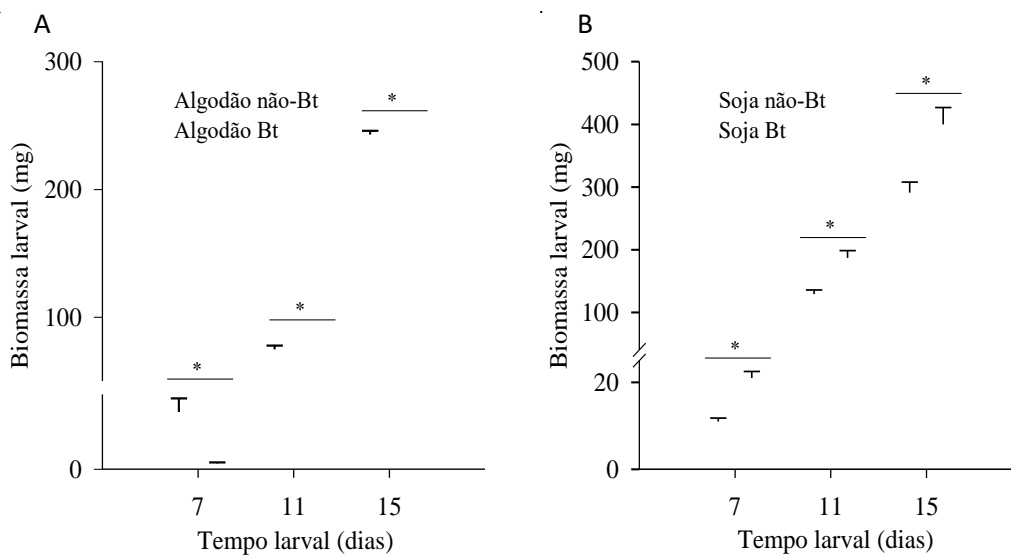


Figura 2. Biomassa larval de *S. eridania* alimentadas com folhas de soja e algodão. (A) Larvas alimentadas com algodão Bt (Cry1Ac + Cry2Ab) ou algodão não-Bt (n = 192). (B) Larvas alimentadas com soja Bt (Cry1Ac) ou soja não-Bt (n = 768). Barras com asterisco indicam diferença significativa entre variedades ($P < 0,05$). Os dados são médias \pm erro padrão.

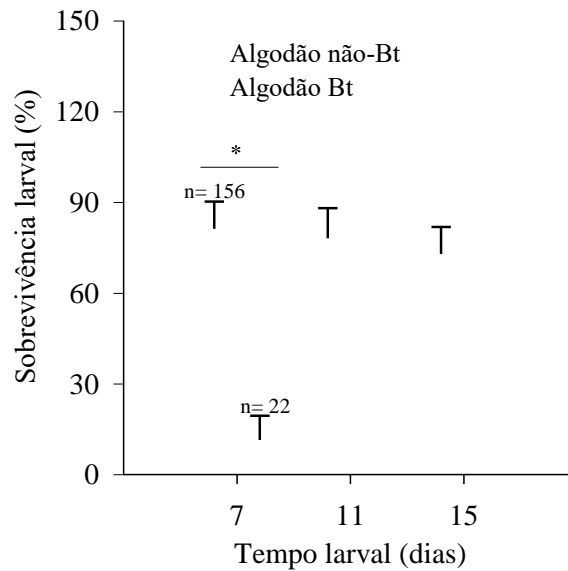


Figura 3. Sobrevivência larval de *S. eridania* alimentadas com algodão Bt (Cry1Ac + Cry2Ab) ou não-Bt, (n = 384). Barra com asterisco indica diferença significativa entre os tipos de soja ($P < 0,05$).

