

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

BIOECOLOGIA DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SEU CONTROLE
MICROBIANO E BIOTECNOLÓGICO

Rosalia Azambuja

Dourados - MS
Abril – 2016

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Rosalia Azambuja

BIOECOLOGIA DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) E SEU CONTROLE MICROBIANO E BIOTECNOLÓGICO

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande
Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de DOUTORA EM
ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA
BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: Dr. Paulo Eduardo Degrande
Coorientador: Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Dourados - MS
Abril – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A991b Azambuja, Rosalia.
Bioecologia de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu controle microbiano e biotecnológico / Rosalia Azambuja -- Dourados, MS: UFGD, 2016.
100f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Dr. Paulo Eduardo Degrande.
Co-orientador: Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. biologia. 3. ínstar. 4. MIP. 5. preferência hospedeira. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

“BIOECOLOGIA DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SEU CONTROLE MICROBIANO E BIOTECNOLÓGICO”

Por

ROSALIA AZAMBUJA

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



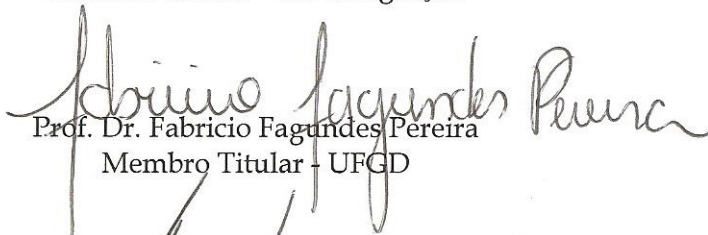
Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande
Orientador – UFGD



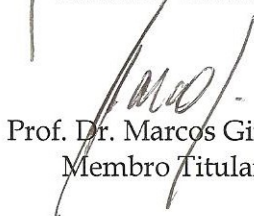
Prof. Dr. José Magid Waquil
Membro Titular – Embrapa Milho e Sorgo



Prof. Dr. Ricardo Barros
Membro Titular – MS Integração



Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira
Membro Titular – UFGD



Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 01 de abril de 2016.

Biografia da Acadêmica

Rosalia Azambuja - Nascida em 29 de julho de 1989, na cidade de Fátima do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil, filha de Rosalino Azambuja e Antonia Pascoa Betini, cursou o ensino Fundamental (1995-2002) e médio (2003-2005) na Escola Estadual Antônio Vicente Azambuja localizada no Distrito de Itahum, Município de Dourados, MS, Brasil. É graduada em Ciências Biológicas (2006-2009) pelo Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN) com bolsa integral pelo Programa Universidade para Todos (PROUNI). Mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (2010-2012) pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), sendo bolsista por aprovação de projeto pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Processo 149968/2010-8). No final de 2011 foi aprovada no Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), com início em março de 2012, sendo bolsista por aprovação de projeto pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) (Processo nº 23/200.733/2013).

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muita, nos aproxima”

Louis Pasteur

Agradecimentos

A Deus, pela minha vida, minha família, minha saúde, por todas as coisas boas que fez e faz em minha vida e por aumentar a minha fé a cada dia.

À Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão da bolsa de Doutorado (Processo nº 23/200.733/2013).

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande, a quem admiro, pelo exemplo de pessoa, professor e pesquisador que é para mim, pelos ensinamentos, oportunidades, orientação, confiança em meu trabalho e por não medir esforços para que o nosso trabalho fosse desenvolvido com a melhor qualidade possível e atingíssemos além dos nossos objetivos.

Ao meu coorientador Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez por aceitar nosso convite, pelas valiosas contribuições em meus trabalhos da tese e parceria nas identificações da espécie *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae).

A todos os meus professores do PPGECB pelos ensinamentos e exemplos de profissionais e em especial ao professor e amigo Dr. Fabrício Fagundes Pereira.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições para a melhoria desta tese.

Aos amigos Ellen Patrícia de Souza, Luziene Ramos do Nascimento, Julielen Zanetti Brandani, Renato Anastacio Guazina e Ricardo Oliveira dos Santos pela leitura e sugestões a esta tese.

À técnica de laboratório Janete P. G. de Lima, pelo auxílio e atenção em todas as atividades realizadas no Laboratório de Entomologia Aplicada, e pela amizade e carinho durante estes anos de trabalho.

A todos que fazem ou fizeram parte da equipe do Laboratório de Entomologia Aplicada da FCA/UFGD, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese, em especial aos colegas: Ellen, Ricardo, Rafael, Anderson, Carlos, Renato, Jhone, Mateus Fuchs, Matheus Pereira, Letícia, Danilo e Evandro pela companhia e auxílio nos experimentos.

A todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, em especial, as amigas Jaqueline Ferreira Campos, minha companheira durante toda essa “caminhada entomológica” na UFGD, e Ellen Patrícia de Souza que além de ser uma grande amiga, “brother”, é uma excelente companheira de trabalho, sua amizade e apoio profissional foram essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Aos meus pais, Rosalino Azambuja e Antonia Pascoa Betini, por serem um exemplo de vida, por fazerem tudo por mim, pelo amor, dedicação incondicional, carinho, conforto, incentivo constante, educação, humildade, perseverança e orações. E as minhas irmãs Aline Priscila Betini Azambuja e Roseli Azambuja e a minha sobrinha Emilly Azambuja Aoki pelo companheirismo e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu namorado Álvaro Bezerra de Vasconcelos pelo seu carinho, apoio, auxílio nos experimentos e por fazer parte da minha vida.

A todas as minhas amigas pelo companheirismo, apoio, amizade e por fazerem parte da minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese de doutorado.

Muito obrigada!

Dedicatória

*Aos meus pais, Antonia Pascoa Betini e Rosalino Azambuja,
que dedicaram suas vidas ao sucesso de suas filhas,
sendo meus grandes incentivadores e a razão das minhas vitórias.*

SUMÁRIO

Resumo Geral.....	1
Abstract.....	2
Introdução Geral.....	3
Revisão Bibliográfica.....	5
Referências Bibliográficas.....	12
Objetivo Geral.....	18
Hipóteses.....	19
 Manuscrito I. Desempenho biológico de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros de importância econômica no Brasil.....	20
Resumo.....	21
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	26
Agradecimentos.....	30
Referências.....	30
Tabelas e Figuras.....	34
 Manuscrito II. Efeito da soja <i>Bt</i> sobre lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)	41
Resumo.....	42
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	44
Resultados.....	45
Discussão.....	46
Agradecimentos.....	48
Referências.....	48
Figura.....	51
 Manuscrito III. Efeito do algodão <i>Bt</i> sobre lagartas de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)	52
Resumo.....	53
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	55
Resultados e Discussão.....	57
Agradecimentos.....	61
Referências.....	61
Figuras e Tabela.....	65

Manuscrito IV. Suscetibilidade de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a bioinseticidas formulados à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner em soja.....	72
Resumo.....	73
Introdução.....	74
Material e Métodos.....	75
Resultados.....	77
Discussão.....	78
Agradecimentos.....	81
Referências.....	81
Figuras e Tabela.....	86
Conclusões e considerações finais.....	91

BIOECOLOGIA DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E SEU CONTROLE MICROBIANO E BIOTECNOLÓGICO

Resumo geral: *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das mais importantes pragas da Agricultura mundial devido seu histórico de grandes surtos populacionais, dificuldade de controle e prejuízos. Essa espécie foi recentemente identificada no Brasil atacando culturas como algodão (*Gossypium hirsutum* L.), feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* L.), milho (*Zea mays* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merrill), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Visando minimizar os danos e buscar soluções emergenciais de controle, instituições públicas e privadas, grupos de pesquisas e entidades relacionadas ao setor agrícola se mobilizaram pelo país e várias medidas emergenciais foram tomadas para o manejo desta praga. Como o sucesso de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) depende do conhecimento da biologia do inseto, estudar a bioecologia de *H. armigera* nas diferentes culturas no Brasil é essencial para entender seu ciclo biológico e dinâmica populacional nas culturas, bem como buscar por métodos alternativos ao químico para o controle da praga. Assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar algumas variáveis relacionadas a bioecologia de *H. armigera* e seu controle microbiano e biotecnológico. Para isso, foram desenvolvidos os seguintes estudos: Desempenho biológico de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros de importância econômica no Brasil; Efeito da soja *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); Efeito do algodão *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); Suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner em soja. A alimentação em folhas de soja, algodoeiro e feijoeiro permitiu o completo desenvolvimento de *H. armigera*, demonstrando que essas culturas são plantas hospedeiras favoráveis à manutenção das populações da espécie em campo, entretanto as folhas completamente expandidas de milho e buva *Conyza canadensis* (L.) Cronquist foram às menos adequadas para a sobrevivência das lagartas. A soja *Bt* afetou o tempo médio para os indivíduos atingirem a morte ao longo dos ínstares, mas sua eficácia não foi afetada pela idade larval de *H. armigera* causando mortalidade de 100% dos indivíduos em todos os seis ínstares avaliados e indicando que a soja *Bt* que expressa a proteína Cry1Ac é uma tática de controle eficiente para este lepidóptero praga. As variedades de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR® (Cry1Ac), FM 975WS® (Cry1Ac + Cry1F), DP 1228B2RF® (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT® (Cry1Ab + Cry2Ae) apresentaram eficiência de controle sobre *H. armigera*, pois afetaram a negativamente sobrevivência das lagartas. A utilização de eventos de algodão com pelos menos duas proteínas de *Bt*, com mecanismos de ação distintos, se mostrou mais efetiva no controle dos ínstares larvais de *H. armigera*. De maneira geral, as toxinas de *B. thuringiensis* dos produtos biológicos testados demonstraram ser mais eficientes no controle de lagartas de segundo instar de *H. armigera* em relação ao quarto instar. Sendo assim, a realização das aplicações quando as lagartas estão em estádios iniciais, mais suscetíveis, são importantes, pois controlam de maneira mais eficaz os indivíduos evitando a sobrevivência e interrompendo o ciclo da praga. Nossos resultados mostraram que o hospedeiro foi um fator significativo afetando o desenvolvimento e a sobrevivência de *H. armigera*, contribuindo com informações para entender a adaptação da espécie nas novas condições que se encontra, após sua introdução no Brasil, e fornecem informações importantes sobre a suscetibilidade dos diferentes ínstares larvais de *H. armigera* às plantas que expressam proteínas *Bt* e formulações de *Bt*, bem como o efeito destas sobre os indivíduos sobreviventes, como subsídios para táticas de MIP.

Palavras chave: *Bacillus thuringiensis*, biologia, instar, MIP, preferência hospedeira.

BIOECOLOGY OF *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AND ITS MICROBIAL AND BIOTECHNOLOGICAL CONTROL

Abstract: *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is considered one of the most important pests of agriculture because of its history of large population outbreaks, control difficulties and great losses. This species was recently identified in Brazil attacking crops such as cotton (*Gossypium hirsutum* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L.), common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.), corn (*Zea mays* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.). In order to minimize the damage and seek emergency solutions, public and private institutions, research groups and entities related to the agricultural sector have mobilized the country and several emergency measures were taken for the management of this pest. As the success of Integrated Pest Management (IPM) programs depends on the pest biology knowledge, study the bioecology of *H. armigera* in different cultures in Brazil is essential to understand its life and dynamics cycle in cultures, and the search for alternative methods to chemical for pest control. Thus, the aim of this study was to evaluate the bioecology of *H. armigera* and its microbial and biotechnological control. So, the following projects were developed: Comparative performance of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in hosts of economic importance in Brazil; Effect soybean *Bt* on *Helicoverpa armigera* bollworm (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); Cotton toxicity expressing Cry proteins for different larval instars of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to biopesticides based on the *Bacillus thuringiensis* Berliner in soybean. The feed on soybean, cotton and bean leaves allowed full development of *H. armigera*, demonstrating that these crops are host plants favorable to maintain the populations of the species in the field, while the fully expanded leaves of corn and *Conyza canadensis* (L.) Cronquist were less suitable for the survival of *H. armigera*. Average time was affected for *Bt* soybean to the individuals reach death over instar, but their effectiveness was not affected by *H. armigera* larvae age, causing mortality of 100% of subjects in all six evaluated instars, indicating that soybean *Bt* which expresses the Cry1Ac protein is an effective control tactic for this lepidopteran pest. The varieties of cotton *Bt* DP 555BGRR® (Cry1Ac), FM 975WS® (Cry1Ac + Cry1F), DP 1228B2RF® (Cry1Ac + Cry2Ab2) and FM 940GLT® (Cry1Ab + Cry2Ae) showed control levels on *H. armigera* as affected survival of caterpillars. The use of cotton event with at least two *Bt* proteins, with different mechanisms of action, was more effective in controlling the larval instars of *H. armigera*. In general the toxins of *B. thuringiensis* of biological products tested proved to be more efficient in larvae control second instar of *H. armigera* in the fourth instar. Thus, the implementation of applications when the caterpillars are in initial stages, more susceptible, are important because they control more effectively the individuals preventing survival and interrupting the pest cycle. Our results showed that the host was a significant factor affecting the survival and development of *H. armigera*, contributing with information to understand the adaptation of species in new conditions, after its introduction in Brazil, and provide important information about the susceptibility of different larval instars of *H. armigera*, plants expressing protein *Bt* and *Bt* formulations, as well as the effect of these on the surviving individuals, such as subsidies for IPM tactics.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, biology, instar, IPM, host preference.

Introdução geral

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é referida como uma das mais importantes pragas da Agricultura na Ásia, África, Europa e Austrália (Tay et al. 2013) devido ao seu histórico de grandes surtos populacionais, dificuldades de controle, resistência a inseticidas e enormes prejuízos pelo Mundo (Alvi et al. 2012; Degrande & Omoto 2013). Essa espécie polífaga causa danos em diferentes culturas de importância econômica, como algodão (*Gossypium hirsutum* L.), leguminosas em geral, sorgo (*Sorghum bicolor* L.), milho (*Zea mays* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), dentre outras (Cpezak et al. 2013b; Embrapa 2013; Cunningham & Zalucki 2014).

No Continente Americano, a recente identificação de *H. armigera* gerou relatos de sua ocorrência em diferentes países e culturas agrícolas (Czepak et al. 2013a; Specht et al. 2013; Senave 2013; Tay et al. 2013; Leite et al. 2014; Murúa et al. 2014; Arneodo et al. 2015). Após a sua detecção em países da América do Sul, observou-se que a espécie apresenta grande adaptabilidade, ampla distribuição geográfica (Leite et al. 2014; Kriticos et al. 2015), elevada taxa de reprodução, capacidade de alimentar e se desenvolver em diferentes espécies hospedeiras, o que resultou em perdas econômicas significativas para a Agricultura, devido às dificuldades encontradas para o controle eficaz da praga (Cpezak et al. 2013b).

No Brasil a praga foi recentemente identificada em 2013 (Czepak et al. 2013a; Specht et al. 2013), mas de acordo com Sosa-Gómez et al. (2015) a introdução de *H. armigera* no Brasil provavelmente ocorreu antes de outubro de 2008, e em agosto de 2012 a espécie já estava presente desde o extremo sul (Rio Grande do Sul) até o extremo norte (Amapá) do país. Esse noctúideo que atinge grandes produtores e também a Agricultura Familiar vem causando grandes preocupações ao setor agrícola, pois coloca em risco a viabilidade das culturas, devido: à falta de conhecimentos sobre as estratégias de manejo e controle da mesma; plantio sucessivo de espécies vegetais hospedeiras (milho, soja e algodão) em áreas muito extensas e próximas, que contribuem para a disponibilidade de alimento para a praga ao longo de todo o ano; e além disso, há condições ambientais favoráveis ao seu estabelecimento, com riscos para ao aumento no número de aplicações de produtos químicos e consequentemente elevação nos custos de manejo das culturas (Degrande & Omoto 2013).

Culturas de importância econômica para o Brasil como milho, algodão, soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* L.), sorgo e tomate estão entre as culturas mais atacadas por *H.*

armigera nos últimos anos (Cpezak et al. 2013a, b; Specht et al. 2013; Leite et al. 2014; Pratisoli et al. 2015). No Oeste Baiano estas lagartas atacaram a cultura do algodão, causando perdas de até 80% da produção, severos danos em diferentes estágios da cultura e dificuldades de manejo, por não terem produtos registrados para o seu controle (Cpezak et al. 2013b).

Em 2013 acreditava-se que essa espécie exótica já estava disseminada por 12 estados brasileiros (Degrande & Omoto 2013). Visando minimizar os danos e buscar soluções emergenciais de controle, várias instituições públicas e privadas, grupos de pesquisas e entidades relacionadas ao setor agrícola se mobilizaram pelo país. No início de 2013, o surto inesperado de *H. armigera* levou o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a declarar o problema como Emergência Fitossanitária (PORTARIA Nº 42, DE 5 DE MARÇO DE 2013-MAPA BRASIL), sendo que várias medidas emergenciais foram tomadas visando controlar o complexo das lagartas *Helicoverpa* spp. no Brasil (Cpezak et al. 2013b). A Embrapa também criou um plano de ações emergenciais para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas para auxiliar os produtores inicialmente na tomada de decisões (Embrapa 2013).

Levando-se em consideração, a capacidade e a rapidez com que *H. armigera* causou danos e se dispersou pelo Brasil, a ocorrência em diferentes Estados brasileiros, as dificuldades encontradas pelos produtores para o manejo desta praga nos cultivos, a queda na produtividade agrícola causada por este inseto e conseqüentemente os grandes prejuízos observados, a busca por métodos para o controle dessa praga faz-se necessária.

Nesse cenário, o controle químico ainda é a principal tática para o manejo de *H. armigera*, porém não é a opção mais indicada, pois a espécie é conhecida por desenvolver rapidamente resistência a inseticidas químicos (Kranthi et al. 2002; Torres-Vila et al. 2002; Bués et al. 2005; Alvi et al. 2012). Assim, faz-se necessário o conhecimento da biologia dessa espécie nas diferentes culturas no Brasil, para entender seu ciclo biológico, dinâmica e buscar métodos alternativos ao químico para o controle dessa praga.

Entre os métodos de controle recomenda-se a aplicação de produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), bem como o cultivo de variedades *Bt* que são alternativas aos inseticidas químicos, uma vez que podem ser utilizadas no manejo de populações de *H. armigera* (Embrapa 2013), e simultaneamente controlar o complexo de lepidópteros pragas nas culturas. Esse entomopatógeno apresenta propriedades inseticidas para o controle de *H. armigera* (Bravo et al. 2011; Chelliah et al. 2011; Li & Bouwer 2014; Sebastião et al. 2015), de forma eficiente e ecologicamente correta (Santos Junior et al. 2009; Zhuang et al. 2011;

Sanahuja et al. 2011). Porém, cita-se que a eficiência de controle de *B. thuringiensis* pode ser afetada ao longo dos estádios de desenvolvimento larval de lepidópteros (Rausell et al. 2000; González-Cabrera et al. 2011), inclusive de *H. armigera* (Li & Bouwer 2012). González-Cabrera et al. (2011) e Aggarwal et al. (2006) relatam que insetos em instares avançados comumente são mais tolerantes a toxinas de *Bt*, sendo essas mais eficientes sobre lagartas pequenas (Sanahuja et al. 2011). No entanto, existem relatos conflitantes sobre a suscetibilidade dos estádios larvais ao *B. thuringiensis* (Liao et al. 2002). De acordo com Li e Bouwer (2012) e Sebastião et al. (2015) a suscetibilidade de *H. armigera* às toxinas de *B. thuringiensis* pode variar entre populações de diferentes países e de origem geograficamente distintas. Tornando assim essencial o conhecimento da suscetibilidade da espécie às toxinas *Bt* para formulação de estratégias de manejo (Babu et al. 2002).

Revisão bibliográfica

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

O gênero *Helicoverpa* (Hardwick 1965) (Lepidoptera: Noctuidae) é composto por um grupo de 18 espécies que inclui algumas das mais devastadoras espécies de lepidópteros pragas agrícolas (Behere et al. 2007 citando Mitter et al. 1993). A maioria das espécies deste gênero apresenta hábito extremamente polífago, sendo as lagartas relatadas em espécies de plantas cultivadas e silvestres, incluindo Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (Cunningham & Zalucki 2014). Dentre as principais espécies deste gênero consideradas como praga de cultivos agrícolas, *H. armigera* é considerada a mais prejudicial economicamente.

Lagartas de *H. armigera* são referidas como uma das mais importantes pragas da Agricultura na Ásia, África, Europa e Austrália (Tay et al. 2013) e conhecidas por seu histórico de grandes surtos, difícil controle e enormes prejuízos (Alvi et al. 2012; Degrande & Omoto 2013). No Continente Americano, a espécie foi identificada primeiramente no Brasil (Czepak et al. 2013a; Specht et al. 2013; Tay et al. 2013) e após ter sido relatada nesse país, *H. armigera* também foi encontrada no Paraguai (Senave 2013), Argentina (Murúa et al. 2014; Arneodo et al. 2015), Porto Rico (North American Plant Protection Organization 2014) e mais recentemente nos EUA (Pest Alert 2015).

Essa espécie amplamente distribuída e polífaga foi relatada em 68 famílias de plantas, das quais apenas 14 famílias são registradas como hospedeiras em todas as áreas geográficas (Cunningham & Zalucki 2014). *H. armigera* é responsável por causar danos a diferentes

culturas de importância econômica, como o algodão, leguminosas em geral, sorgo, milho e tomate (Czepak et al. 2013b; Embrapa 2013; Cunningham & Zalucki 2014). As lagartas podem se alimentar de folhas e caules, no entanto, preferem brotos, flores e frutos (Czepak et al. 2013b), podendo assim causar danos tanto na fase vegetativa como reprodutiva (Czepak et al. 2013a). A espécie possui capacidade de entrar em diapausa facultativa no solo e é conhecida por evoluir a altas intensidades de resistência a inseticidas (Alvi et al. 2012). Mariposas adultas também demonstram alta mobilidade e fecundidade individual muito elevada, o que contribui para a dispersão e aumento das populações da espécie (Embrapa 2013).