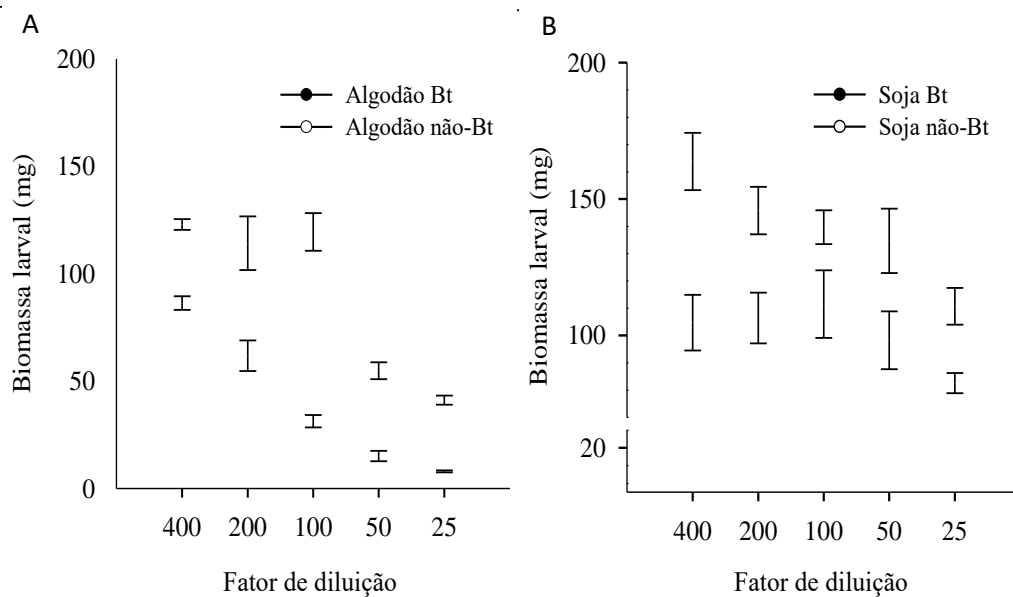


Figura 4. Biomassa larval de *S. eridania* que se alimentaram até 7 dias de idade em dieta artificial contendo diluições do tecido liofilizado de (A) algodão Bt (Cry1Ac + Cry2Ab) e algodão não-Bt (n = 400). (B) soja Bt (Cry1Ac) e soja não-Bt (n = 400). O fator de diluição é relativo à concentração de toxina no hospedeiro natural. Os dados são médias \pm erro padrão.

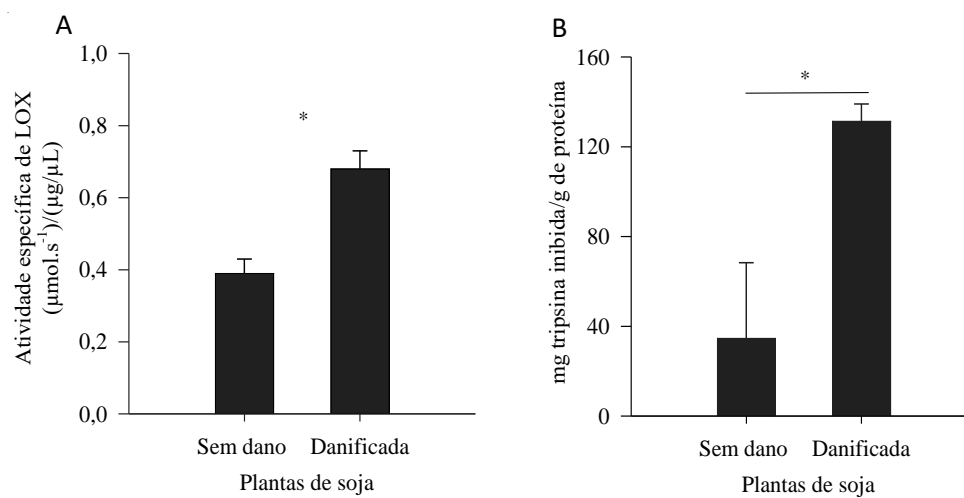


Figura 5. Características bioquímicas de folhas de soja. (A) Atividade de lipoxigenase e (B) inibidor de proteases em plantas de soja. Barras com asterisco indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$) ($n = 5$).