De maneira geral, esta espécie apresenta ovos de coloração amarelo-claros, sendo esses ovos colocados pelas fêmeas de forma isolada sobre talos, flores, frutos e folhas, preferencialmente no período noturno (Czepak et al. 2013b). O período larval é composto por seis instares (Czepak et al. 2013b) e pode variar entre 14 a 24 dias, dependendo do alimento consumido (Razmjou et al. 2014) e condições climáticas. A lagarta apresenta coloração variando do verde, castanho, marrom ou preto com linhas laterais coloridas ou não, sendo a coloração das larvas determinada principalmente pela parte da planta na qual as larvas se alimentam (Yamasaki et al. 2009). A cápsula cefálica de cor parda clara, as linhas finas nas laterais do corpo, a presença de pelos e a textura do tegumento, que apresenta aspecto levemente coriáceo, são detalhes característicos da espécie (Czepak et al. 2013a). A partir do quarto instar, devido à presença de tubérculos abdominais escuros e visíveis as lagartas apresentam, no primeiro segmento abdominal, o formato de “sela” (Czepak et al. 2013b).

No final do último instar, as lagartas vão para o solo onde ocorre a fase pupal e, dependendo das condições climáticas, podem entrar em diapausa (Czepak et al. 2013b). O adulto apresenta acentuado dimorfismo sexual, nos machos o primeiro par de asas tem coloração cinza esverdeado e nas fêmeas pardo alaranjado, em ambos sobre as margens das asas anteriores ocorre uma linha com sete a oito manchas e, logo acima, uma faixa marrom ampla, irregular e transversal, tendo, ainda, na parte central, uma marca em forma de vírgula. As asas posteriores são mais claras apresentando uma borda marrom escura na extremidade apical (Czepak et al. 2013a; b). As fêmeas apresentam uma alta fecundidade que pode variar de acordo com o alimento consumido durante a fase larval (Hemati et al. 2013).

Bioecologia de *Helicoverpa armigera*

Conhecer a biologia de um inseto é essencial para avaliar o desenvolvimento deste em diferentes culturas e variedades de plantas, uma vez que a qualidade da planta hospedeira está intimamente ligada ao crescimento e ao desenvolvimento de insetos herbívoros (Liu et al.

2010), pois em sistemas de policulturas podem haver plantas hospedeiras e não hospedeiras (Altieri 1989).

Plantas com mecanismos de defesa por antibiose e não-preferência podem afetar a biologia de um artrópode de forma leve a letal, diminuindo sua sobrevivência, dentre outros efeitos subletais, e afetando sua ocorrência e dinâmica populacional (Lara 1991; Smith 2005; Vendramim & Guzzo 2009; Aoyama & Labinas 2012). Casos de plantas hospedeiras não adequadas ao desenvolvimento de insetos resultam provavelmente da presença de compostos não nutricionais, como alomônios, voláteis ou características morfológicas de certas variedades que dificultam a alimentação pelo inseto, alterando assim suas características biológicas e atuando então no controle das pragas (Awmack & Leather 2002; Parra et al. 2009).

Algumas características estruturais da morfologia das plantas (Aoyama & Labinas 2012), além da textura e consistência da epiderme da planta, e os apêndices ou formações nela encontrados podem dificultar ou impedir alimentação das lagartas de primeiro ínstar e afetar negativamente sua sobrevivência, dentre outros efeitos subletais, atuando como mecanismos de defesa contra a herbivoria (Lara 1991; Vendramim & Guzzo 2009; Aoyama & Labinas 2012).

Em *H. armigera* a variação dos hospedeiros disponíveis pode interferir em seu ciclo de desenvolvimento (Hemati et al. 2013; Razmjou et al. 2014). Em estudo recente Carvalho et al. (2014) relatam a inadequação de folhas de milho e buva, *Conyza canadenses* (L.) Cronquist, para *H. armigera* completar seu ciclo biológico. Smith (2005) também cita relato de fatores de resistência do grão de bico, *Cicer arietinum* L., para *H. armigera*.

Testes sobre o efeito de diferentes variedades de soja no desenvolvimento de *H. armigera*, comprovaram que algumas variedades não são hospedeiras adequadas para a espécie (Naseri et al. 2011). Liu et al. (2010) também relatam que diferentes plantas hospedeiras afetam o tamanho das larvas e pupas e podem influenciar também na ocorrência de diapausa em *H. armigera*. Resultados de McCallum et al. (2011), por exemplo, demonstram que voláteis emitidos pelas plantas podem afetar o desenvolvimento reprodutivo desta mariposa.

Controle de *Helicoverpa armigera*

Dentre os métodos de controle, as aplicações de inseticidas químicos têm sido amplamente utilizadas e são atualmente indispensáveis para o controle da lagarta *H. armigera* em várias culturas (Torres-Vila et al. 2002; Alvi et al. 2012). Todavia, o controle químico não é o método mais recomendado, sob o ponto de vista do Manejo Integrado de Pragas (MIP),

uma vez que, vários trabalhos realizados em outros países, como Índia, Espanha e França, comprovaram a capacidade de evolução à resistência da espécie aos inseticidas químicos (Kranthi et al. 2002; Torres-Vila et al. 2002; Bués et al. 2005; Alvi et al. 2012).

Os impactos ao ambiente e o desenvolvimento de resistência resultantes da utilização de produtos químicos para o controle de lepidópteros-praga vêm aumentando o interesse em buscar-se formas alternativas para o controle de pragas, dentre elas o controle biológico com a bactéria *B. thuringiensis* (Pereira et al., 2009; Sebastião et al., 2015). O uso da bactéria *B. thuringiensis* para controle de *H. armigera* (Embrapa 2013) é indicado, uma vez que este entomopatógeno apresenta propriedades inseticidas para o controle desta espécie (Bravo et al. 2011; Chelliah et al. 2011; Li & Bouwer 2014; Sebastião et al. 2015) e de outras lagartas (Pereira et al. 2009; Pérez-Guerrero et al. 2012), de forma eficiente e ecologicamente correta (Santos Junior et al. 2009; Zhuang et al. 2011; Sanahuja et al. 2011).

***Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae)**

Bacillus thuringiensis (Bt) Berliner é uma bactéria de solo, gram-positiva esporulante, que pertence à família Bacillaceae (Morse et al. 2001; Chandrashekar et al. 2005; Pigott & Ellar 2007; Pereira et al. 2009; Sanahuja et al. 2011). Essa bactéria pertence ao grupo *B. cereus* que contém *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (Pigott & Ellar 2007; Sanahuja et al. 2011).

Esse entomopatógeno vem sendo utilizado desde os anos 50, do século 20, através de pulverização de seus esporos e cristais sobre plantas (Avilla et al. 2005), pois é patogênico para algumas ordens de insetos (Morse et al. 2001; Chandrashekar et al. 2005; Pigott & Ellar 2007; Sanahuja et al. 2011). O Bt pode ser facilmente distinguido dos outros membros do grupo *B. cereus* pela produção de toxinas inseticidas proteicas sob a forma de corpos de inclusão ou cristais em esporulação (Pigott & Ellar 2007; Sanahuja et al. 2011).

Cada toxina de Bt reconhece especificamente e se liga aos receptores do intestino do inseto, formando poros na membrana que perturbam a permeabilidade seletiva das células e, eventualmente, causam a lise de células epiteliais e morte do inseto (Chandrashekar et al. 2005). Após ingestão, quando ativadas, estas toxinas, além de outros fatores de virulência, enfraquecem ou matam os insetos e permitem a germinação dos esporos de *B. thuringiensis*. O tipo e o número de diferentes protoxinas nas inclusões cristalinas de *B. thuringiensis* determinam o perfil de toxicidade de uma determinada estirpe (Pigott & Ellar 2007). A toxicidade do Bt pode variar conforme a toxina Cry, a espécie de inseto (Ibargutxi et al. 2008) e o estágio de desenvolvimento larval (Li & Bouwer 2012). Além desses fatores a suscetibilidade da praga a toxinas de *B. thuringiensis* também pode variar entre populações

diferentes, e uma mesma proteína pode apresentar maior ou menor letalidade dependendo da população testada (Sebastião et al., 2015).

As toxinas Cry de *Bt* são agrupadas em classes e possuem atividades inseticidas específicas, principalmente para insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera e algumas são citadas afetando nematoides (Chandrashekar et al. 2005; Pigott & Ellar 2007; Sanahuja et al. 2011).

Modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis*.

No início da esporulação, o *Bt* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com ação tóxica (Polanczyk & Alves 2003). Essas proteínas acumuladas nos esporos formam inclusões cristalinas responsáveis pela toxicidade da espécie, e por isso são denominadas proteínas Cry, *crystal*, (também conhecidas como proteínas do cristal ou delta-endotoxinas) (Sanahuja et al. 2011).

As proteínas Cry de *Bt* são produzidas como protoxinas que podem ser convertidas em toxinas ativas mediante a ingestão por um inseto suscetível (Sanahuja et al. 2011; Li & Bouwer, 2014). O *Bt* é quase que exclusivamente ativo contra estágios larvais de ordens diferentes de insetos e mata o inseto através da ligação e a criação de poros em membranas do intestino, que provocam a lise celular produzindo um choque osmótico, e resultam na destruição do tecido do intestino médio seguido por septicemia (Bravo et al. 2011). A análise das vísceras de lagartas alimentadas com alimentos contaminados com *Bt* revelou a ruptura das células epiteliais do intestino médio das lagartas logo após a ingestão dos cristais, seguida por lise celular e inchaço. O conteúdo do intestino (incluindo esporos bacterianos) foi assim liberado na cavidade do corpo, permitindo que as bactérias se reproduzissem (Sanahuja et al. 2011).

De acordo com Sanahuja et al. (2011), a ação do *Bt* no intestino dos insetos depende da ativação das toxinas inseticidas durante o processo patogênico, mas estas bactérias também produzem uma variedade de fatores de virulência que contribuem para a morte dos insetos (revisado em Bravo et al., 2011). Para que as toxinas *Bt* sejam ativadas no intestino é necessário um ambiente alcalino e presença de proteases específicas que clivam a pró-toxina inócua. Ao serem ativadas por proteólise, cada toxina se liga a receptores específicos da borda da membrana resultando na formação de uma estrutura oligomérica de pré-inserção de poro, promovendo a abertura de poros e interrompendo o movimento de solutos através do epitélio intestinal (Sanahuja et al. 2011).

Uma das características importantes das proteínas Cry é a especificidade ao hospedeiro (revisado em Bravo et al. 2011). O requisito para as condições alcalinas, as proteases

específicas de receptores específicos são fatores que explicam porque o *Bt* é inofensivo para os mamíferos (que têm um intestino ácido e não possuem os receptores correspondentes) e por que cada toxina tem uma estreita gama de hospedeiros (Sanahuja et al. 2011).

Toxinas Cry: bioinseticidas e plantas *Bt*

A crescente utilização do *B. thuringiensis*, durante várias décadas, se deve a especificidade em relação ao hospedeiro e a sua eficácia no controle de pragas (Morse et al. 2001; Polanczyk & Alves 2003; Chandrashekar et al. 2005; Van Frankenhuyzen 2009; Santos Junior et al. 2009; Sanahuja et al. 2011; Zhuang et al. 2011).

Segundo Van Frankenhuyzen (2009), a importância do *B. thuringiensis* resultou em um total de 59 holótipos de toxinas testadas contra 71 espécies de insetos em 1182 bioensaios. *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) foi a espécie mais frequentemente testada (9,8% de bioensaios total), seguida por *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (8,7%), *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (6,4%), *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) (5,9%), *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (5,3%), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (5,1%), *H. armigera* (4,8%), *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) (4,0%) e *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) (3,9%). A família mais frequentemente testada foi Noctuidae (44% do total de bioensaios), seguida por Pyralidae (12,2%), Plutellidae (9,8%), Tortricidae (8,8%), Sphingidae (5,9%), Lymantridae (4,0%), Gelechiidae (2,5%) e Bombycidae (3,9%).

Diferentes linhagens de *Bt* produzem diferentes tipos de toxina e cada uma delas afeta um grupo taxonômico estreito de insetos, o que motivou a utilização destas como inseticidas para proteger as culturas (Sanahuja et al. 2011). Produtos *Bt* foram desenvolvidos para o controle de insetos na agricultura e também contra espécies de dípteros. Essas formulações comerciais de *Bt* geralmente contêm um múltiplo de proteínas tóxicas (Bird & Akhurst 2007) e essa associação de toxinas aumenta sua eficiência devido ao sinergismo entre essas (Avilla et al. 2005), uma vez que a mistura de diversas proteínas Cry apresenta maior atividade do que as proteínas isoladas, resultando em um bom controle de pragas.

As proteínas Cry presentes nas formulações de bioinseticidas à base de *Bt* são relatadas como tóxicas às lagartas de *H. armigera* (Liao et al. 2002; Bravo et al. 2011; Chelliah et al. 2011; Sebastião et al. 2015). A maioria dos produtos à base de *Bt* baseia-se em preparações de esporos-cristais derivadas de algumas estirpes selvagens, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) HD1 que expressa proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa ou HD73 que produz Cry1Ac e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (*Bta*) HD137 que produz diferentes toxinas Cry, tais como Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca e Cry1Da (Bravo et al., 2011). Essa combinação

esporo-cristal presente nas formulações também pode apresentar efeito sinérgico (Avilla et al. 2005) promovendo o aumento da toxicidade de *B. thuringiensis* e em alguns casos resultando no aumento da mortalidade larval (Chandrashekar et al. 2005).

Produtos formulados a partir de *Bt* apresentam uma baixa persistência no ambiente, o que do ponto de vista ambiental é muito vantajoso, pois os tornam uma forma de controle ecologicamente correta (Chandrashekar et al. 2005; Pereira et al., 2009; Sanahuja et al. 2011). Assim, normalmente *Bt* é aplicado quando as larvas estão em seus ínstares iniciais, pois larvas em estágios avançados são relatadas como mais tolerantes (Bird & Akhurst 2007; Sanahuja et al. 2011; Li e Bouwer 2012). O *Bt* persiste durante apenas alguns dias na superfície da folha, pois a luz UV, o tempo, o ambiente da superfície da folha e a presença de proteases podem contribuir para a degradação das proteínas Cry (Sanahuja et al. 2011).

O *Bt* além de ser amplamente utilizado em formulações comerciais, bioinseticidas para controlar lepidópteros pragas agrícolas, os seus genes *cry* vêm sendo expressos em plantas transgênicas, especialmente algodão, milho (Elleuch et al. 2014) e mais recentemente em soja (Formentini et al. 2015).

As proteínas Cry de *Bt* pertencem a uma classe de toxinas de bactérias conhecidas como toxinas formadoras de esporos, que são secretadas como proteínas solúveis em água e sofrem alterações conformacionais a fim de inserir-se na membrana de seus hospedeiros, o que permite a introdução de seus genes em plantas transgênicas proporcionando uma forma eficaz de controlar insetos pragas na Agricultura (Bravo et al. 2011). A toxina *Bt* é expressa em dose alta na planta com elevada persistência durante todo o ciclo da cultura (Formentini et al. 2015).

As variedades de plantas *Bt* são alternativas aos inseticidas químicos para o controle de *H. armigera*, uma vez que podem ser utilizadas no manejo de populações da espécie (Embrapa 2013), e simultaneamente controlar um complexo de lepidópteros pragas nas culturas. A espécie *H. armigera* é o alvo principal do algodão *Bt* em países como a China (Ouyang et al 2011; Wan et al. 2012). Além das plantas *Bt* causarem a mortalidade de *H. armigera* (Arshad et al. 2009), Ouyang et al. (2011) sugerem que uma dieta de algodão *Bt* enfraquece a preparação da lagarta para hibernação e reduz a sobrevivência da geração de hibernação, o que por sua vez pode reduzir a densidade da primeira geração no ano seguinte, sendo que os efeitos do algodão *Bt* na geração de hibernação desta lagarta parecem contribuir de forma significativa para a supressão da praga.

A expressão de certas toxinas Cry em culturas transgênicas vem sendo vantajosa e benéfica para a Agricultura, contribuindo para um eficiente controle de insetos-pragas,

resultando em rendimentos mais elevados, redução do uso de pesticidas químicos e combustíveis fósseis (Bravo et al. 2011; Sanahuja et al. 2011).

Referências Bibliográficas

- Aggarwal N, Holaschke ME, Basedow T. 2006. Evaluation of bio-rational insecticides to control *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on *Vicia faba* L. Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie 15: 245-250.
- Altieri M. 1989. Agroecologia: As bases científicas de Agricultura Alternativa. PTA-FASE, Rio de Janeiro.
- Alvi AHK, Sayyed AH, Naeem M, Ali M. 2012. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. PLoS One 7:1-9.
- Aoyama EM, Labinas AM. 2012. Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos. Enciclopédia Biosfera 8: 365-386.
- Arneodo JD, Balbi EI, Flores FM, Sciocco-Cap A. 2015. Molecular Identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) in Argentina and Development of a Novel PCR-RFLP Method for its Rapid Differentiation From *H. zea* and *H. gelatopoeon*. Journal of Economic Entomology 108: 2505-2510.
- Arshad M, Suhail A, Arif MJ, Khan MA. 2009. Transgenic-Bt and Non-transgenic Cotton Effects on Survival and Growth of *Helicoverpa armigera*. International Journal Of Agriculture & Biology 11: 473-476.
- Avilla C, Vargas-Osuna E, González-Cabrera J, Ferré J, González-Zamora JE. 2005. Toxicity of several delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. Journal of Invertebrate Pathology 90: 51-4.
- Awmack CS, Leather SR. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Annual Review Entomology 47: 817-844.
- Babu BG, Udayasuriyan V, Mariam MA, Sivakumar NC, Bharathi M, Balasubramanian G. 2002. Comparative toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (H.). Crop Protection 21: 817-822.
- Behere GT, Tay WT, Russell DA, Heckel DG, Appleton BR, Kranthi KR, Batterham P. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera*

- (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *Evolutionary Biology* 117: 1-10.
- Bird LJ, Akhurst RJ. 2007. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 84–94.
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41: 423-431.
- Bués R, Bouvier JC, Boudinhon L. 2005. Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. *Crop Protection* 24: 814-820.
- Carvalho SSS, Mendes SM, Santos AE, Vilela M, Araujo OG. 2014. Aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada com buva (*Conyza canadensis*). Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106836/1/Aspectos-biologicos.pdf> [Consultado em 21-02-2016].
- Chandrashekar K, Kumari A, Kalia V, Gujar GT. 2005. Baseline susceptibility of the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* Berl. var. *kurstaki* and its endotoxins in India. *Current Science* 88: 167–175
- Chelliah A, Gupta GP, Karuppiyah S, Kumar PA. 2011. Chimeric *d*-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* with increased activity against *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Tropical Insect Science* 31: 59-68.
- Cunningham JP, Zalucki MP. 2014. Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? *Journal of Economic Entomology* 107: 881–896.
- Czepak C, Albernaz KC, Vivan LM, Guimarães HO, Carvalhais T. 2013a. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 43:110-113.
- Czepak C, Vivan LM, Albernaz KC. 2013b. Pragás da vez. *Cultivar* 167: 20-27.
- Degrande PE, Omoto C. 2013. Pragás: Estancar prejuízos. *Cultivar* 167:30-34.
- Elleuch J, Zghala RZ, Jemaà M, Azzouz H, Tounsi S, Jaouab S. 2014. New *Bacillus thuringiensis* toxin combinations for biological control of lepidopteran larvae. *International Journal of Biological Macromolecules* 65:148–154.
- Embrapa. 2013. Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas. 19p. 2013. Disponível em:

http://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa/Manejo_Helicoverpa.pdf/view [Consultado em 15-06-2013].

- Formentini AC, Sosa-Gómez DR, Paula-Moraes SV, Barros NM, Specht A. 2015. Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay. *Ciência Rural* 45: 2113-2120.
- González-Cabrera J, Mollá O, Montón H, Urbaneja A. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl* 56: 71-80.
- Hemati SA, Naseri B, Razmjou J. 2013. Reproductive performance and growth indices of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. *Journal Crop Protection* 2: 193-208.
- Ibargutxi MA, Muñoz D, Escudero IRD, Caballero P. 2008. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control* 47: 89-96.
- Kranthi KR, Jadhav DR, Kranthi S, Wanjari RR, Ala SS, Russell CDA. 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. *Crop Protection* 21: 449-460.
- Kriticos DJ, Ota N, Hutchison WD, Beddow J, Walsh T, Tay WT, Borchert DM, Paula-Moreas SV, Czapak C, Zalucki MP. 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? *PLoS One* 10: 1-24.
- Lara FM. 1991. Princípios de resistência de plantas a insetos. Ícone, São Paulo.
- Leite NA, Alves-Pereira A, Corrêa AS, Zucchi MI, Omoto C. 2014. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. *PLoS ONE* 9: 1-7 e113286.
- Li H, Bouwer G. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 110-6.
- Li H, Bouwer G. 2014. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 7-13.
- Liao C, Heckel DG, Akhurst R. 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 55-63.

- Liu Z, Gong P, Li D, Wei W. 2010. Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by larval host plants: pupal weight is important. *Journal of Insect Physiology* 56: 1663-1670.
- McCallum EJ, Cunningham JP, Lückner J, Zalucki MP, Voss JJ, Botella JR. 2011. Increased plant volatile production affects oviposition, but not larval development, in the moth *Helicoverpa armigera*. *The Journal of Experimental Biology* 214: 3672-3677.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária – MAPA/Brasil. 2013. PORTARIA Nº 42, DE 5 DE MARÇO DE 2013. D.O.U., 06/03/2013 - Seção 1.
- Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9: 409–417.
- Murúa MG, Scalora FS, Navarro FR, Cazado LE, Casmuz A, Villagrán ME, Lobos E, Gastaminza G. 2014. First Record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist* 97: 854-856.
- Naseri B, Fathipour Y, Moharramipour S, Hosseininaveh V. 2011. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13: 17-26.
- North American Plant Protection Organization. 2014. Detection of Old World Boll-worm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico. Disponível em: <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=600> [Consultado em 09-02-2015].
- Ouyang F, Liu Z, Yin J, Su J, Wang C, Ge F. 2011. Effects of transgenic *Bt* cotton on overwintering characteristics and survival of *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology* 57: 153–160.
- Parra JRP, Panizzi AR, Haddad ML. 2009. Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos. In: Panizzi AR, PARRA JRR (eds) *Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 37-90.
- Pereira JM, Seii AH, Oliveira MF, Brustolin C, Fernandes PM. 2009. Mortalidade de lagartas de *Spodoptera eridania* (Cramer) pela utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Pesquisa Agropecuária Tropical* 39: 140-143.
- Perez-Guerrero S, Aldebis HK, Vargas-Osuna H. 2012. Toxicity of six *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against the olive moth *Prays oleae*. *Bulletin of Insectology* 65: 119-122.
- Pest Alert. 2015. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), the Old World Bollworm. Disponível em: <http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant->

Industry/Plant-Industry-Publications/Pest-Alerts/Pest-Alert-The-Old-World-Bollworm
[Consultado em 09-02-2015].

- Pigott CR, Ellar DJ. 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 255–281.
- Polanczyk RA, Alves SB. 2003. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. *Agrociencia* 7: 1-10.
- Pratissoli D, Lima VLS, Pirovani VD, Lima WL. 2015. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato in the Espírito Santo state. *Horticultura Brasileira* 33: 101-105.
- Rausell C, Martínez-Ramírez AC, García-Robles I, Real MD. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1553–1558.
- Razmjou J, Naseri B, Hemati AS. 2014. Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. *Journal of Pest Science* 87: 29-37.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9: 283–300.
- Santos Junior HJG, Marques EJ, Polanczyk RA, Pratissoli D, Rondelli VM. 2009. Suscetibilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). *Arquivos do Instituto Biológico* 76: 635-641.
- Sebastião I, Lemes ARN, Figueiredo CS, Polanczyk RA, Desidério JA, Lemos MVF. 2015. Toxicidade e capacidade de ligação de proteínas Cry1 a receptores intestinais de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50: 999-1005.
- Senave. 2013. Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola. ABC Color. Disponível em: <http://www.abc.com.py/ edicion-impres/a/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html> [Consultado em 09-02-2015].
- Smith CM. 2005. Antibiosis: adverse effects of resistance on arthropod biology. In: Smith CM (ed) *Plant resistance to arthropods: Molecular and conventional approaches*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 65-100.
- Sosa-Gomez DR, Specht A, Paula-Moraes SV, Lopes-Lima A, Yano SAC, Micheli A, EGF Morais EGF, Gallo P, Pereira PRVS, Salvadori JR, Botton M, Zenker MM, Azevedo-Filho WS. 2015. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera*

- (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*. doi: 10.1016 / j.rbe.2015.09.008.
- Specht A, Sosa-Gomez DR, Paula-Moraes SV, Yano SAC. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 689-692.
- Tay WT, Soria MF, Walsh T, Thomazoni D, Silvie P, Gajanan TB, Craig A, Sharon D. 2013. A brave new world for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS One* 8:1-7.
- Torres-Vila LM, Rodriguez-Molina C, Plasencia AL, Bielza-Lino P, Rodriguez-Del-Rincón A. 2002. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: current status and agroecological perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 55-65.
- Van Frankenhyuzen K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.
- Vendramim JD, Guzzo EC. 2009. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: Panizzi AR, Parra JRP (eds) *Bioecologia e Nutrição de Insetos: base para o manejo integrado de pragas*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 1055-1105.
- Wan P, Huang Y, Wu H, Huang M, Cong S, Tabashnik BE, Wu K. 2012. Increased frequency of pink bollworm resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in China. *PLoS One* 7: 1-9.
- Yamasaki A, Shimizu K, Eujisaki K. 2009. Effect of Host Plant Part on Larval Body-Color Polymorphism in *Helicoverpa Armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America* 102: 76-84.
- Zhuang L, Zhou Z, Wang Y, Liu Z, Xu R. 2011. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresource Technology* 102: 4820-4826.

Objetivo geral

Conhecer as variáveis relacionadas a bioecologia de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros e seu controle microbiano e biotecnológico. Para isso, foram desenvolvidos os seguintes estudos:

Manuscrito 1. Desempenho biológico de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros de importância econômica no Brasil.

Manuscrito 2. Efeito da soja *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).

Manuscrito 3. Efeito do algodão *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).

Manuscrito 4. Suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner em soja.

Hipóteses

1. A variabilidade de hospedeiros afeta a biologia de *H. armigera*.
2. A soja *Bt* causa sobrevivência diferencial entre os diferentes ínstaes da lagarta *H. armigera*.
3. Diferentes algodoeiros que expressam proteínas Cry de *Bt* afetam a sobrevivência dos diferentes ínstaes da lagarta *H. armigera*.
4. Os produtos formulados à base *Bt* afetam a sobrevivência dos diferentes ínstaes da lagarta *H. armigera*.

MANUSCRITO I

Desempenho biológico de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros de importância econômica no Brasil

(De acordo com as normas do periódico “Journal of Pest Science”, com adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande Dourados)

Desempenho biológico de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros de importância econômica no Brasil

Resumo O efeito do algodoeiro, feijoeiro, milho, soja, buva e uma dieta artificial de criação em laboratório (testemunha), sobre o desempenho da lagarta *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) foi testado em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas). A alimentação em folhas de soja, algodoeiro e feijoeiro permitiu o completo desenvolvimento (ovo–adulto), demonstrando que essas culturas são plantas hospedeiras favoráveis à manutenção da população de *H. armigera* em campo. As folhas de milho e buva foram inadequadas para a sobrevivência de *H. armigera*, nas quais ocorreu 100% de mortalidade dos indivíduos na fase larval. Quando as lagartas de *H. armigera* são alimentadas com o meristema do cartucho do milho, elas conseguem completar o estágio larval, se desenvolvem e se reproduzem. Já em buva, as lagartas se mantêm vivas temporariamente, porém não se desenvolvem normalmente, evidenciando que a buva atue apenas como um hospedeiro temporário para a espécie, em períodos que seus hospedeiros preferenciais e adequados, como soja, algodoeiro e feijoeiro, não estiverem disponíveis. Assim, o controle das plantas de buva, principalmente nos períodos de entressafra, é essencial para a quebra do ciclo da praga e diminuição da população de *H. armigera* em campo. Os resultados mostraram que o hospedeiro foi um fator significativo, afetando o desenvolvimento e a sobrevivência de *H. armigera*, contribuindo com informações para entender a adaptação da espécie nas novas condições que se encontra, após sua introdução no Brasil, e fornecendo subsídios para programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Palavras-chave *Conyza canadenses* · *Glycine max* · *Gossypium hirsutum* · *Phaseolus vulgaris* · preferência hospedeira · *Zea mays*

Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é conhecida por seu histórico de grandes surtos, dificuldade de controle e enormes prejuízos pelo Mundo (Alvi et al. 2012; Degrande e Omoto 2013), pois é polífaga e relatada como responsável por causar danos a diferentes culturas de importância econômica (Cunningham e Zalucki 2014).

Esta espécie é referida como uma das mais importantes pragas da Agricultura na Ásia, África, Europa e Austrália (Tay 2013). Recentemente a espécie foi identificada no Continente Americano, com sua ocorrência relatada em várias regiões e estados brasileiros, resultando em perdas econômicas significativas em cultivos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), milho (*Zea mays* L.), entre outras culturas (Czepak et al. 2013a; Embrapa et al. 2013; Specht et al. 2013; Leite et al. 2014; Sosa-Gómez et al. 2015). Em condições brasileiras a espécie apresenta grande capacidade de adaptação, com elevado crescimento populacional, distribuição ampla em diferentes regiões e capacidade de se alimentar e desenvolver em diferentes espécies hospedeiras (Czepak et al. 2013b; Embrapa et al. 2013).

A sucessão de cultivos ao longo do ano, que ocorre na paisagem agrícola do Brasil, aliada à alta polifagia de *H. armigera*, pode contribuir para o aumento da densidade populacional da espécie, uma vez que essa sucessão mantém uma disponibilidade contínua de hospedeiros cultivados em diferentes épocas do ano, além das plantas não cultivadas presentes nos agroecossistemas, o que pode favorecer a sobrevivência e viabilizar a permanência da espécie em campo ao longo de todo o ano. Porém, é importante ressaltar que a variação dos hospedeiros disponíveis pode interferir no ciclo de desenvolvimento de *H. armigera* (Razmjou et al. 2014), pois em sistemas de policulturas podem haver plantas hospedeiras e não hospedeiras (Altieri 1989). Plantas com mecanismos d podem afetar a biologia de um artrópode de forma leve a letal, diminuindo sua sobrevivência, dentre outros efeitos subletais e afetando sua ocorrência e dinâmica populacional (Lara 1991; Smith 2005; Vendramim e Guzzo 2009; Aoyama e Labinas 2012).

Assim, frente aos relatos da ocorrência de *H. armigera* em algodoeiro, feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), milho, soja e buva, (*Conyza canadenses* (L.) Cronquist), no Brasil, é importante entender como essas plantas integrantes do sistema de produção podem influenciar no desempenho, ocorrência, ataque e dinâmica populacional dessa espécie nas áreas de produção, uma vez que, conforme preconiza o Manejo Integrado de Pragas (MIP), a tomada decisão de controle deve levar em consideração o conhecimento básico da biologia do inseto na planta hospedeira (Santos et al. 2005) e a espécie *H. armigera* parece apresentar adaptações localizadas no uso de plantas hospedeiras conforme as diferentes regiões geográficas (Cunningham e Zalucki 2014).

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de folhas de diferentes plantas hospedeiras (algodoeiro, feijoeiro, milho, soja e buva) e uma dieta artificial (testemunha),

sobre o desempenho da lagarta *H. armigera* visando contribuir para a melhoria do sistema de MIP dessa espécie.

Material e Métodos

Cultivo de plantas

As plantas de algodoeiro (cultivar DeltaOpal®), feijoeiro-preto, milho (híbrido Roundup Ready 2™ - DuPont Pioneer) e soja (variedade BMX Potência RR) foram cultivadas, sem inseticidas, sob condições de campo na área experimental do Laboratório de Entomologia Aplicada da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, seguindo todas as recomendações para as culturas, exceto o uso de inseticidas.

As folhas e o ápice caulinar de buva foram coletadas em plantas que ocorrem de forma espontânea em áreas, livres de controle químico, na região de Dourados.

Multiplicação de insetos

A criação de *H. armigera* foi estabelecida a partir de lagartas coletadas em agroecossistemas de soja, em São Gabriel do Oeste, MS, em novembro de 2014 e identificadas pela técnica de PCR-RFLP (Behere et al. 2008). As lagartas foram mantidas em potes plásticos de 100 ml, e alimentadas com dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e farelo de soja (Greene et al. 1976) até atingirem o estágio de pupa. As pupas foram acondicionadas em placas de Petri contendo vermiculita. Após a emergência, os adultos foram mantidos, em sala climatizada [$25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas], em tubos de PVC (15 cm de diâmetro e 22 cm de altura) cobertos na parte inferior com uma placa de Petri e na parte superior com tecido tule, e revestidos internamente com folhas de papel sulfite A4 como substrato de oviposição. Para alimentação, ofertou-se uma solução de mel a 10% embebida em algodão que foi colocado na parte superior sobre o tecido tule. Os ovos depositados no papel e no tecido tule foram transferidos para sacos plásticos (2 Kg) previamente umedecidos com água destilada. A troca do alimento e retirada das posturas foram feitas diariamente.

Experimentos

Para realização dos experimentos utilizou-se ovos da 2ª postura da primeira geração de laboratório, visando evitar os potenciais efeitos de endogamia e seleção (tal como a seleção de fêmeas que mostram pouca discriminação para sítios de oviposição e larvas que se

desenvolvem melhor em dietas artificiais) que ocorrem na população após várias gerações criadas em laboratório (Cunningham e Zalucki 2014).

Os alimentos testados foram folhas completamente expandidas de algodoeiro, folhas de feijoeiro, folhas de milho, folhas de soja, folhas de buva e dieta artificial (testemunha) ofertadas às lagartas neonatas. Devido à elevada mortalidade das lagartas neonatas alimentadas com folhas completamente expandidas de milho e de buva, dois bioensaios adicionais foram realizados: o primeiro com lagartas neonatas de *H. armigera* alimentadas com o meristema do cartucho de milho (MCM) e ápice caular da buva e o segundo com lagartas que apenas no quarto ínstar (até nove dias de vida foram alimentadas com folhas de soja) iniciaram alimentação em folhas completamente expandidas de milho e buva, visando testar se a textura do alimento e a idade das lagartas iriam influenciar o desenvolvimento e sobrevivência larval.

Foram individualizadas 50 lagartas, recém-eclodidas, para cada alimento testado, em potes plásticos de 100 ml forrados com papel filtro. Os alimentos foram trocados a cada dois dias ou conforme consumo (exceto para a dieta artificial) até a fase de pré-pupa, período em que as lagartas cessam a alimentação. Para os bioensaios adicionais cada tratamento foi formado por 40 repetições.

Vinte quatro horas após a observação das pupas, elas foram pesadas em balança analítica e acondicionadas em potes plásticos de 100 ml contendo vermiculita.

Para avaliação do desenvolvimento das fases imaturas de *H. armigera*, nos tratamentos utilizados, as variáveis biológicas medidas foram: duração (dias) e sobrevivência (%) das fases imaturas, biomassa de pupas (médio e por sexo).

Para avaliação da influência dos tratamentos sobre a biologia dos adultos, foram formados 10 casais de acordo com a data de emergência e sobrevivência dos respectivos tratamentos nas fases imaturas. Os casais de adultos foram acomodados em gaiolas de tubos de PVC (10 cm de diâmetro e 15 cm de altura) e mantidos nas mesmas condições da criação. As folhas de papel A4, o tecido tule e o algodão contendo os ovos foram removidos e contados diariamente, e os ovos acondicionados em sacos plásticos até a eclosão das lagartas. A viabilidade dos ovos foi feita através do registro da eclosão das larvas, durante todo o período de oviposição.

Para avaliar o desempenho reprodutivo de *H. armigera*, as variáveis biológicas consideradas foram: fecundidade (diária e total), viabilidade dos ovos, período de incubação, longevidade (macho e fêmea), período de pré-oviposição e oviposição.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk ($p > 0.05$). Como os dados não alcançaram a normalidade, estes foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis (5%) para comparar os diferentes tratamentos. Um modelo de regressão polinomial foi utilizado para a avaliação do comportamento de oviposição das fêmeas ao longo do tempo. Para os experimentos adicionados foi realizado o teste de Mann Whitney (5%). O número de repetições ao longo dos estudos variou conforme a sobrevivência do inseto em cada tratamento. Quando avaliada a sobrevivência, consideraram-se grupos de cinco indivíduos como uma repetição.

Resultados

O período de incubação dos ovos não foi influenciado pelos tratamentos avaliados (Tabela 1). Quando alimentada com folhas completamente expandidas de milho e buva, *H. armigera* não completou o desenvolvimento larval, vivendo em média 6,2 e 23,5 dias, respectivamente. Nos demais tratamentos, o período larval foi menor em dieta artificial (15,5 dias) e o maior em folhas de feijoeiro (20,2 dias), com valores intermediários em folhas de algodoeiro e folhas de soja, as quais não diferiram significativamente entre si (Tabela 1).

Nos tratamentos que permitiram com que *H. armigera* completasse o desenvolvimento larval, a duração média da fase de pré-pupa diferiu significativamente apenas entre a dieta artificial e folhas de feijoeiro (Tabela 1). A duração média de pupas oriundas de soja, algodoeiro e feijoeiro não diferiu estatisticamente e foi menor que a duração das pupas oriundas da dieta artificial. A biomassa das pupas de *H. armigera* foi afetada pelos tratamentos propostos, havendo diferenças estatísticas na biomassa média, de machos e de fêmeas (Tabela 1). A biomassa média das pupas variou de 381,5 mg em dieta artificial a 221,6 mg em feijoeiro, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos folhas de soja e folhas de algodoeiro.

A sobrevivência das fases de larva, pré-pupa e pupa foi afetada significativamente pelos tratamentos (Figura 1). A sobrevivência larval de *H. armigera* foi afetada quando mantida em folhas de milho e buva, nas quais ocorreu 100% de mortalidade dos indivíduos (Figura 1). Em dieta artificial e soja a sobrevivência das lagartas e pré-pupas foi maior em relação ao feijoeiro. O algodoeiro apresentou valores intermediários de sobrevivência não diferindo dos demais tratamentos. Na fase de pupa, apenas a soja e o feijoeiro diferiram entre si, sendo que esses tratamentos apresentaram as maiores (86%) e menores (58%) porcentagens de sobrevivência, respectivamente (Figura 1).

O tempo médio de sobrevivência das lagartas de 4º ínstar, quando alimentadas com folhas completamente expandidas de milho e buva, foi maior em buva, $13,4 \pm 1,36$ dias, que em milho, $4,2 \pm 0,52$ dias, porém as lagartas não completaram o estágio larval em nenhum desses tratamentos. A mortalidade de 100% dos indivíduos ocorreu aos 15 dias em milho e aos 27 dias em buva (Figura 2).

Em relação às lagartas neonatas alimentadas com MCM e ápice caulinar da buva, apenas o MCM permitiu que as lagartas completassem o desenvolvimento larval e possibilitou o desenvolvimento e a reprodução de *H. armigera* (Tabela 2), enquanto que o ápice caulinar da buva ocasionou a mortalidade de 100% dos indivíduos, aos 36 dias, antes que completassem a fase larval (Figura 3).

Não houve diferença significativa para as variáveis longevidade de machos e fêmeas, período de oviposição, fecundidade (ovos/fêmea), viabilidade dos ovos e ciclo total (lagarta-adulto) de *H. armigera* (Tabela 3). O período de pré-oviposição foi afetado pelos tratamentos testados, havendo diferença significativa entre dieta artificial, 2,4 dias, e folhas de feijoeiro, 3,7 dias. Apesar de não terem sido constatadas diferenças significativas, a fecundidade total desta espécie variou de 1000,5 a 1780,6 ovos e a viabilidade dos ovos variou de 30,3 a 57% (Tabela 3).

O comportamento de oviposição foi semelhante em dieta artificial, folha de algodoeiro, folhas de feijoeiro e em meristema do cartucho do milho, ajustando-se a equação polinomial de quarto grau ($P < 0,05$) (Figura 4 A, C, D e E). Mesmo os dados de oviposição ajustados à mesma equação de regressão, os pontos de máxima produção de ovos variaram conforme o alimento ofertado às lagartas, os quais ocorreram ao terceiro, quarto, quarto e sexto dia, respectivamente para folha de feijoeiro, meristema do cartucho do milho, folha de algodoeiro e dieta artificial. Nesses dias a máxima produção correspondeu a 182,25, 187,35, 282,03 e 133,41 ovos/fêmea, respectivamente.

A curva mais ajustada para a análise de regressão entre a média de ovos/fêmea e o período de oviposição, quando a fase imatura de *H. armigera* foi alimentada em folhas de soja, foi a polinomial de terceiro grau com coeficiente de determinação de 0,9245 ou 92,45% (Figura 4 B). Observa-se que no primeiro dia de oviposição houve grande produção de ovos (180,88 ovos/fêmea), aumentando gradativamente até o quarto dia, que correspondeu ao ponto de máxima produção (222,58 ovos/fêmea). A partir desse ponto houve uma tendência decrescente no número de ovos/fêmea, assemelhando-se aos demais tratamentos.

De modo geral o período de oviposição de fêmeas de *H. armigera* sofreu influência em relação ao alimento ofertado e ao longo do tempo, no entanto, pode-se inferir que a máxima produção de ovos ocorre entre o terceiro e sexto dia após o início da oviposição.

Discussão

O desenvolvimento e sobrevivência de *H. armigera* foram afetados pelos alimentos avaliados. Essa variação no desempenho biológico da espécie foi relatada em outras comparações dos efeitos de diferentes plantas (Hemati et al. 2013; Razmjou et al. 2014), uma vez que, o crescimento e o desenvolvimento de insetos herbívoros esta intimamente relacionada a qualidade da planta hospedeira (Liu et al. 2010).

A mortalidade de 100% dos indivíduos na fase larval em folhas completamente expandidas de milho e buva permite evidenciar que *H. armigera* não consegue se estabelecer nessas estruturas, sugerindo a inadequabilidade nutricional destes dois alimentos. Esses resultados são corroborados por Carvalho et al. (2014) que também relataram a inadequação dessas folhas para a espécie completar seu ciclo biológico. Alguns fatores de resistência de plantas como a presença de toxinas e de estruturas na planta que inibem a alimentação ou até mesmo a baixa qualidade nutricional do hospedeiro (Vendramim e Guzzo 2009) podem ter promovido à elevada mortalidade de *H. armigera* alimentada com folhas dessas plantas. Smith (2005) cita, por exemplo, relato de fatores de resistência do grão de bico, *Cicer arietinum* L., para *H. armigera*. De acordo ainda com este autor, a antibiose, mecanismo de resistência de plantas, cujos efeitos sobre a biologia de artrópodes são negativos e resultantes de fatores fisiológicos ou químicos podem causar alterações que variam desde leves até letal. Além disso, algumas características como a textura e consistência da epiderme da planta, e os apêndices ou formações nela encontrados, podem dificultar ou impedir alimentação das larvas de primeiro ínstar e afetar negativamente sua sobrevivência, dentre outros efeitos subletais (Lara 1991; Vendramim e Guzzo 2009; Aoyama e Labinas 2012) atuando como mecanismos de defesa contra a herbivoria por insetos (Aoyama e Labinas 2012).

Neste estudo, as folhas completamente expandidas de milho e buva causaram a mortalidade de 100%, tanto em lagartas neonatas como em lagartas de 4º ínstar, enquanto que, o MCM permitiu o completo desenvolvimento larval, bem como a reprodução de *H. armigera*, uma vez que, o tecido vegetal nessa região da planta de milho é mais tenro. Esses resultados são justificados pelo fato da qualidade nutricional da folha, geralmente, mudar com a idade, pois os conteúdos de água e de nitrogênio diminuem, enquanto o conteúdo de fibras e

rigidez aumentam em folhas maduras das plantas. Assim, dependendo da adaptação da espécie, em alguns insetos herbívoros a alimentação em folhas mais jovens promove maior desenvolvimento, sobrevivência e aumento de biomassa (Bellanda e Zucoloto 2009).

No caso do milho, a rigidez das folhas completamente expandidas pode ter exercido importante influência na mortalidade das lagartas, pois as lagartas apresentaram uma mortalidade muito alta já nos primeiros dias de alimentação e aparentemente não se alimentavam, pois haviam poucas fezes e sinais de alimentação nas folhas, possivelmente em função da fragilidade do aparelho bucal das lagartas recém-eclodidas, que ainda possuem as mandíbulas em formação e isso dificulta a alimentação, afetando inclusive a ingestão (Bellanda e Zucoloto 2009) e podendo até interferir nos processos de digestão, resultando em baixas taxas de crescimento (Vendramim e Guzzo 2009). Bellanda e Zucoloto (2009) citando Hedin et al. (1990) relatam, por exemplo, que o alto conteúdo de hemicelulose no milho explica parcialmente a resistência contra lagartas recém-eclodidas da espécie *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Além disso, um estudo recente de demografia e variabilidade genética revela que em milho *H. armigera* foi encontrada somente em um local, na região Nordeste, durante o verão e não foi encontrada em milho nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, diferentemente de outras culturas, como feijão e algodão, as quais a espécie estava amplamente distribuída, nos dois períodos de cultivo, em todo Centro-Oeste e Nordeste do país (Leite et al. 2014), evidenciando mais um vez uma possível não preferência da espécie pela cultura do milho.

Ressalta-se que em buva, as lagartas neonatas e de 4º ínstar mantiveram-se vivas por um longo período, o que corrobora com os relatos de ocorrência da espécie nesta planta em campo, porém observou-se que as lagartas não ultrapassaram o estágio larval, apresentaram desenvolvimento lento e morreram antes de se tornarem pré-pupa. Esses resultados evidenciam a inadequação desta planta como hospedeira para *H. armigera*, pois uma planta hospedeira permite a sobrevivência e o desenvolvimento de larvas e contribui para a reprodução dos adultos da população (Cunningham e Zalucki 2014).

Essa inadequação ao hospedeiro pode estar relacionada à pilosidade das folhas de buva. Plantas do gênero *Conyza* possuem grande pilosidade na parte aérea (Andrade et al. 2012) e a pilosidade representada pela presença de tricomas é um dos mais importantes fatores de resistência de plantas (Vendramim e Guzzo 2009). Além desse fator, a mortalidade pode estar associada à presença de compostos químicos não proteicos de defesa produzidos pelas plantas, que precisam ser investigados.

Mesmo ocorrendo mortalidade total da espécie em buva, a ocorrência das lagartas nessas plantas pode ser devido ao fato de que as mariposas, na ausência dos hospedeiros preferenciais, podem colocar seus ovos em plantas menos preferidas (Cunningham e Zalucki 2014). O longo período de sobrevivência larval observado neste hospedeiro, neste estudo, demonstra que em campo a buva pode estar sendo utilizada como um alimento temporário para manutenção da espécie na ausência de seus hospedeiros favoráveis ou até a presença de alimentos que permitam o seu completo desenvolvimento (Santos et al. 2005), o que evidencia a importância da destruição dessas plantas auxiliando na quebra do ciclo da praga.

As folhas de feijoeiro, quando comparadas aos demais tratamentos que permitiram que *H. armigera* completasse o seu desenvolvimento, promoveram um alongamento da fase larval o que consequentemente resultou em uma menor biomassa de pupas e uma menor sobrevivência das fases imaturas nesta planta. Diferentes plantas hospedeiras afetam o tamanho das larvas e pupas e podem influenciar também na ocorrência de diapausa em *H. armigera* (Liu et al. 2010). Esses resultados indicam que as folhas de feijoeiro podem não ser tão adequadas à alimentação por larvas de *H. armigera* quando comparadas às demais folhas testadas neste estudo. Essa inadequação pode estar relacionada a fatores de resistência da planta, pois, por exemplo, quando os indivíduos sobrevivem aos efeitos diretos da antibiose podem sofrer efeitos deletérios como prolongamento dos períodos de desenvolvimento das fases imaturas, redução do peso corporal e até mesmo redução da fecundidade (Smith 2005; Vendramim e Guzzo 2009). Assim, podem haver diferenças na qualidade nutricional ou compostos secundários dos hospedeiros testados (Razmjou et al. 2014) em relação ao feijoeiro, para *H. armigera*, pois o valor nutritivo de um hospedeiro para uma espécie está diretamente relacionado com o desempenho dos indivíduos naquele hospedeiro (Bellanda e Zucoloto 2009). Testes sobre o efeito de diferentes variedades de soja no desenvolvimento de *H. armigera* comprovaram que algumas variedades não são hospedeiras adequadas para esta espécie (Naseri et al. 2011).

O menor período larval e a maior biomassa de pupas em soja e algodoeiro evidenciam a melhor qualidade desses hospedeiros em relação ao feijoeiro. O desenvolvimento larval mais rápido, sem redução de biomassa, permite inferir que o hospedeiro é mais adequado para o desenvolvimento do inseto (Boregas et al. 2013), permitindo ao inseto atingir a fase adulta e se reproduzir mais rápido, resultando em um maior número de gerações em um menor período de tempo e diminuindo o tempo de exposição a fatores bióticos e abióticos desfavoráveis a sua sobrevivência em campo e favorecendo a reprodução (Bellanda e Zucoloto 2009).

De maneira geral, em relação às fases imaturas observa-se que em folhas de soja e algodoeiro as variáveis biológicas são semelhantes revelando que o desenvolvimento da *H. armigera* não varia entre essas culturas.

Em relação as variáveis reprodutivas observaram-se que houve variações, porém essas não foram significativas. Ressalta-se que o período de pré-oviposição em feijoeiro foi maior em relação à dieta artificial, evidenciando mais uma vez a menor adequação deste hospedeiro para *H. armigera* em relação aos demais. O prolongamento do período de pré-oviposição é uma estratégia reprodutiva dos insetos, que permite acumular energia e nutrientes necessários para desencadear os processos reprodutivos de ovogênese e oviposição (Parra et al. 2009).

Os resultados deste estudo mostraram que o hospedeiro foi um fator significativo afetando o desenvolvimento e a sobrevivência de *H. armigera*, contribuindo com informações para entender a adaptação da espécie nas novas condições que se encontra, após sua introdução no Brasil e fornecendo subsídios para programas de MIP. Apesar de algumas variáveis do feijoeiro iniciarem uma qualidade nutricional inferior em relação às demais culturas testadas, constatou-se que folhas de soja, algodoeiro e feijoeiro proporcionaram a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução de *H. armigera*, confirmando que este lepidóptero é uma praga com grande potencial de multiplicação nas principais culturas agrícolas de importância econômica no Brasil. Além disso, esse estudo revela que folhas completamente expandidas de milho não permitem o desenvolvimento de lagartas de *H. armigera*, no entanto no meristema do cartucho do milho a espécie se desenvolve e se reproduz normalmente. Em buva, as lagartas se mantêm temporariamente vivas, porém não se desenvolvem, evidenciando que essa planta atue apenas como um hospedeiro temporário para a espécie em períodos que seus hospedeiros preferenciais e adequados, como soja, algodoeiro e feijoeiro, não estiverem disponíveis em campo. Assim, a destruição das plantas de buva, principalmente nos períodos de entressafra, é essencial para a quebra do ciclo da praga e diminuição da população de *H. armigera* em campo.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão de bolsa de Doutorado (Processo nº 23/200.733/2013). A José Jairo da Silva da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja) pela colaboração com as técnicas de PCR-RFLP para identificação molecular da espécie.

Referências

- Altieri M (1989) Agroecologia: As bases científicas de agricultura alternativa. PTA-FASE, Rio de Janeiro
- Alvi AHK, Sayyed AH, Nae M, Ali M (2012) Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. PLoS ONE 7:1-9
- Andrade DJ, Correia NM, Barbosa CL, Oliveira CAL (2012) Aspectos biológicos do ácaro *Brevipalpus phoenicis* vetor da leprose dos citros em plantas de buva (*Conyza canadensis*). Planta Daninha 30: 97-103
- Aoyama EM and Labinas AM (2012) Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos. Enciclopédia Biosfera 8: 365-386
- Behere GT, Tay WT, Russell DA, Batterham P (2008) Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). Bull Entomol Res 98: 599–603
- Bellanda HCHB, Zucoloto FS (2009) Lagartas desfolhadoras (Lepidoptera). In: Panizzi AR, Parra JRP (eds) Bioecologia e Nutrição de Insetos: base para o manejo integrado de pragas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 425-464
- Boregas KGB, Mendes SM, Waquil JM, Fernandes GW (2013) Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. Bragantia 72: 61-70
- Carvalho SSS, Mendes SM, Santos AE, Vilela M Araujo OG (2014) Aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada com buva (*Conyza canadensis*). Embrapa Milho e Sorgo. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106836/1/Aspectos-biologicos.pdf>. Acessado 21 de janeiro de 2016
- Cunningham JP, Zalucki MP (2014). Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? J Econ Entomol 107: 881–896.
- Czepak C, Albernaz KC, Vivan LM, Guimarães HO, Carvalhais T (2013a) Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Pesquisa Agropecuária Tropical 43:110-113
- Czepak C, Vivan LM, Albernaz KC (2013b) Pragas da vez. Cultivar 167: 20-27
- Degrande PE, Omoto C (2013) Pragas: Estancar prejuízos. Cultivar 167:30-34.

- EMBRAPA (2013) Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Brasil. [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manejo-Helicoverpa%20\(2\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manejo-Helicoverpa%20(2).pdf). Acessado em 21 de janeiro de 2016
- Greene GL, Leppla NC, Dickerson W (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J Econ Entomol 69: 487-488
- Hemati SA, Naseri B, Razmjou J (2013) Reproductive performance and growth indices of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. J. Crop Prot 2: 193-208
- Lara FM (1991) Princípios de resistência de plantas a insetos. Ícone, São Paulo
- Leite NA, Alves-Pereira A, Corrêa AS, Zucchi MI, Omoto C (2014) Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. PLoS ONE 9: 1-7 e113286
- Liu Z, Gong P, Li D, Wei W (2010) Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by larval host plants: pupal weight is important. J Insect Physiol 56: 1663-1670
- Naseri B, Fathipour Y, Moharramipour S, Hosseiniaveh V (2011) Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. J Agri Sci Tech 13: 17-26
- Parra JRP, Panizzi AR, Haddad ML (2009) Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos. In: Panizzi AR, PARRA JRR (eds) Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 37-90
- Razmjou J, Naseri B, Hemati AS (2014) Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. J Pest Sci 87: 29-37
- Santos KB, Meneguim AM, Neves PMOJ (2005) Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. Neotrop Entomol 34: 903-910
- Smith CM (2005) Antibiosis: adverse effects of resistance on arthropod biology. In: Smith CM (ed) Plant resistance to arthropods: Molecular and conventional approaches. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 65-100
- Sosa-Gomez DR, Specht A, Paula-Moraes SV, Lopes-Lima A, Yano SAC, Micheli A, EGF Morais EGF, Gallo P, Pereira PRVS, Salvadori JR, Botton M, Zenker MM, Azevedo-Filho WS (2015) Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera*

(Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. Rev Bras Entomol doi: 10.1016 / j.rbe.2015.09.008.

- Specht A, Sosa-Gomez DR, Paula-Moraes SV, Yano SAC (2013) Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. Pesqui Agropecu Bras 48: 689-692
- Tay WT, Soria MF, Walsh T, Thomazoni D, Silvie P, Gajanan TB, Craig A, Sharon D (2013) A brave new world for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. PLoS ONE 8:1-7
- Vendramim JD, Guzzo EC (2009) Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: Panizzi AR, Parra JRP (eds) Bioecologia e Nutrição de Insetos: base para o manejo integrado de pragas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 1055-1105

Tabela 1. Média ($\pm$ EP) de duração (dias) das fases imaturas, biomassa (mg) total, de fêmeas e machos de pupas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) mantidas em dieta artificial, folhas completamente expandidas de algodoeiro, feijoeiro, milho, soja e buva em seu estágio larval em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ$ C, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

Tratamentos	Duração das fases imaturas (dias)				Biomassa de pupa (mg)		
	Ovo ^{ns}	Larva ¹	Pré-pupa ¹	Pupa ¹	Macho ¹	Fêmea ¹	Médio ¹
Dieta artificial	3,0 $\pm$ 0,00	15,5 $\pm$ 0,18 a	2,85 $\pm$ 0,10 b	14,91 $\pm$ 0,15 b	394,6 $\pm$ 6,84 a	377,0 $\pm$ 6,76 a	381,5 $\pm$ 4,33 a
Folhas de soja	3,0 $\pm$ 0,00	18,3 $\pm$ 0,17 b	2,83 $\pm$ 0,17 ab	13,54 $\pm$ 0,13 a	283,4 $\pm$ 4,65 b	273,5 $\pm$ 6,64 b	278,5 $\pm$ 3,61 b
Folhas de algodoeiro	3,0 $\pm$ 0,00	18,6 $\pm$ 0,26 b	2,50 $\pm$ 0,08 ab	13,26 $\pm$ 0,12 a	303,7 $\pm$ 9,80 b	279,4 $\pm$ 4,50 b	289,6 $\pm$ 5,11 b
Folhas de feijoeiro	3,0 $\pm$ 0,00	20,2 $\pm$ 0,40 c	2,42 $\pm$ 0,10 a	13,28 $\pm$ 0,18 a	233,1 $\pm$ 8,89 c	211,8 $\pm$ 4,65 c	221,65 $\pm$ 5,73 c
Folhas de milho	-	6,2 $\pm$ 0,33*	-	-	-	-	-
Folhas de buva	-	23,5 $\pm$ 1,69*	-	-	-	-	-
Valor de p	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

^{ns}Não significativo pelo teste de Kruskal Wallis a 5%.

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade.

* Indivíduos não completaram o estágio para realização dos testes estatísticos.

Tabela 2. Média ($\pm$ EP) das variáveis biológicas de lagartas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) mantidas em meristema do cartucho do milho e ápice caulinar de buva em seu estágio larval em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

		Meristema do cartucho do milho	Ápice caulinar de buva
Duração das fases imaturas (dias)	Ovo	3,0 $\pm$ 0,00	-
	Larva	21,4 $\pm$ 0,36	20,9 $\pm$ 1,35
	Pré-pupa	2,3 $\pm$ 0,16	-
	Pupa	12,4 $\pm$ 0,21	-
Biomassa de pupa (mg)	Macho	253,0 $\pm$ 0,01	-
	Fêmea	227 $\pm$ 0,01	-
	Médio	230,0 $\pm$ 0,00	-
Longevidade (dias)	Fêmea	15,3 $\pm$ 1,62	-
	Macho	17,9 $\pm$ 1,62	-
Ciclo total (lagarta-adulto) (dias)		50,1 $\pm$ 1,18	-
Pré-oviposição (dias)		3,9 $\pm$ 0,31	-
Oviposição (dias)		11,6 $\pm$ 1,45	-
Total de ovos/fêmeas		1534,8 $\pm$ 252,24	-
Total de larvas/Fêmeas		722,0 $\pm$ 219,57	-
Viabilidade (%)		41,5 $\pm$ 8,48	-

Não se procedeu com as análises estatísticas, pois as lagartas alimentadas com ápice caulinar de buva não completaram o estágio larval.

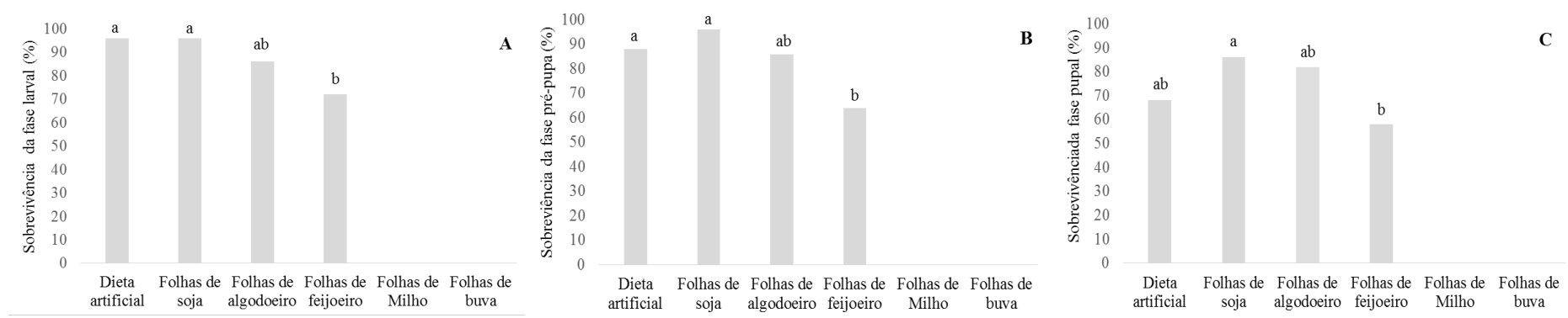


Figura 1. Sobrevivência fase larval (A), fase pré-pupa (B) e fase pupal (C) de lagartas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) oriundas de alimentação em dieta artificial, folhas de soja, algodoeiro, feijoeiro, milho e buva em sua fase larval em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre os tratamentos pelo teste de Kruskal Wallis a 5%.

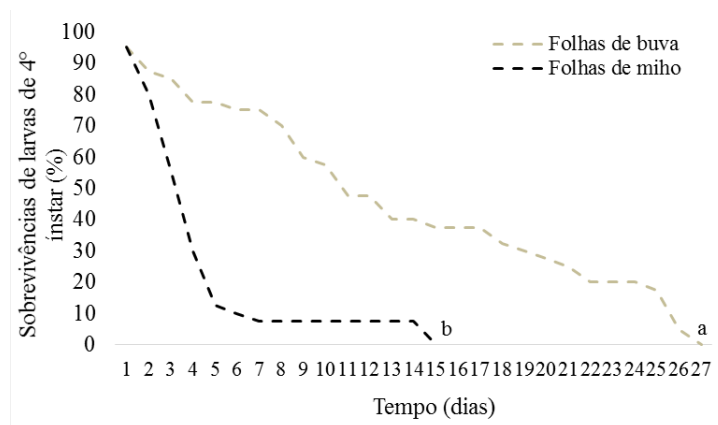


Figura 2. Sobrevivência de lagartas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) que no 4º ínstar iniciaram alimentação em folhas completamente expandidas de milho e buva em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Significativo pelo teste de Mann Whitney a 5%.

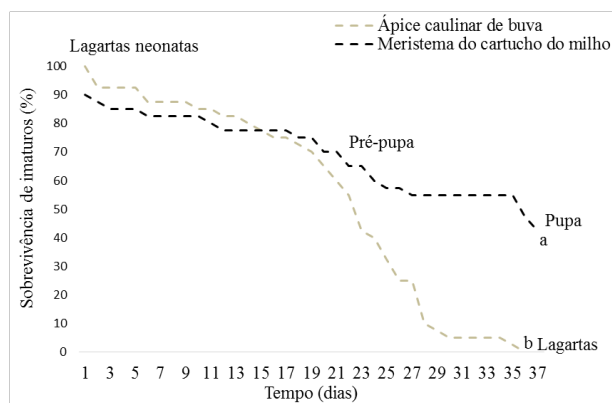


Figura 3. Sobrevivência das fases imaturas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada com ápice caulinar da buva e meristema do cartucho do milho em sua fase larval em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Significativo pelo teste de Mann Whitney a 5%.

Tabela 3. Média ($\pm$ EP) da longevidade de fêmeas e machos (dias), períodos de pré-oviposição (dias) e oviposição (dias), número total de ovos e larvas/fêmeas, viabilidade (%) e ciclo total (dias) de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) criada em dieta artificial e folhas completamente expandidas de algodoeiro, feijoeiro, soja durante a fase larval em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ$ C, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Tratamentos	Longevidade (dias)		Pré- oviposição ¹	Oviposição ^{ns}	Total de ovos/ fêmea ^{ns}	Total de larvas/ fêmea ^{ns}	Viabilidade de ovos ^{ns}	Ciclo total (larva- adulto) ^{ns}
	Fêmeas ^{ns}	Machos ^{ns}						
Dieta artificial	13,0 $\pm$ 1,59	11,8 $\pm$ 1,28	2,40 $\pm$ 0,16 b	10,6 $\pm$ 1,60	1000,5 $\pm$ 252,27	507,8 $\pm$ 219,29	30,3 $\pm$ 10,86	44,7 $\pm$ 0,99
Folhas de soja	13,3 $\pm$ 1,07	16,7 $\pm$ 1,72	3,20 $\pm$ 0,13 ab	10,9 $\pm$ 1,05	1780,6 $\pm$ 300,73	1260,8 $\pm$ 287,85	55,1 $\pm$ 12,17	46,7 $\pm$ 1,06
Folhas de algodoeiro	11,3 $\pm$ 1,02	17,5 $\pm$ 1,73	3,40 $\pm$ 0,45 ab	8,50 $\pm$ 1,12	1622,4 $\pm$ 286,27	1149,7 $\pm$ 257,93	57,0 $\pm$ 10,44	46,0 $\pm$ 1,24
Folhas de feijoeiro	11,5 $\pm$ 1,01	13,66 $\pm$ 1,2 9	3,70 $\pm$ 0,39 a	8,10 $\pm$ 1,02	1080,8 $\pm$ 219,88	741,4 $\pm$ 186,30	49,8 $\pm$ 11,57	45,9 $\pm$ 0,90
Valor de p	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5%.

^{ns}Médias não significativas pelo teste de Kruskal Wallis a 5%.

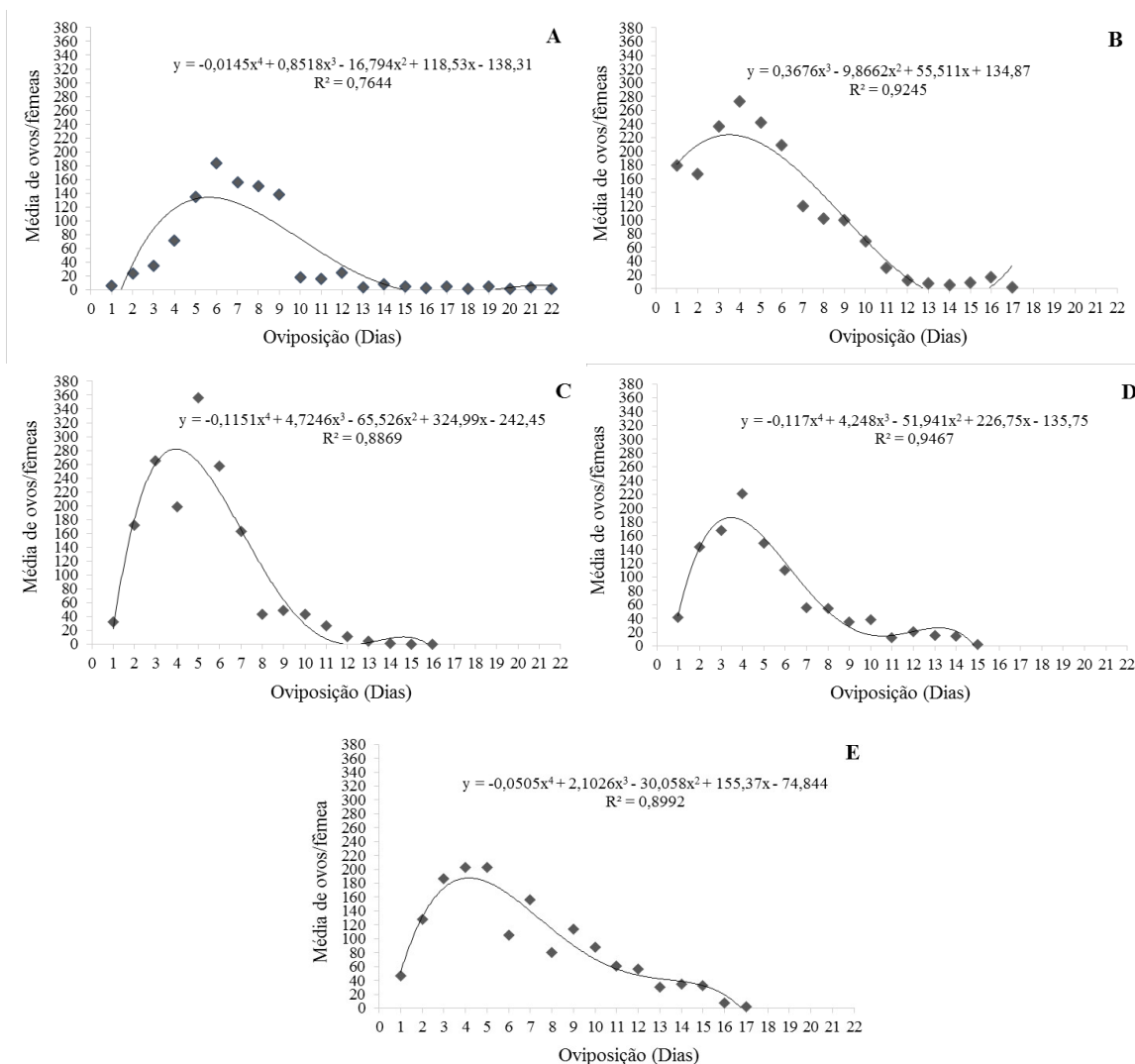


Figura 4. Número total de ovos de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ao longo do período de oviposição oriundas de alimentação em dieta artificial (A), folhas de soja (B), algodoeiro (C), feijoeiro (D) e meristema do cartucho do milho (E) em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\% \text{UR}$ e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

MANUSCRITO II

Efeito da soja *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

Journal of Agricultural Science, v. 7, p. 90-94, 2015

(De acordo com as normas do periódico “Journal of Agricultural Science”, com adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande Dourados)

Efeito da soja *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) Lepidoptera:
Noctuidae)

Resumo

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) causa danos econômicos significativos na cultura da soja *Glycine max* (L.) Merrill. A soja geneticamente modificada que expressa a proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner, tóxica a algumas espécies de lepidópteros, é potencialmente uma ferramenta alternativa para o manejo dessa praga. Seis bioensaios com lagartas de cada ínstar de *H. armigera* alimentadas com folhas de plantas de soja *Bt* (Cry1Ac) foram realizados para avaliar a sobrevivência larval. O delineamento experimental de cada bioensaio foi inteiramente casualizado, formado por dois tratamentos (soja *Bt*, Cry1Ac, e soja não- *Bt*) e quarenta repetições (lagartas individualizadamente dispostas). A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente. A soja *Bt* afetou o tempo médio de sobrevivência dos indivíduos em cada ínstar, mas sua eficácia não foi afetada pela idade larval de *H. armigera* causando 100% de mortalidade dos indivíduos em todos os seis, indicando que a soja *Bt* que expressa a proteína Cry1Ac é uma tática de controle eficiente para este lepidóptero praga.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, eficácia, Heliothinae, ínstar, MIP, MON 87701, sobrevivência larval

1. Introdução

Lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) são conhecidas por seu histórico de grandes surtos populacionais, dificuldade de controle e enormes prejuízos pelo Mundo (Alvi et al., 2012; Degrande & Omoto, 2013). A espécie é polífaga e relatada como responsável por causar danos a diferentes culturas de importância econômica, como o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), leguminosas em geral, sorgo (*Sorghum bicolor* L.), milho (*Zea mays* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Liu et al., 2010; Cpezak et al., 2013b).

Helicoverpa armigera referida como uma das mais importantes pragas da Agricultura na Ásia, África, Europa e Austrália (Tay, 2013); recentemente foi identificada no Continente Americano, com sua ocorrência relatada em vários estados brasileiros e em várias culturas agrícolas, dentre elas a soja *Glycine max* (L.) Merrill (Czepak et al., 2013a; Specht et al., 2013). Após a sua detecção na América do Sul, observa-se que a espécie apresenta grande adaptabilidade, elevada taxa de reprodução, ampla distribuição

em diferentes localidades e enorme capacidade de alimentar e se desenvolver em diferentes espécies hospedeiras, o que resulta em perdas econômicas significativas para a Agricultura, devido às dificuldades encontradas para o controle eficaz da praga (Cpezak et al., 2013b), em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Em soja *H. armigera* apresenta grande potencial de destruição das estruturas vegetativas e reprodutivas das plantas, exigindo a adoção de táticas de controle para evitar perdas na produção. Tradicionalmente, o controle químico é a principal tática para o manejo desta espécie, porém a mesma é conhecida por evoluir rapidamente a resistência aos inseticidas (Kranthi et al., 2002; Torres-Vila et al., 2002; Bués et al., 2005; Alvi et al., 2012). A soja *Bt* que expressa proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner é potencialmente uma tática de controle alternativa aos inseticidas químicos para gerenciar a população de *H. armigera*, uma vez que pode ser utilizada no manejo da espécie (Yu et al., 2013). De outro lado, a espécie *H. armigera* não é listada como praga-alvo desta tecnologia no Brasil, uma vez que a introdução da praga no país ocorreu após a autorização comercial da soja *Bt* dada pelas autoridades governamentais brasileiras; estudos prévios com a espécie não foram feitos para avaliar a efetividade de controle da praga. Não há artigos que reportam a mortalidade de *H. armigera* de diferentes ínstares na soja *Bt*. A pouca literatura existente se deve ao fato dessa soja estar sendo lançada primariamente no Brasil.

Cita-se que as tecnologias derivadas de *B. thuringiensis* podem ter suas eficácias de controle afetadas ao longo do desenvolvimento larval de lepidópteros (Rausell et al., 2000; González-Cabrera et al., 2011). González-Cabrera et al. (2011), Aggarwal et al. (2006), Rausell et al. (2000) e James et al. (1999) relatam que insetos em ínstares avançados comumente são mais tolerantes a inseticidas biológicos e proteínas purificadas de *Bt*. Bernardi et al. (2012) relatam que ínstares avançados são presumivelmente mais tolerantes às proteínas de *Bt* e assim a mortalidade larval nestes ínstares evidencia a elevada suscetibilidade da espécie a essas toxinas. De maneira geral, quanto mais avançado o instar maior será a dificuldade de controle, pois a lagarta precisa ingerir maior quantidade de tecido para causar a letalidade e consequentemente poderia haver danos na planta.

Também, devido à disponibilidade sequencial de hospedeiros alternativos em campo, eles podem viabilizar o desenvolvimento inicial das lagartas e permitir a dispersão das mesmas para as plantas de soja *Bt*, nos diferentes ínstares de desenvolvimento, e causar algum tipo de dano. Por exemplo, tem sido comum encontrar lagartas de *H. armigera* na

palhada e em plantas daninhas que antecedem o cultivo da soja, as quais funcionam como pontes biológicas entre cultivos que após a dessecação passam a se alimentar da leguminosa cultivada, iniciando a primeira geração da praga no campo (Carvalho et al., 2014).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência larval na soja *Bt*, que expressa a proteína Cry1Ac, de cada ínstar de *H. armigera*.

2. Material e Métodos

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia Aplicada, da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no município de Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil.

A criação de *H. armigera* foi estabelecida a partir de lagartas coletadas em agroecossistemas de soja, em São Gabriel do Oeste, MS, em novembro de 2014. As lagartas foram mantidas em potes plásticos de 100 ml, forrados com papel absorvente e, diariamente, foram alimentadas com folhas de soja não-*Bt*, até atingirem o estágio de pupa. Após este período foram retiradas dos potes e acondicionadas em placas de Petri contendo vermiculita. Após a emergência, os adultos foram mantidos, em sala climatizada [$25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas], em tubos de PVC (15 cm de diâmetro e 22 cm de altura) tampados na parte inferior com uma placa de Petri e na parte superior cobertos com tecido tule e revestidos internamente com folhas de papel sulfite A4 como substrato de oviposição. Para alimentação dos adultos, ofertou-se uma solução de mel a 10% embebida em algodão colocado na parte superior sobre o tecido tule. Os ovos depositados no papel e no tecido tule foram transferidos para sacos plásticos (2 Kg) previamente umedecidos com água destilada. A troca do alimento e retirada das posturas foram feitas diariamente.

Após a eclosão, as lagartas a serem utilizadas nos bioensaios com os diferentes ínstares larvais foram alimentadas com folhas de soja da variedade não-*Bt* BMX Potência, até que atingissem o ínstar a ser avaliado. Paralelamente foi realizado um estudo para determinação dos ínstares de *H. armigera* em soja.

A segunda geração do inseto obtida em laboratório foi utilizada no estudo. Para cada ínstar larval de *H. armigera* avaliou-se a mortalidade da espécie em experimentos distintos. Para tal as variedades de soja *Bt* Monsoy 5947 I PRO, que expressa a proteína Cry1Ac, e não-*Bt* Nidera 5909 RR foram semeadas em casa de vegetação em vasos plásticos de 10 litros de capacidade contendo mistura de solo, areia e substrato (1:1:1).

Após a emergência e desbaste foram mantidas cinco plantas por vaso, as quais receberam os tratos culturais e irrigação conforme a necessidade das plantas.

Folhas completamente expandidas foram retiradas do terço médio das plantas quando atingiram os estádios fenológicos R1-R2 para avaliação das lagartas de primeiro ínstar, R2-R3 para avaliação das lagartas de segundo ínstar e terceiro ínstar, R3 para avaliação das lagartas de quarto ínstar e R4 para avaliação das lagartas de quinto e sexto ínstar. Estas folhas foram colocadas em potes plásticos (150 ml) contendo papel filtro umedecido. Uma lagarta de *H. armigera* do respectivo ínstar a ser avaliado foi colocada sobre a folha de soja. As folhas foram trocadas a cada dois dias. As mortalidades das lagartas foram avaliadas a cada 24 horas, até que ocorresse a mortalidade de todas as lagartas em soja *Bt*.

O delineamento experimental de cada bioensaio foi inteiramente casualizado, formado por dois tratamentos e quarenta repetições (lagartas individualizadamente dispostas). Para a interpretação dos dados foi realizada a análise estatística da sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier (Gehan-Breslow).

3. Resultados

As lagartas neonatas de *H. armigera* foram susceptíveis à proteína Cry1Ac expressa nas folhas de soja *Bt*, a qual causou mortalidade de 100 % dos indivíduos até o quarto dia após a infestação, sendo a sobrevivência dos indivíduos significativamente menor em relação à observada na variedade não-*Bt* (sobrevivência de 86%) (K-M =37,627, d.f.=1, p=0,001) (Figura 1A). Além disso, observou-se que o consumo de folhas de soja *Bt* por *H. armigera* restringiu-se a raspagem de uma pequena quantidade de tecido foliar a qual foi suficiente para matar as lagartas de primeiro ínstar larval.

No bioensaio com lagartas de segundo ínstar de *H. armigera* a sobrevivência também foi menor em soja *Bt* quando comparando a soja não-*Bt* (K-M =51,671, d.f.=1, p=0,001) (Figura 1B).

Para as lagartas de terceiro ínstar a análise de sobrevivência mostrou que ambas as variedades de soja *Bt* e não-*Bt* não causaram mortalidade das lagartas de *H. armigera* nas primeiras 24 h após a infestação (Figura 1C). Para a variedade *Bt* a mortalidade de 50% dos indivíduos ocorreu aos dois dias após a infestação, sendo este também o tempo em que houve maior porcentagem de mortalidade dos indivíduos. Aos cinco dias após a infestação ocorreu mortalidade de todas as lagartas alimentadas com folhas de soja *Bt*

enquanto a sobrevivência no controle (soja não-*Bt*) foi de 95% (K-M =75,163, d.f.=1, p=0,001).

Em lagartas de quarto ínstar, a soja *Bt* causou mortalidade de 100% das lagartas, com um tempo médio para a morte de cinco dias após a infestação, diferindo significativamente da soja não-*Bt* (K-M =57,660, d.f.=1, p=0,001) (Figura 1D).

Para as lagartas de quinto e sexto ínstar o tempo para a mortalidade de 100% dos indivíduos na variedade de soja *Bt* foi de quatro dias e diferiu significativamente da mortalidade na soja não-*Bt*, onde houve sobrevivência 91% (K-M =43,976, d.f.=1, p=0,001) e 70% (K-M =31,464, d.f.=1, p=0,001) das lagartas, respectivamente (Figura 1E e F).

4. Discussão

A soja *Bt* afetou o tempo médio para morte em cada ínstar, mas sua eficácia de controle não foi afetada pela idade larval de *H. armigera*, causando mortalidade de 100% dos indivíduos nos seis ínstaes avaliados. Yu et al. (2013) em seus bioensaios confirmaram que plantas de soja que expressam Cry1Ac oferecem excelente proteção contra *H. armigera*, sendo esta espécie sensível a esta proteína tóxica. Bernardi et al. (2014) em seus estudos com diferentes ínstaes de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) também verificaram a mortalidade completa em lagartas de primeiro ao quinto ínstar quando estas foram expostas à alimentação em soja *Bt*, demonstrando a eficácia de controle desta tecnologia sobre lepidópteros que se alimentam na cultura da soja.

Para lagartas neonatas a mortalidade de 100% dos indivíduos que ocorreu até o quarto dia após infestação, também foi observada nas espécies *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), em bioensaios com discos de folhas de soja *Bt* (Bernardi et al., 2012).

Em relação à mortalidade das lagartas de segundo ínstar os resultados de bioensaios de Yu et al. (2013) também revelaram que a soja *Bt* que expressa proteína Cry1Ac apresentou alta resistência contra este ínstar larval de *H. armigera* durante diferentes períodos de crescimento das plantas de soja. Estes autores avaliaram sobrevivência das lagartas por um período de quatro dias de alimentação e ao final de suas avaliações observaram que o peso larval dos indivíduos sobreviventes em soja *Bt* foi menor em relação às lagartas alimentadas com soja não-*Bt*. Este menor peso poderia afetar a sobrevivência das lagartas e provocar a morte de todos os indivíduos em avaliações

posteriores, concordando com os resultados aqui apresentados onde foi observada a mortalidade de 100% dos indivíduos aos seis dias após infestação em soja *Bt*.

Bernardi et al. (2012) em estudos em casa de vegetação com *A. gemmatilis* e *C. includens* também observaram que lagartas de ínstares avançados oriundas de plantas isolinhas não-*Bt* quando migraram para plantas de soja *Bt* foram controladas pela soja MON 87701 × MON 89788. Esses mesmos autores relatam ainda que a elevada mortalidade destas duas espécies de lepidópteros, mesmo em ínstares avançados, presumivelmente mais tolerantes, é resultado da elevada expressão da proteína *Bt* em soja MON 87701 × MON 89788 e da suscetibilidade dessas espécies à proteína Cry1Ac; o que provavelmente se repete neste estudo sobre os diferentes ínstares de *H. armigera*.

O tempo letal de quatro dias observado para o quinto e sexto instar de *H. armigera* pode ser devido ao fato de que nesses ínstares as lagartas são maiores, consomem mais e também estão se preparando para o estágio imaturo de pupa (onde não se alimentam), logo se alimentando mais ingerem uma maior quantidade de proteína tóxica, o que supostamente poderia causar a mortalidade mais rápida, no caso de indivíduos suscetíveis.

Diante de nossos resultados, sugerem-se estudos visando verificar a eficácia das estruturas reprodutivas dessa variedade com o intuito de observar se com a alimentação nas outras estruturas da planta a eficácia desta tecnologia pode ser reduzida nos diferentes ínstares de *H. armigera*. Este estudo foi realizado com folhas de soja, mas é possível que em estádios fenológicos avançados possa ocorrer alguma sobrevivência de lagartas nas estruturas reprodutivas das plantas, visto que os níveis de expressão Cry1Ac podem variar ao longo do crescimento das plantas de soja (Yu et al., 2013) e nas diferentes estruturas das plantas, assim como ocorre no algodoeiro *Bt* (Arshad et al., 2009). Além disso, é possível também ocorrer em campo a sobrevivência de indivíduos resistentes, acelerando o processo de evolução da resistência da praga à tecnologia, uma vez que Gunning et al. (2005) relataram em seus estudos que uma população australiana de *H. armigera*, oriunda de indivíduos resistentes de campo, manifestou resistência à toxina Cry1Ac expressa em algodoeiro *Bt*.

Vale ressaltar ainda, que por ser uma espécie que se alimenta em várias culturas (Gunning et al., 2005), o risco de resistência da espécie à toxina Cry 1Ac no Brasil existe, pois, esta proteína está presente na soja *Bt* e também no algodão *Bt*. Presumivelmente, a sucessão de cultivares de soja e algodoeiro pode estender o período

de exposição da praga à proteína *Bt* aumentando o risco de seleção de indivíduos resistentes (Bernardi et al., 2014). Assim, mesmo havendo elevado controle de *H. armigera* em soja *Bt* e, conseqüentemente, redução dos danos da praga na cultura, é necessário manter a efetiva área de refúgio, visando à sustentabilidade da tecnologia. É evitar a exposição das lagartas maiores em plântulas, para minimizar a pressão de seleção e uma possível exposição subletal da proteína *Bt*; por isso indica-se a importância da dessecação antecipada dentro das boas práticas agrícolas recomendadas. Nossos resultados indicam que a soja *Bt* que expressa a proteína Cry 1Ac é uma tática de controle eficiente sobre os seis instares larvais de *H. armigera* e influenciam diretamente na decisão de controle de lagartas de *H. armigera* em soja *Bt*.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão de bolsa de Doutorado (Processo nº 23/200.733/2013). A José Jairo da Silva da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja) pela colaboração com as técnicas de PCR-RFLP para identificação molecular da espécie.

Referências

- Alvi, A.H.K., Sayyed, A.H., Naeem, M., & Ali, M. (2012). Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. *PLoS ONE*, 7, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047309>
- Aggarwal, N., Holaraschke, M.E., & Basedow, T. (2006). Evaluation of bio-rational insecticides to control *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on *Vicia faba* L. *Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*, 15, 245-250.
- Arshad M., Suhail A., Arif, M.J., & Khan, M.A. (2009). Transgenic-*Bt* and nontransgenic cotton effects on survival and growth of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11, 473-476.
- Bernardi, O., Malvestiti, G.S., Dourado, P.M., Oliveira, W.S., Martinelli, S., Berger, G.U., Head, G.P., & Omoto, C. (2012). Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 MON 89788 soybean against *Anticarsia*

- gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Management Science*, 68, 1083-1091. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3271>
- Bernardi, O., Dourado, P.M., Carvalho, R.A., Martinelli, S., Berger, G.U., Head, G.P., & Omoto, C. (2014). High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 × MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 70, 588–594. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3581>
- Bués, R., Bouvier, J.C., & Boudinhon, L. (2005). Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. *Crop Protection*, 24, 814-8205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.006>
- Carvalho, S.S. de S., Mendes, S.M., Santos, A. E. dos, Vilela, M., & Araujo, O.G. (2014, August). *Aspectos biológicos de Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada com buva (*Conyza canadensis*). Paper presented at the XXX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Salvador, Brazil. Abstract retrieved from <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/106836/1/Aspectos-biologicos.pdf>
- Czepak, C., Albernaz, K.C., Vivan, L.M., Guimarães, H.O., & Carvalhais, T. (2013a). Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43, 110-113.
- Czepak, C., Vivan, L.M., & Albernaz, K.C. (2013b). Pragas da vez. *Cultivar Grandes Culturas*, 167, 20-27.
- Degrande, P.E., & Omoto, C. (2013). Pragas: Estancar prejuízos. *Cultivar Grandes Culturas*, 167, 30-34.
- Fehr, W.R. & Caviness, E.C. (1977). Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 11p. (Special Report, 80).
- González-Cabrera, J., Mollá, O., Montón, H., & Urbaneja, A. (2011). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl*, 56, 71-80. <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-010-9310-1>
- Gunning, R.V., Dang, H.T., Kemp, F.C., Nicholson, I.C., & Moores, G.D. (2005). New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 71, 2558–2563. <http://dx.doi.org/10.1128 / AEM.71.5.2558-2563.2005>
- James, R.R., Croft, B.A., & Strauss, S.H. (1999). Susceptibility of the Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to Different Strains and Transgenic Toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Entomology*, 28, 108-115.
- Kranthi, K.R., Jadhav, D.R., Kranthi, S., Wanjari, R.R., Ali, S.S. & Russell, D.A. (2002). Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. *Crop Protection*, 21, 449-460. [http://dx.doi.org/10.1016 / S0261-2194 \(01\) 00131-4](http://dx.doi.org/10.1016 / S0261-2194 (01) 00131-4)
- Liu, Z., Gong, P., Li, D., & Wei, W. (2010). Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by larval host plants: pupal weight is important. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1663-1670. <http://dx.doi.org/10.1016 / j.jinsphys.2010.08.007>
- Rausell, C., Martinez-Ramirez, A.C., Garcia-Robles, I., & Real, M.D. (2000). A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1553–1558. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1553-1558.2000>
- Specht, A., Sosa-Gomez, D.R., Paula-Moraes, S.V. & Yano, S.A.C. (2013). Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 689-692. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000600015>
- Tay, W.T., Soria, M.F., Walsh T., Thomazoni D., Silvie P., Gajanan T.B., Craig A., & Sharon, D. (2013). A brave new world for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE*, 8, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1371 / journal.pone.0080134>
- Torres-Vila, L.M., Rodriguez-Molina, C., Lacasa-Plasencia, A., Bielza-Lino, P., & Rodriguez-del-Rincón, A. (2002). Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: current status and agroecological perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 93, 55-65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809\(02\)00003-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00003-8)
- Yu, H., Li, Y., Li, X., Romeis J. & Wu, K. (2013). Expression of Cry1Ac in transgenic *Bt* soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. *Pest Management Science*, 69, 1326-1333. <http://dx.doi.org/10.1002 / ps.350>

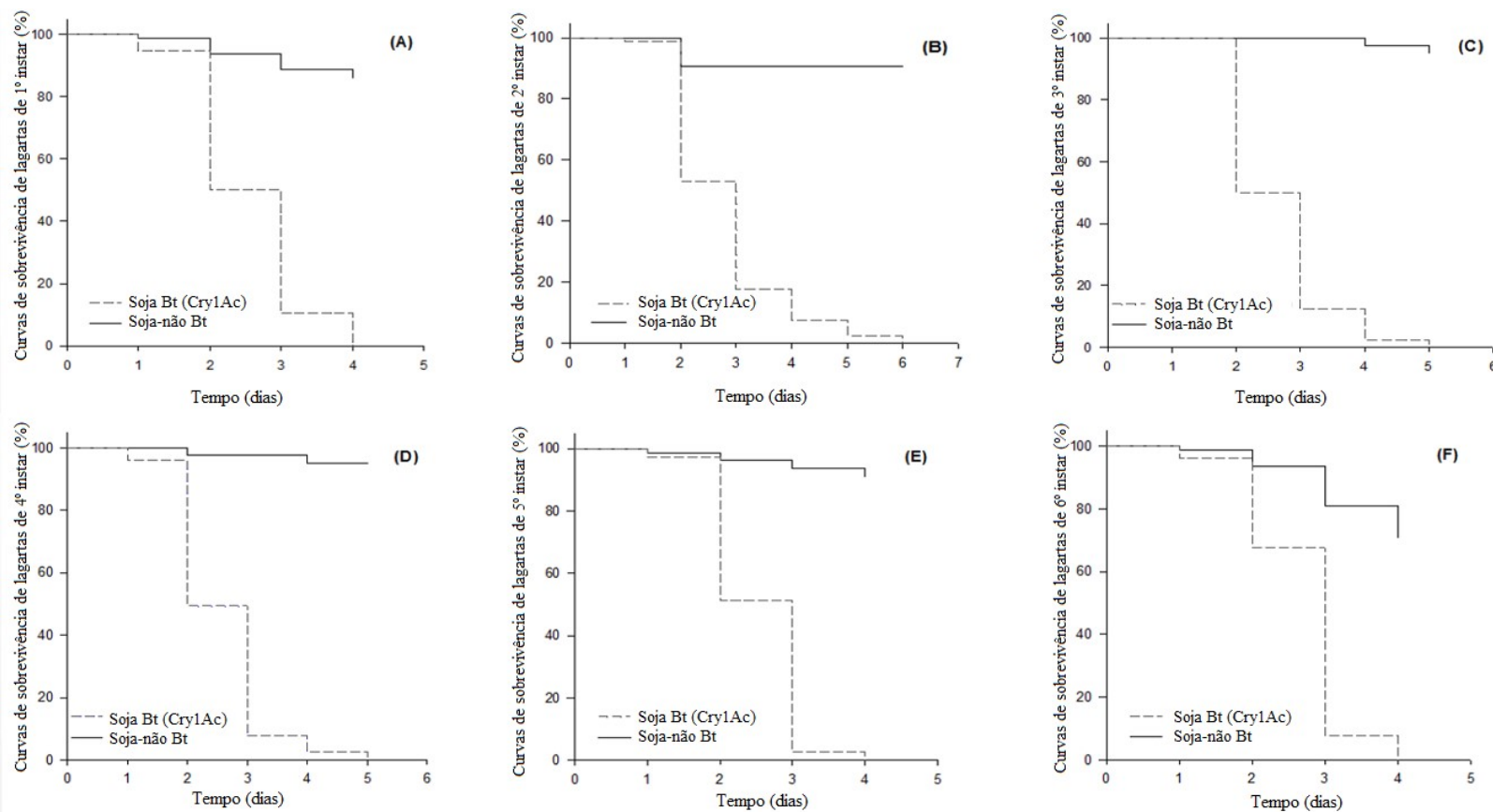


Figura 1. Curvas de sobrevivência de lagartas de 1º (A), 2º (B), 3º (C), 4º (D), 5º (E) e 6º (F) instar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de soja *Bt* (Cry 1Ac) e não-*Bt* em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Análise estatística da sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier (Gehan-Breslow).

Manuscrito III

Efeito do algodão *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

(De acordo com as normas do periódico “Pest Management Science”, com adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande Dourados)

Efeito do algodão *Bt* sobre lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

Resumo

TEMA: *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) causa danos econômicos significativos na cultura do algodão. Os algodoeiros geneticamente modificados que expressam as proteínas Cry são ferramentas alternativas para o manejo da praga. Em países onde a ocorrência desta espécie já foi registrada há alguns anos, as tecnologias *Bt* como Bollgard®/Ingard® e Bollgard II® apresentam eficiência no controle da praga, porém a suscetibilidade das espécies às proteínas *Bt* pode variar conforme a origem geográfica da população da espécie alvo. Além disso, dados sobre a suscetibilidade de *H. armigera* aos algodoeiros *Bt*, resistentes a lepidópteros-praga recentemente liberados para uso comercial, Widestrike® e Twinlink®, são praticamente inexistentes. Bioensaios com lagartas de diferentes instares larvais de *H. armigera* alimentadas com estruturas de plantas de algodoeiros *Bt* variedades DP 555BGRR® (Cry1Ac), FM 975WS® (Cry1Ac + Cry1F), DP 1228B2RF® (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT® (Cry1Ab + Cry2Ae) e não-*Bt* (FM 982GL®) foram realizados para avaliar a mortalidade desta espécie e possíveis efeitos subletais das variedades *Bt* testadas em indivíduos sobreviventes.

RESULTADOS: As variedades de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR® (Cry1Ac), FM 975WS® (Cry1Ac + Cry1F), DP 1228B2RF® (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT® (Cry1Ab + Cry2Ae) apresentaram eficiência de controle sobre *H. armigera*, pois afetaram negativamente a sobrevivência das lagartas. Quando ocorreu a sobrevivência de indivíduos nas variedades *Bt* DP 555BGRR® e FM 975WS®, estes promoveram o alongamento do período larval e redução na biomassa de pupas. A tecnologia FM 940GLT®, lançada recentemente em 2013, que expressa as proteínas Cry1Ab + Cry2Ae, teve as melhores porcentagens de controle nos seis instares avaliados. Esses resultados são importantes, pois este é o primeiro registro da avaliação desta tecnologia para a espécie *H. armigera*.

CONCLUSÃO: A utilização de eventos de algodão com duas proteínas de *Bt* com mecanismos de ação distintos se mostrou efetiva no controle dos instares larvais de *H. armigera*. Em variedades que possuem proteínas que atuam no mesmo sítio de ação, quando há sobrevivência de indivíduos, ocorre o alongamento do período larval e redução na biomassa de pupas, o que é consequentemente resultante da diminuição da

alimentação das lagartas. No quinto e o sexto instares larvais, *H. armigera* alimentada com maçãs firmes é altamente suscetível aos algodoeiros *Bt* com uma ou duas proteínas tóxicas.

Palavras-chave: Bollgard®; Bollgard II®; ínstar; TwinLink®; WideStrike®.

1 INTRODUÇÃO

As variedades de algodoeiro, *Gossypium hirsutum* (L.), transgênico com genes *Bt*, provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner, que expressam proteínas Cry vêm sendo amplamente adotadas, devido às suas vantagens econômicas em relação a redução do uso de inseticidas convencionais para o controle de lepidópteros pragas e preservação da população de artrópodes benéficos.^{1,2}

A lagarta *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) referida como uma das mais importantes pragas da Agricultura na Ásia, África, Europa e Austrália é uma das principais pragas-alvo dos cultivos geneticamente modificados.^{1,3,4} Este noctuídeo conhecido como responsável por enormes prejuízos, seu histórico de surtos populacionais e dificuldade de controle, resultantes de sua elevada resistência a inseticidas químicos, foi recentemente identificado no Brasil, sendo sua ocorrência relatada em vários estados brasileiros e em diversas culturas agrícolas, dentre elas o algodoeiro.⁴⁻¹⁰

Em algodoeiro, *H. armigera* apresenta grande potencial de destruição das estruturas vegetativas e reprodutivas das plantas, exigindo a adoção de táticas de controle para evitar perdas na produção. As variedades de algodoeiro *Bt* são alternativas aos inseticidas químicos para o controle das populações de *H. armigera*, uma vez que podem ser utilizadas no manejo da espécie e simultaneamente controlar o complexo de lepidópteros pragas do algodoeiro. No Brasil, as tecnologias *Bt* atualmente aprovadas para o algodoeiro não incluem *H. armigera* como praga-alvo, uma vez que o inseto foi identificado no país após o lançamento comercial desses eventos biotecnológicos. Todavia, sabe-se que em países onde a ocorrência desta espécie já foi registrada há alguns, as tecnologias *Bt* como Bollgard®/Ingard® e Bollgard II® apresentam eficiência no controle da praga^{11,12}, ressaltando a necessidade da avaliação de sua eficiência e de outras novas tecnologia em uso no Brasil no controle de *H. armigera*. Uma vez que a suscetibilidade das espécies às proteínas de *Bt* pode variar conforme as diferentes populações estudadas¹³, dados sobre a suscetibilidade de *H. armigera* aos algodoeiros *Bt* resistentes a lepidópteros-praga, Widestrike® e Twinlink®, são praticamente inexistentes.

Cita-se que as tecnologias derivadas da bactéria *Bt* podem ou não ter suas eficácias de controle afetadas ao longo do desenvolvimento larval de lepidópteros.¹⁴ Além da idade larval¹⁴, a mortalidade das lagartas pode variar de acordo com a quantidade de toxina ingerida e a espécie de inseto.^{15,16} Insetos em ínstares avançados são comumente mais tolerantes às proteínas *Bt*, e assim a mortalidade larval nestes ínstares evidencia a elevada suscetibilidade da espécie às toxinas.^{17,18} Logo, de maneira geral, quanto mais avançado o ínstar maior será a dificuldade de controle, pois a lagarta precisará ingerir maior quantidade de tecido para causar a letalidade e, conseqüentemente, poderia causar danos na planta.¹⁴ Em contrapartida Bernardi *et al.*¹⁹ em seus estudos com *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) verificaram a mortalidade completa em larvas do primeiro ao quinto ínstar quando estas foram expostas à alimentação em soja *Bt* que expressa a proteína Cry1Ac. Azambuja *et al.*²⁰ também demonstraram que mesmo em ínstares mais avançados a toxina Cry1Ac da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) *Bt* causou a mortalidade de *H. armigera* de uma população de origem brasileira.

Assim, este estudo objetivou avaliar a mortalidade de cada ínstar larval de *H. armigera* nos algodoeiros *Bt*, DP 555BGRR® (Cry1Ac, Bollgard), FM 975WS® (Cry1Ac + Cry1F, WideStrike), DP 1228B2RF® (Cry1Ac + Cry2Ab2, Bollgard II) e FM 940GLT® (Cry1Ab + Cry2Ae, TwinLink), bem como determinar as variáveis biológicas das fases imaturas deste lepidóptero em folhas de algodoeiro *Bt* e não- *Bt* e os possíveis efeitos subletais das variedades *Bt* testadas sobre indivíduos sobreviventes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia Aplicada, da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no município de Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil.

A criação de *H. armigera* foi estabelecida a partir de lagartas coletadas em soja, no município de São Gabriel do Oeste, MS, em novembro de 2014 e identificadas pela técnica de PCR-RFLP.²¹ As lagartas foram mantidas em potes plásticos de 100 ml, forrados com papel filtro e, diariamente, foram alimentadas com folhas de soja não- *Bt*. A opção pela alimentação das lagartas em soja visou evitar o condicionamento pré-imaginal.²²

Ao atingirem a fase de pupa, estas foram retiradas dos potes e acondicionadas em placas de Petri contendo vermiculita. Após a emergência, os adultos foram mantidos em sala climatizada [$25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas], em tubos de PVC (15 cm de diâmetro e 22 cm de altura) cobertos na parte inferior com uma placa de Petri e na parte superior com tecido tule, e revestidos internamente com folhas de papel

sulfite como substrato de oviposição. Para alimentação dos adultos, ofertou-se uma solução de mel a 10% embebida em algodão colocado na parte superior sobre o tecido tule. Os ovos depositados no papel e no tecido tule foram transferidos para sacos plásticos (2 Kg) previamente umedecidos com água destilada. A troca do alimento e a retirada das posturas foram realizadas diariamente.

Após a eclosão, as lagartas a serem utilizadas nos bioensaios com os diferentes ínstares larvais foram alimentadas com folhas de algodão da variedade FM 982GL[®] (testemunha não- *Bt*), até que atingissem o ínstar a ser avaliado.

Para cada ínstar larval de *H. armigera* avaliou-se a mortalidade das lagartas em experimentos distintos. Para tal, as variedades de algodão *Bt* (DP 555BGRR[®], FM 975WS[®], DP 1228B2RF[®] e FM 940GLT[®]) e a variedade não-*Bt* (FM 982GL[®]) foram semeadas no campo experimental em parcelas, as quais receberam os tratos culturais conforme recomendações para a cultura e foram irrigadas quando necessário.

Os bioensaios com lagartas do primeiro, segundo e terceiro ínstar foram realizados com folhas completamente desenvolvidas do terço superior de plantas de 60 a 64 dias após a emergência (DAE). Nos bioensaios com lagartas de quarto ínstar foram utilizadas maçãs macias de plantas com 79 DAE e as lagartas de quinto e sexto ínstares foram alimentadas com maçãs firmes, retiradas de plantas com aproximadamente 115 DAE.

Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos, sendo representados por quatro variedades de algodão *Bt* (DP 555BGRR[®], FM 975WS[®], DP 1228B2RF[®] e FM 940GLT[®]) e uma variedade não-*Bt* (FM 982GL[®]), e quarenta repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi representada por um pote plástico (150 ml) contendo no fundo papel filtro levemente umedecido com água destilada. Sobre o papel filtro foi depositado a estrutura vegetal testada e em seguida a lagarta, obtida da criação estoque dos diferentes ínstares. Os alimentos foram trocados a cada dois dias, a fim de evitar a perda de qualidade.

As mortalidades das lagartas foram avaliadas a cada 24 horas, por sete dias.^{12,15,23} Para a interpretação dos dados foi realizada a análise estatística de sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier pelo método de Gehan-Breslow.

No bioensaio com lagartas de primeiro ínstar também foram avaliadas as variáveis biológicas duração (dias) e sobrevivência da fase larval, duração da fase de pré-pupa, biomassa e duração da fase de pupa. Como os dados não apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As quatro variedades de algodoeiro *Bt* testadas afetaram a sobrevivência de lagartas neonatas de *H. armigera*, diferindo significativamente da testemunha não-*Bt* (K-M= 85,565, d.f.= 4, p= 0,001) (Fig. 1). As variedades DP 1228B2RF[®] (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT[®] (Cry1Ab + Cry2Ae) causaram as maiores porcentagens de mortalidade, promovendo a morte de aproximadamente 100% dos indivíduos após sete dias, enquanto que a variedade FM 975WS[®] (Cry1Ac + Cry1F) causou a morte de 52,5% das lagartas e a variedade DP 555BGRR[®] (Cry1Ac) de apenas 17,5% das lagartas no primeiro ínstar, indicando possíveis falhas no controle das lagartas por essas variedades em campo.

As variedades *Bt* testadas expressam diferentes proteínas tóxicas o que foi determinante para os resultados obtidos. As variedades DP 1228B2RF[®], FM 940GLT[®] e FM 975WS[®] que causaram as maiores taxas de mortalidade expressam duas proteínas tóxicas, enquanto DP 555BGRR[®] que apresentou a menor taxa de mortalidade, expressa apenas uma proteína, Cry1Ac, à qual espécies de lepidópteros ²³, dentre elas *H. armigera*, são citadas como resistentes.^{1,24} Além disso, as variedades DP 1228B2RF[®] (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT[®] (Cry1Ab + Cry2Ae) que apresentaram os melhores resultados para mortalidade possuem duas proteínas de *Bt* com aditivos de atividades independentes no sítio de ligação no intestino médio de lepidópteros, o que corrobora com os resultados desta maior taxa de mortalidade. Essa piramidação em plantas *Bt* tem potencial para integração em programas de manejo da resistência e foram desenvolvidas visando aumentar eficácia de controle, espectro de hospedeiros e retardar a evolução à resistência dos insetos às toxinas de *Bt*.^{25,26} A mortalidade de lagartas neonatas de *H. armigera* alimentadas com folhas de algodoeiro expressando duas proteínas Cry também foi estudada por Knight *et al.*¹². Esses autores observaram que a mortalidade foi de aproximadamente 100% no início do desenvolvimento das plantas, mas caiu para aproximadamente 65% no final do ciclo da cultura. De acordo com Ibargutxi *et al.*¹⁵, a mortalidade larval, ocasionada pelas toxinas *Bt*, pode variar dependendo da espécie de inseto e a proporção de toxina ingerida. Outro fator que pode estar relacionado a essa variação na mortalidade são os níveis de expressão da toxina ²⁷, uma vez que os níveis de expressão das toxinas Cry variam sazonalmente e entre as estruturas das plantas ^{3,12} e a perda de eficácia está relacionada com uma redução das proteínas inseticidas, pois os níveis de expressão Cry1Ac em plantas de algodão *Bt*, por exemplo, diminuem com a maturidade e senescência dos tecidos.²

Na avaliação dos efeitos subletais em lagartas de primeiro ínstar, observou-se que apenas para as lagartas mantidas nas variedades *Bt* DP 1228B2RF[®] e FM 940GLT[®] houve

100% de mortalidade (Tabela 1), portanto, a expressão de duas proteínas tóxicas na mesma planta pode resultar em atividades aditivas e aumentar sua eficiência de controle.²³ As variedades DP 555BGRR® e FM 975WS®, também *Bt*, causaram mortalidade de 65% e 85% das lagartas, respectivamente. As lagartas de *H. armigera* sobreviventes, nas variedades DP 555BGRR® e FM 975WS®, sofreram um alongamento em seu período larval, que diferiu significativamente da testemunha não-*Bt*, e também resultaram em pupas menores. Kranthi *et al.*²⁷ relataram que lagartas que sobreviveram após alimentação com diferentes estruturas de plantas de algodão *Bt* sofreram uma redução da sua biomassa em relação às lagartas alimentadas com algodão não-*Bt*. As toxinas Cry1Ac e Cry1F, presentes na variedade FM 975WS®, foram relatadas apresentando um efeito aditivo sobre a inibição do crescimento larval de *H. armigera* quando foram incorporadas em dieta artificial.¹⁵ Esses efeitos são considerados negativos para o desenvolvimento desse lepidóptero e podem ser importantes para a redução dos danos cumulativos ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta de algodão.²⁸ O prolongamento do período larval resulta em menor número de gerações ao longo do ano e possivelmente maior mortalidade, devido ao maior tempo de exposição à predação e/ou outras ameaças ambientais.²⁹ Além disso, a menor biomassa de pupas é um indicativo de vários tipos de estresse de desenvolvimento que refletem geralmente em uma redução na adaptação das mariposas em comparação com as desenvolvidas a partir de pupas com biomassas normais (Stipanovic *et al.*²⁸ citando Pearson 1958).

A duração da fase pré-pupa das lagartas sobreviventes em algodão FM 975WS® diferiu significativamente da testemunha. Já a duração do período pupal não foi afetada significativamente pelas cultivares DP 555BGRR® e FM 975WS® de algodoeiros *Bt*.

Nos estudos com lagartas de segundo ínstar de *H. armigera* apenas as variedades DP 1228B2RF® (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT® (Cry1Ab + Cry2Ae) causaram menor sobrevivência de lagartas quando comparadas com a testemunha não-*Bt* (K-M = 68,379, d.f.= 4, p= 0,001) (Fig. 2). Nessas, a sobrevivência foi de apenas 39% e 15% dos indivíduos, respectivamente. Sivasupramaniam *et al.*²⁸ avaliando a mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) também observaram que o algodão Bollgard II que expressa as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 causou maior mortalidade e menor peso larval em relação ao algodão que apresenta apenas a proteína Cry1Ac. Esses autores ainda relataram que o algodão com a proteína Cry1Ac causou maior mortalidade de *H. zea* quando comparado ao tratamento controle (algodão não-*Bt*). Diferentemente, no presente estudo as variedades FM 975WS® (Cry1Ac + Cry1F) e DP 555BGRR® (Cry1Ac)

causaram uma menor mortalidade larval de *H. armigera* não apresentando diferença significativa em relação à testemunha não-*Bt*.

No bioensaio com lagartas de terceiro ínstar a análise de sobrevivência mostrou que as variedades DP 1228B2RF[®] e FM 940GLT[®] causaram as maiores taxas de mortalidade (K-M = 35,285, d.f.= 4, p= 0,001) (Fig. 3). A taxa de sobrevivência nas variedades FM 975WS[®] e DP1228B2RF[®] não diferiram entre si. Neste ínstar, a maior porcentagem de mortalidade observada foi de 57,5% dos indivíduos na variedade FM 940GLT[®]. As demais variedades *Bt* causaram mortalidades menores que 50%. É possível que os níveis de expressão tenham influenciado na sobrevivência das lagartas, pois a variabilidade na eficácia de algodão *Bt* contra insetos pragas-alvo é atribuída principalmente às mudanças no teor de proteína *Bt* expressa, que varia de acordo com a cultivar, idade e estruturas da planta e também estresses ambientais.^{2,3,27}

Kranthi *et al.*²⁷ correlacionaram o aumento nos níveis de sobrevivência de *H. armigera* com a diminuição da expressão da toxina abaixo de 1.8 $\mu\text{g/g}$ em partes da planta, além da queda sazonal nos níveis quantitativos de Cry1Ac nos híbridos e diminuição da expressão da toxina com o envelhecimento da planta.

No quarto ínstar (alimentação em maçãs macias) a análise de sobrevivência mostrou que apenas a variedade FM 940GLT[®] diferiu significativamente da testemunha, causando a mortalidade de 57,5% dos indivíduos (K-M = 60,230, d.f.= 4, p= 0,001) (Fig. 4). Nas demais variedades testadas a sobrevivência das lagartas foi maior que 80%, demonstrando a baixa eficiência de controle destas sobre o quarto ínstar larval da *H. armigera* e evidenciando a necessidade da adoção de táticas de controle em campo nesse ínstar larval.

No quinto ínstar larval de *H. armigera* (lagartas alimentadas com maçãs firmes) todas as variedades de algodoeiro *Bt* testados afetaram a sobrevivência da espécie, diferindo significativamente da testemunha não- *Bt*, sendo observada a mortalidade de 100% ou quase 100% dos indivíduos nos tratamentos (K-M = 80,329, d.f.= 4, p= 0,001) (Fig. 5).

Em lagartas de sexto ínstar (alimentadas com maçãs firmes) a mortalidade também foi alta, variando de 80% a 97%, e todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha não-*Bt* (K-M = 51,520, d.f.= 4, p= 0,001) (Fig. 6). A variação da expressão das proteínas Cry entre as diferentes partes da planta e ao longo das estações é um dos fatores que afeta a sobrevivência larval de *H. armigera*. O aumento do conteúdo de Cry2Ab em maçãs grandes no final do ciclo da cultura foi relatado³ e este pode ter sido um dos fatores responsáveis pelo aumento da mortalidade das lagartas alimentadas com maçãs firmes em nosso estudo.

É possível também que alguns fatores não-*Bt* tenham contribuído com aumento da mortalidade das lagartas de quinto e sexto ínstar de *H. armigera* quando alimentadas com maçãs firmes de plantas de algodão mais desenvolvidas. Segundo Sivasupramaniam *et al.*²³ a alimentação de lagartas de *H. zea* com maçãs de algodoeiro não-*Bt* promoveu redução de peso e maiores índices de mortalidade das lagartas em relação aos indivíduos alimentados com folhas e outras estruturas mais jovens das plantas. Estes autores sugerem também uma potencial influência não-*Bt* sobre a bioatividade de tecidos no final do ciclo das plantas, devido à quantidade de tecidos consumidos e à variação da qualidade nutricional dos diferentes tipos de tecidos vegetais. Além da qualidade nutricional, a mortalidade pode estar associada à presença de compostos químicos não proteicos de defesa produzidos pelas plantas.³⁰ Compostos não nutricionais como o gossipol, que ocorre naturalmente nas sementes, estruturas reprodutivas e folhas de planta de algodão, podem afetar o aproveitamento nutricional da planta pelo inseto herbívoro.^{28,31} Esse aleloquímico além de afetar o peso larval e pupal, o tempo de desenvolvimento e a sobrevivência larval, também inibiu a alimentação de *H. zea* e *H. virescens*.^{28,31} Estudos recentes também relatam o efeito negativo do gossipol sobre lagartas de *H. armigera*.^{32,33}

No quinto e sexto ínstaes a cultivar FM 940GLT[®] diferiu das demais variedades *Bt* testadas, pois promoveu maior redução da sobrevivência no menor período de tempo.

As variedades *Bt* DP 555BGRR[®] (Cry1Ac), FM 975WS[®] (Cry1Ac + Cry1F), DP 1228B2RF[®] (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT[®] (Cry1Ab + Cry2Ae) apresentam eficiência de controle sobre *H. armigera*, pois afetam negativamente a sobrevivência das lagartas. As tecnologias 1228B2RF[®] (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT[®] (Cry1Ab + Cry2Ae), eventos piramidados, com duas proteínas *Bt*, que atuam em sítios de ligação distintos, de maneira geral apresentaram os melhores resultados para a mortalidade. Quando ocorre a sobrevivência de indivíduos, as variedades *Bt* DP 555BGRR[®] e FM 975WS[®] promovem o alongamento do período larval e redução na biomassa de pupas, que é consequentemente resultante da diminuição da alimentação das lagartas. No quinto e o sexto ínstaes larvais, *H. armigera* alimentada com maçãs firmes é altamente suscetível às quatro variedades de algodoeiros *Bt* testadas.

A tecnologia TwinLink[®] inserida na variedade FM 940GLT[®], que expressa as proteínas Cry1Ab + Cry2Ae, lançada em 2013 no Brasil, mesmo ano do registro da *H. armigera* no país, teve as melhores porcentagens de controle das lagartas nos seis ínstaes avaliados, esses resultados são importantes, pois este é o primeiro registro da avaliação desta tecnologia para a espécie. Portanto, infere-se que a utilização de eventos piramidados em

algodão, com pelos menos duas proteínas *Bt*, que atuam em sítios de ligação distintos, se mostrou mais efetiva no controle dos ínstares larvais de *H. armigera*. Além dessa estratégia, faz-se necessário a manutenção de áreas de refúgio estruturado e efetivo de pelo menos 20% de área total e refúgios alternativos, com outras plantas hospedeiras, como estratégia complementar ao refúgio estruturado, visando a redução da utilização de inseticidas químicos e aumento na densidade de inimigos naturais, contribuindo para diminuição dos impactos ambientais e sustentabilidade das tecnologias *Bt* disponíveis.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão de bolsa de Doutorado (Processo nº 23/200.733/2013). A José Jairo da Silva da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja) pela colaboração com as técnicas de PCR-RFLP para identificação molecular da espécie.

REFERÊNCIAS

- 1 An J, Gao Y, Lei C, Gould F e Wu K, Monitoring cotton bollworm resistance to Cry1Ac in two counties of northern China during 2009–2013. *Pest Manag Sci* **71**: 377–382 (2014).
- 2 Poongothai S, Ilavarasan R e Karrunakaran CM, Cry 1Ac levels and biochemical variations in *Bt* cotton as influenced by tissue maturity and senescence. *Plant Breed Crop Sci* **2**: 96-103 (2010).
- 3 Knight K, Head G e Rogers J, Season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab proteins in Bollgard II cotton in Australia. *Crop Prot* **44**: 50-58 (2013).
- 4 Tay WT, Soria MF, Walsh T, Thomazoni D, Silvie P, Gajanan TB, Craig A e Sharon D, A brave new world for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE* **8**:1-7(2013).
- 5 Bués R, Bouvier JC e Boudinhon L, Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. *Crop Protection* **24**: 814-8205 (2005).
- 6 Alvi AHK, Sayyed AH, Nae M e Ali M, Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. *PLoS ONE* **7**:1-9 (2012).
- 7 Degrande PE e Omoto C, Pragas: Estancar prejuízos. *Cultivar* **167**:30-34 (2013).

- 8 Czepak C, Albernaz KC, Vivan LM, Guimarães HO e Carvalhais T, Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **43**:110-113 (2013).
- 9 Specht A, Sosa-Gomez DR, Paula-Moraes SV e Yano SAC, Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesqui Agropecu Bras* **48**: 689-692 (2013).
- 10 Sosa-Gomez DR, Specht A, Paula-Moraes SV, Lopes-Lima A, Yano SAC, Micheli A, EGF Morais EGF, Gallo P, Pereira PRVS, Salvadori JR, Botton M, Zenker MM e Azevedo-Filho WS, Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* doi: 10.1016 / j.rbe.2015.09.008. 2015.
- 11 Arshad M, Suhail A, Arif MJ e Khan MA, Transgenic-Bt and Non-transgenic Cotton Effects on Survival and Growth of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Agriculture & Biology* **11**: 473–476 (2009).
- 12 Knight K, Head G e Rogers J, Relationships between Cry1Ac and Cry2Ab protein expression in field-grown Bollgard II® cotton and efficacy against *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Prot* **79**: 150-158 (2016).
- 13 Sebastião I, Lemes ARN, Figueiredo CS, Polanczyk RA, Desidério JÁ e Lemos MVF, Toxicidade e capacidade de ligação de proteínas Cry1 a receptores intestinais de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesqui Agropecu Bras* **50**: 999-1005 (2015).
- 14 Halcomb JL, Benedict JH, Cook B e Ring DR, Survival and Growth of Bollworm and Tobacco Budworm on Nontransgenic and Transgenic Cotton Expressing a CryIA Insecticidal Protein (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Entomol* **26**:250-255 (1996).
- 15 Ibargutxi MA, Muñoz D, Escudero IRD e Caballero P, Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control* **47**: 89-96 (2008).
- 16 Yu H, Li Y, Li X, Romeis J e Wu K, Expression of Cry1Ac in transgenic Bt soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. *Pest Manag Sci* **69**:1326-1333(2013).

- 17 Rausell C, Martinez-Ramirez AC, Garcia-Robles I e Real MD, A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Appl Environ Microbiol* **66**:1553-1558 (2000).
- 18 Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU e Omoto C, Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Manag Sci* **68**:1083-1091 (2012).
- 19 Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Berger GU, Head GP e Omoto C, High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 × MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* **70**:588-594 (2014).
- 20 Azambuja A, Degrande PE, Santos RO, Souza EP e Gomes CEC, Effect of *Bt* Soybean on Larvae of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Agric Sc* **8**: 90-94 (2015).
- 21 Behere GT, Tay WT, Russell DA e Batterham P, Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull of Entomol Res* **98**: 599–603 (2008).
- 22 Lara FM, Fatores que influenciam a manifestação da resistência, in *Princípios de resistência de plantas a insetos*, ed. por Lara FM, Livroceres, Piracicaba, pp. 118-119 (1978).
- 23 Sivasupramaniam S, Moar WJ, Ruschke LG, Osborn JA, Jiang C, Sebaugh JL, Brown GR, Shappley ZW, Oppenhuizen ME, Mullins JW e Greenplate JT, Toxicity and Characterization of Cotton Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 Proteins for Control of Lepidopteran Pests. *J Econ Entomol* **101**:546-554 (2008).
- 24 Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC e Moores GD, New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2558-2563 (2005).
- 25 Roush RT, Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not?. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B* **353**: 1777-1786 (1998).
- 26 Brévault T, Prudent P, Vaissayre M e Carrière Y, Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry2Ab2 Insecticidal Proteins in Four Countries of the West African Cotton Belt. *J Econ Entomol* **102**: 2301-2309 (2009).

- 27 Kranthi KR, Naidu S, Dhawad CS, Tatwawadi A, Mate K, Patil E, Bharose AA, Behere GT, Wadaskar RM e Kranthi S, Temporal and intraplant variability of Cry1Ac expression in *Bt*-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Curr Sci* **89**: 291-298 (2005).
- 28 Stipanovic RD, Lopez Jr JD, Dowd MK, Puckhaber LS e Duke SE, Effect of Racemic, (+) and (-) Gossypol on Survival and Development of *Heliothis virescens* Larvae. *Environ Entomol* **37**: 1081-1085 (2008).
- 29 Bellanda HCHB e Zucoloto FS, Lagartas desfolhadoras (Lepidoptera), Em: *Bioecologia e Nutrição de Insetos: base para o manejo integrado de pragas*, editado por Panizzi AR e Parra JRP, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 425-464 (2009).
- 30 Vendramim JD e Guzzo EC, Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos, Em: *Bioecologia e Nutrição de Insetos: base para o manejo integrado de pragas*, editado por Panizzi AR e Parra JRP, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 1055-1105 (2009).
- 31 Stipanovic RD, Lopez Jr JD, Dowd MK, Puckhaber LS e Duke SE, Effect of racemic and (+) and (-) gossypol on the survival and development of *Helicoverpa zea* larvae. *J Chem Ecol* **32**: 959-968 (2006).
- 32 Mao YB, Tao XY, Xue XY, Wang LJ e Chen XY, Cotton plants expressing *CYP6AE14* double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research* **20**:665-673 (2011).
- 33 Abdo ME e El Fadni HBEH, Effects of gossypol mixtures with artificial diet on biology of *Helicoverpa armigera* (Hub) (Lepidoptera: Noctuidae). *University of Bakht Alruda Scientific Journal* **12**: 426-437 (2014).

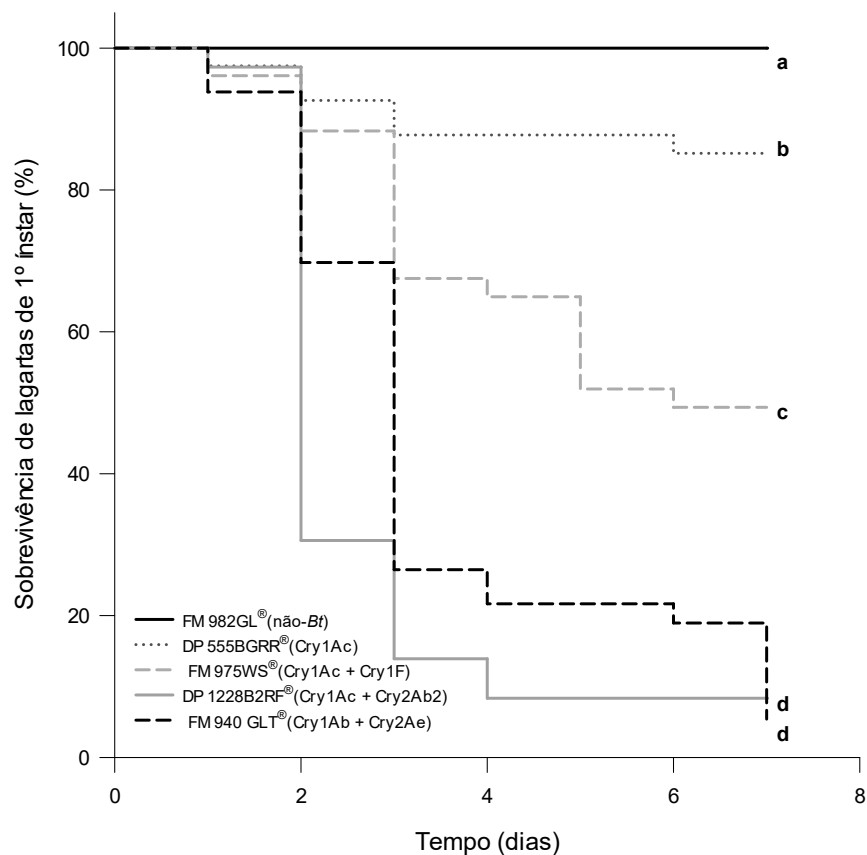


Figura 1. Curvas de sobrevivência de lagartas de primeiro ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR[®] (Bollgard), FM 975WS[®] (WideStrike), DP 1228B2RF[®] (Bollgard II), FM 940GLT[®] (TwinLink) e não-*Bt* (FM 982GL[®]) em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

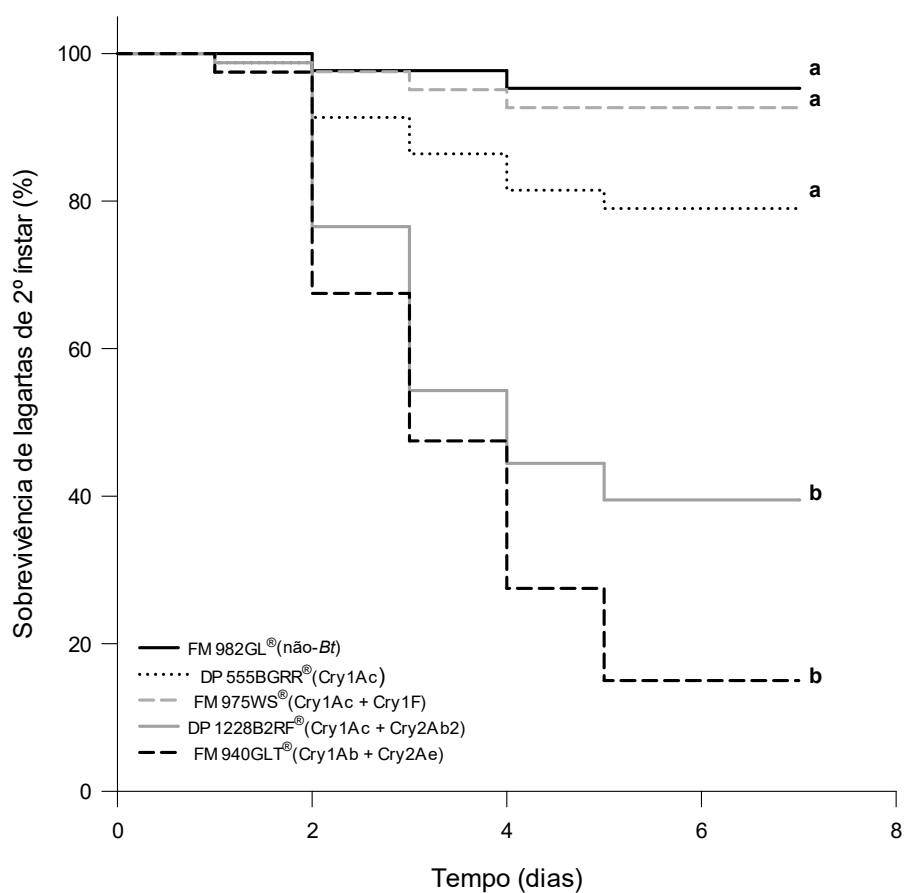


Figura 2. Curvas de sobrevivência de lagartas de segundo ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR® (Bollgard), FM 975WS® (WideStrike), DP 1228B2RF® (Bollgard II), FM 940GLT® (TwinLink) e não-*Bt* (FM 982GL®) em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

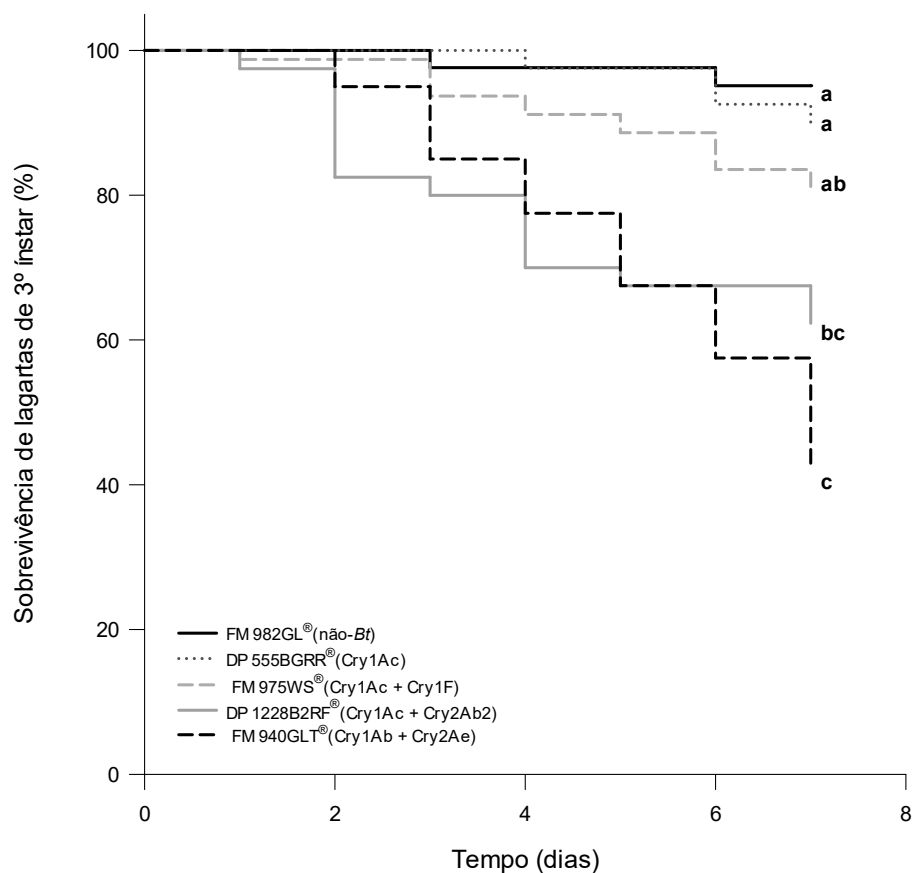


Figura 3. Curvas de sobrevivência de lagartas de terceiro ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR® (Bollgard), FM 975WS® (WideStrike), DP 1228B2RF® (Bollgard II), FM 940GLT® (TwinLink) e não-*Bt* (FM 982GL®) em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

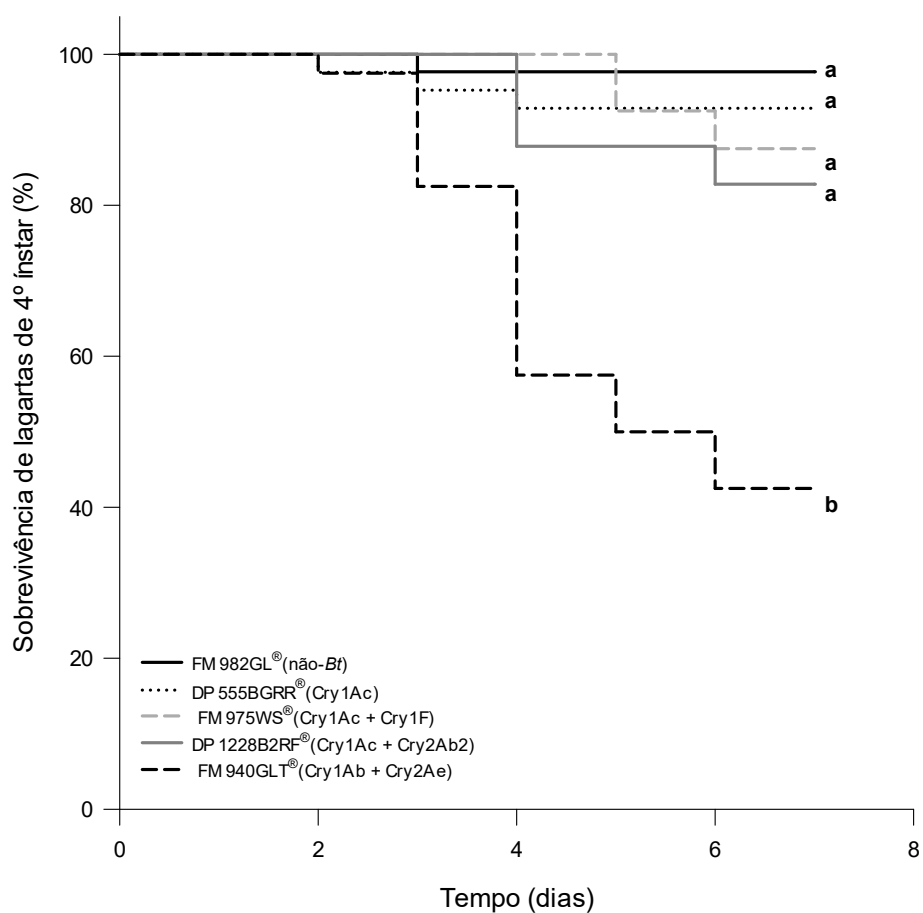


Figura 4. Curvas de sobrevivência de lagartas de quarto ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com maçãs macias de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR® (Bollgard), FM 975WS® (WideStrike), DP 1228B2RF® (Bollgard II), FM 940GLT® (TwinLink) e não-*Bt* (FM 982GL®) em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

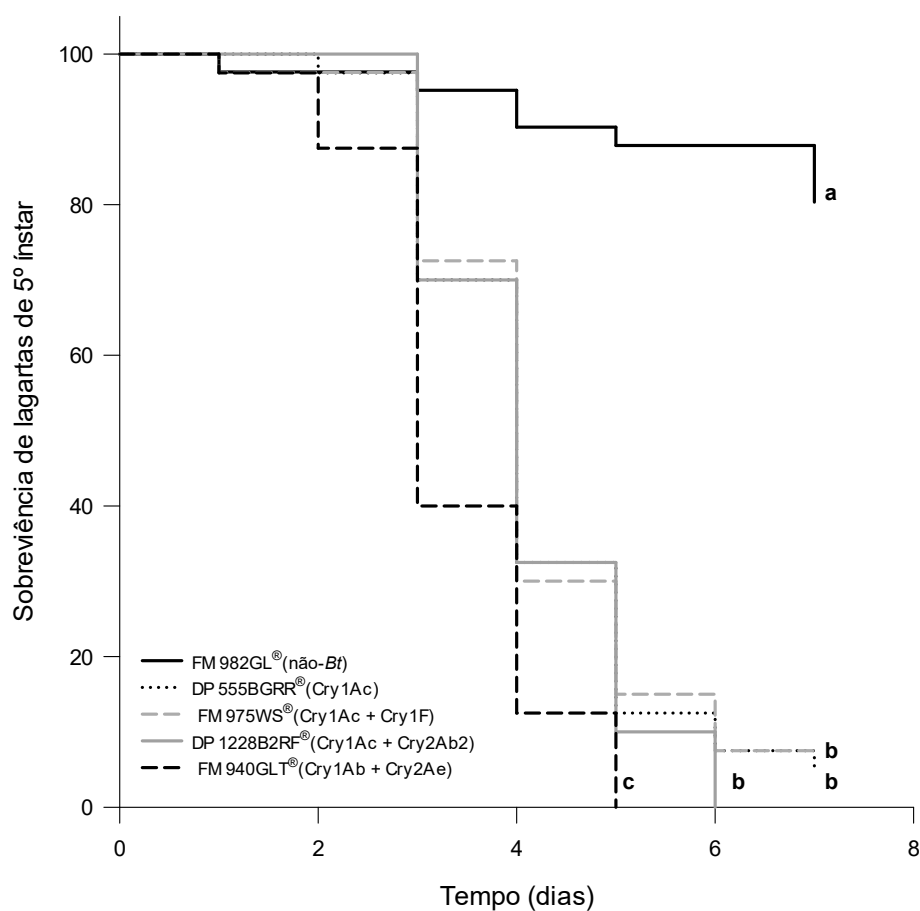


Figura 5. Curvas de sobrevivência de lagartas de quinto ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com maçãs firmes de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR® (Bollgard), FM 975WS® (WideStrike), DP 1228B2RF® (Bollgard II), FM 940GLT® (TwinLink) e não-*Bt* (FM 982GL®) em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

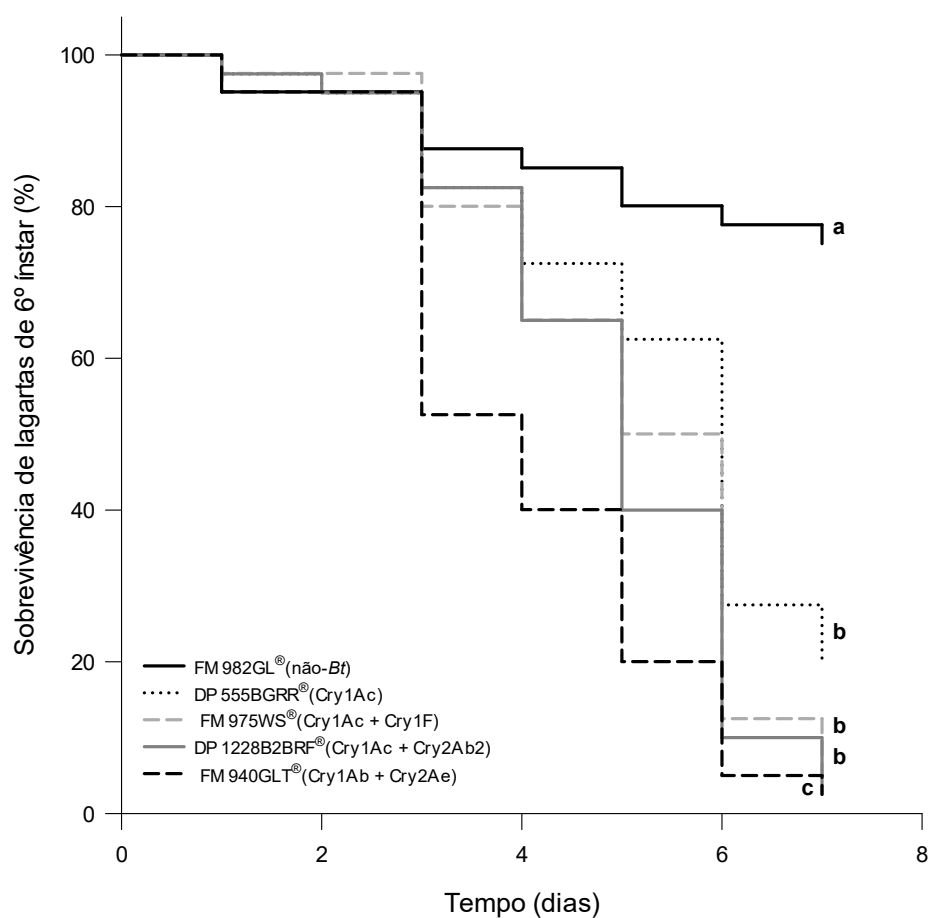


Figura 6. Curvas de sobrevivência de lagartas de sexto ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com maçãs firmes de algodoeiros *Bt* DP 555BGRR® (Bollgard), FM 975WS® (WideStrike), DP 1228B2BRF® (Bollgard II), FM 940GLT® (TwinLink) e não-*Bt* (FM 982GL®) em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Tabela 1. Médias ($\pm$ EP) das variáveis biológicas das fases imaturas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) mantidas em folhas de algodoeiro *Bt* e não-*Bt* em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Tratamentos	Mortalidade	Duração das fases imaturas (dias)			Biomassa de pupas (g)
	Larval (%)	Lagarta	Pré-pupa	Pupa	
FM 982GL [®] (não- <i>Bt</i>)	12,5 $\pm$ 3,91 (40)	20,9 $\pm$ 0,25 b (35)	2,94 $\pm$ 0,16 a (35)	13,00 $\pm$ 0,17 a (28)	0,345 $\pm$ 0,01 a (33)
DP 555BGRR [®] (Cry1Ac)	65,0 $\pm$ 7,82 (40)	33,43 $\pm$ 1,18 a (14)	2,36 $\pm$ 0,15 ab (11)	12,79 $\pm$ 0,28 a (14)	0,230 $\pm$ 0,01 b (6)
FM 975WS [®] (Cry1Ac + Cry1F)	85,0 $\pm$ 6,70 (40)	26,83 $\pm$ 0,79 a (6)	2,17 $\pm$ 0,17 b (6)	12,20 $\pm$ 0,37 a (5)	0,192 $\pm$ 0,01 b (5)
DP 1228B2RF [®] (Cry1Ac + Cry2Ab2)	100 $\pm$ 0,00 (40)	-	-	-	-
FM 940GLT [®] (Cry1Ab + Cry2Ae)	100 $\pm$ 0,00 (40)	-	-	-	-

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Número de indivíduos entre parênteses.

MANUSCRITO IV

Suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner em soja

(De acordo com as normas do periódico “Florida Entomologist”, com adaptações para as normas de “Redação de Tese” da Universidade Federal da Grande Dourados)

Suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner em soja

Resumo

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das mais importantes pragas da Agricultura Mundial, pois causa danos a diferentes plantas de importância econômica e é capaz de desenvolver rapidamente resistência aos inseticidas químicos, o que aumenta as dificuldades para o seu controle. A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner apresenta propriedades inseticidas para o controle de lagartas de *H. armigera*. A eficiência de *Bt* para o controle desta espécie pode variar ao longo dos estádios de desenvolvimento e em diferentes populações. Assim, objetivou-se avaliar a eficiência de inseticidas biológicos formulados à base de *B. thuringiensis* sobre lagartas de segundo e quarto ínstar de *H. armigera* no Brasil, país onde a espécie foi recentemente identificada. Foram testados quatro produtos à base de *Bt* e avaliada a mortalidade das lagartas de segundo e quarto ínstar de *H. armigera*, bem como o consumo foliar e os efeitos subletais em indivíduos sobreviventes. As lagartas de segundo e quarto ínstar de *H. armigera* foram suscetíveis às toxinas Cry presentes nos produtos biológicos testados. O consumo foliar das lagartas após 48h foi menor nas formulações de *Bt* quando comparado à testemunha. Na avaliação dos efeitos subletais em lagartas de quarto ínstar observou-se que apenas a duração do período larval foi afetada. De maneira geral, as toxinas de *B. thuringiensis* dos produtos biológicos testados demonstraram ser mais eficientes no controle de lagartas de segundo ínstar de *H. armigera*, ocorrendo maior porcentagem de mortalidade em relação ao quarto ínstar. Nós observamos que lagartas sobreviventes ao *Bt* completam o período larval, sofrem um prolongamento nesse período, mas as formulações não afetam a duração da fase pupal, a biomassa de pupas e a porcentagem de deformação de adultos, indicando que as lagartas sobreviventes conseguem se desenvolver normalmente e atingir a fase adulta para dar continuidade ao seu ciclo biológico. Sendo assim, a realização das aplicações, quando as lagartas estão em estágios iniciais, mais suscetíveis, são importantes, pois controlam de maneira mais eficaz os indivíduos evitando a sobrevivência e interrompendo o ciclo da praga. Os dados aqui apresentados fornecem informações sobre a suscetibilidade de lagartas de *H. armigera* às formulações de *Bt* e sobre o efeito

destas nos indivíduos sobreviventes, como subsídios para táticas de Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Palavras chave: controle biológico; efeito subletal; biologia; toxina Cry; MIP

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é referida como uma das mais importantes pragas da Agricultura na Ásia, África, Europa e Austrália (Tay et al. 2013), devido ao seu histórico de grandes surtos populacionais, dificuldade de controle e enormes prejuízos pelo Mundo (Alvi et al. 2012; Degrande & Omoto 2013). Essa espécie polífaga causa danos em diferentes plantas de importância econômica, como algodão (*Gossypium hirsutum* L.), leguminosas em geral, sorgo (*Sorghum bicolor* L.), milho (*Zea mays* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), dentre outras (Cunningham & Zalucki 2014).

No Continente Americano, a recente identificação de *H. armigera* gerou relatos de sua ocorrência em diferentes países e culturas agrícolas (Czepak et al. 2013a; Specht et al. 2013; Senave 2013; Tay et al. 2013; Murúa et al. 2014; Arneodo et al. 2015). Após a sua detecção em países da América do Sul, observou-se que a espécie apresenta grande adaptabilidade, ampla distribuição geográfica (Kriticos et al. 2015), elevada taxa de reprodução, enorme capacidade de se alimentar e se desenvolver em diferentes espécies hospedeiras, o que resultou em perdas econômicas significativas para a Agricultura, devido às dificuldades para o controle eficaz da praga (Czepak et al. 2013b), em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai.

Nesse cenário, o controle químico é a principal tática para o manejo de *H. armigera*, porém a espécie é conhecida por desenvolver rapidamente a resistência a inseticidas químicos (Kranthi et al. 2002; Torres-Vila et al. 2002; Bués et al. 2005; Alvi et al. 2012). Assim, a busca por métodos alternativos ao químico para o controle da praga faz-se necessária. Entre os métodos de controle recomenda-se a aplicação de produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner para o controle destas lagartas (Embrapa 2013). Esse entomopatógeno apresenta propriedades inseticidas para o controle de *H. armigera* (Bravo et al. 2011; Chelliah et al. 2011; Li & Bouwer 2014; Sebastião et al. 2015) e de outras lagartas (Pereira et al. 2009; González-Cabrera et al. 2011; Pérez-Guerrero et al. 2012), de forma eficiente e ecologicamente correta (Santos Junior et al. 2009; Zhuang et al. 2011; Sanahuja et al. 2011). Porém, cita-se que a eficiência de controle de *B. thuringiensis* pode ser afetada ao longo dos estádios de

desenvolvimento larval de lepidópteros, inclusive de *H. armigera* (Rausell et al. 2000; González-Cabrera et al. 2011; Li & Bouwer 2012). González-Cabrera et al. (2011) e Aggarwal et al. (2006) relatam que insetos em instares avançados comumente são mais tolerantes a inseticidas biológicos de *Bt*, sendo estes mais eficientes sobre lagartas pequenas (Sanahuja et al. 2011). No entanto, existem relatos conflitantes sobre a suscetibilidade dos estádios larvais ao *B. thuringiensis* (Liao et al. 2002).

O conhecimento da suscetibilidade da praga em diferentes regiões é essencial para formular estratégias de manejo (Babu et al. 2002). De acordo com Li e Bouwer (2012) e Sebastião et al. (2015) a suscetibilidade de *H. armigera* às toxinas de *B. thuringiensis* pode variar entre populações de diferentes países e de origem geograficamente distintas. Dados da suscetibilidade de populações brasileiras de *H. armigera* às proteínas Cry são praticamente inexistentes (Sebastião et al. 2015), tornando-se essencial a realização de estudos para estabelecer estratégias para utilização de formulações *Bt* para o controle desta praga (Avilla et al. 2005).

Assim, objetivou-se avaliar a eficiência de inseticidas biológicos formulados à base de *B. thuringiensis* sobre lagartas de segundo e quatro instar de *H. armigera*, bem como o consumo foliar e os efeitos subletais em indivíduos sobreviventes na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill).

Material e Métodos

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia Aplicada, da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no município de Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil.

Lagartas de *H. armigera* foram coletadas em uma plantação de soja em São Gabriel do Oeste, MS, em novembro de 2014 e identificadas pela técnica de PCR-RFLP (Behere et al. 2008). A criação foi realizada em sala climatizada a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12/12 horas. As lagartas foram alimentadas com folhas de soja e os adultos com solução de mel a 10%. Os ovos obtidos foram acondicionados em sacos plásticos, previamente umedecidos com água destilada, até a eclosão das lagartas.

Após a eclosão, as lagartas foram alimentadas com folhas de soja da variedade BMX Potência, até que atingissem o instar a ser avaliado. A primeira geração do inseto obtida em laboratório foi utilizada no estudo.

Foram conduzidos bioensaios com lagartas de segundo e quarto ínstar de *H. armigera*, alimentadas com folhas de soja tratadas com quatro formulações comerciais à base de *B. thuringiensis*, Dipel® SC *B. thuringiensis* var. *kurstaki* linhagem HD-1 com 17.600 UI/mg de potência (mínimo de 27,5 bilhões de esporos viáveis/g) (1,25ml/l), Thuricide® WG *B. thuringiensis* var. *kurstaki* linhagem HD-1 com 16.000 UI/mg de potência (30-50x10² esporos viáveis/mg) (1,25g/l), Agree® WG *B. thuringiensis* var. *aizawai* estirpe GC-91 com 25.000 IU/mg de potência (1 bilhão de esporos viáveis/g) (1,25g/l) e Costar® WG *B. thuringiensis* var. *kurstaki* estirpe SA-12 (850g/kg) (1,00g/l).

Para os testes, folhas completamente expandidas foram retiradas do terço médio das plantas de soja, recortadas em quadrados de 3 cm X 3 cm para lagartas de segundo ínstar e 5 cm X 5 cm para lagartas de quarto ínstar, e tratadas por imersão em cada solução de *B. thuringiensis*, por um minuto. O mesmo procedimento foi realizado para o controle, porém, utilizando-se somente água destilada. Após imersão, os quadrados foram dispostos sobre uma peneira para secagem, durante 30 minutos (Pereira et al. 2009) e posteriormente colocados em potes plásticos (100 ml) contendo papel filtro umedecido, e infestados com uma lagarta de segundo ou quarto ínstar de *H. armigera*. Após 48 horas os quadrados tratados foram substituídos por um folíolo de soja não tratado (Vicente & Fonseca 2004).

As avaliações da mortalidade foram realizadas diariamente durante sete dias (Bird & Akhurst 2007; Santos Junior et al. 2009). As lagartas foram consideradas mortas quando imóveis, de cor preta e de aparência ressecada (sintoma típico de lagartas mortas por *B. thuringiensis*) (Valicente & Fonseca 2004).

A avaliação da área foliar consumida pelas lagartas, de segundo e quarto instar, às 48h após a alimentação foi realizada por meio da avaliação do alimento não consumido, sendo essa área estimada por análise digital de imagens, que foram processadas, convertidas em pixels binários e quantificadas com o auxílio do programa de computador ImageJ (Schneider et al. 2012).

Com o intuito de observar possíveis efeitos subletais nas lagartas sobreviventes aos testes de patogenicidade por formulações de *Bt*, avaliou-se a duração dos estágios imaturos, biomassa de pupas e deformação dos adultos oriundos das lagartas sobreviventes.

O delineamento experimental de cada bioensaio foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quarenta repetições (lagartas individualizadamente dispostas) para avaliação da mortalidade e dez repetições para avaliação do consumo foliar. O

número de repetições para a avaliação dos efeitos subletais variou conforme a sobrevivência do inseto em cada tratamento. Para a interpretação dos dados de mortalidade foi realizada a análise estatística da sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier (Gehan-Breslow). Os dados referentes ao consumo foliar e efeitos subletais em sobreviventes não alcançaram a normalidade e por isso foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis (5%) para comparar os diferentes tratamentos.

Resultados

As lagartas de segundo ínstar de *H. armigera* foram suscetíveis às toxinas Cry presentes nos produtos biológicos Agree[®], Dipel[®], Costar[®] e Thuricide[®], os quais diferiram significativamente do controle (água) e não diferiram significativamente entre si (K-M= 83,827, d.f.= 4, p= <0,001) (Figura 1).

A curva de sobrevivência das lagartas de segundo ínstar mostrou que o tempo para morte foi de 2 dias, ocorrendo a maior porcentagem de mortalidade de lagartas, nas quatro formulações testadas, às 48h (dois dias após a infestação) (Figura 1), com a mortalidade variando entre 85% e 100%. Ao final das avaliações ocorreu a mortalidade de 100% das lagartas nas formulações testadas, exceto para Thuricide[®] onde a porcentagem de sobrevivência foi 2,5%.

A área foliar consumida em 48h por lagartas de segundo ínstar foi menor para as formulações *Bt* testadas, e apenas para Thuricide[®] a área foliar consumida não diferiu significativamente da testemunha (Figura 2).

Em lagartas de quarto ínstar a porcentagem de mortalidade diferiu entre as formulações testadas (K-M= 69,149, d.f.= 4, p= <0,001) (Figura 3). As formulações Agree[®] e Costar[®] promoveram as maiores porcentagens de mortalidade, 85%, com um tempo médio de sobrevivência de 3,40 e 3,30 dias, respectivamente. Enquanto que os produtos Dipel[®] e Thuricide[®] apresentaram valores menores de porcentagem de mortalidade 60 e 68%, respectivamente. Essas duas formulações resultaram em um maior tempo médio de sobrevivência, 4,56 dias para Dipel[®] e 4,37 dias para Thuricide[®].

O consumo foliar das lagartas de quarto ínstar às 48h foi menor em todas as formulações de *Bt*, quando comparado à testemunha (Figura 4). Observou-se que nas folhas tratadas com as quatro formulações de *Bt* haviam pequenos sinais de alimentação ou apenas raspagem do tecido vegetal.

Na avaliação dos efeitos subletais em lagartas de quarto ínstar observou-se que apenas a duração do período larval foi afetada (Tabela 1). Em todas as formulações à base de *B. thuringiensis* ocorreu um prolongamento do período larval, as quais diferiram significativa da testemunha (água).

As variáveis biológicas duração da fase pupal, biomassa de pupas e porcentagem de deformação de adultos não foram afetadas pelas toxinas de *B. thuringiensis* das formulações e dose testadas (Tabela 1).

Discussão

As proteínas Cry de *Bt* presentes nas formulações testadas são relatadas como tóxicas às lagartas de *H. armigera* (Liao et al. 2002; Bravo et al. 2011; Chelliah et al. 2011; Sebastião et al. 2015).

A elevada suscetibilidade das lagartas de segundo ínstar às quatro formulações *Bt* testadas evidencia o potencial de controle destes produtos sobre lagartas de *H. armigera* neste ínstar. Formulações comerciais de *Bt* geralmente contêm um múltiplo de proteínas tóxicas (Bird & Akhurst 2007) e essa associação de toxinas aumentam sua eficiência devido ao sinergismo entre essas (Avilla et al. 2005), uma vez que a mistura de diversas proteínas Cry apresenta maior atividade do que as proteínas isoladas resultando em um controle mais eficiente de pragas. Porém, é importante ressaltar que a natureza da interação entre proteínas Cry pode afetar a eficiência dos produtos formulados sobre as diferentes espécies de insetos.

Outro fator importante relacionado à eficiência dos produtos à base de *Bt*, é o fato de que além de proteínas as formulações de *Bt* contêm esporos. Essa combinação esporo-cristal pode apresentar efeito sinérgico (Avilla et al. 2005) promovendo o aumento na toxicidade de *Bt* e em alguns casos resultar no aumento da mortalidade larval (Liu et al. 1998; Chandrashekar et al. 2005).

O tempo médio de dois dias de sobrevivência das lagartas de segundo ínstar aliado à redução de área foliar consumida nas formulações *Bt* confirmam a eficiência destes produtos. As toxinas de *Bt* promovem a mortalidade, pois atuam causando a desintegração das células do intestino médio das larvas, promovendo o desequilíbrio iônico e eventual morte do inseto (Chandrashekar et al. 2005; Sanahuja et al. 2011). Abd El-Ghany et al. (2015) analisando a histopatologia do intestino médio das larvas de *H. armigera* alimentadas com cristais de *Bt* observaram a degeneração das células

colunares, a destruição das microvilosidades e da membrana peritrófica, o aparecimento de numerosos vacúolos no citoplasma e nas organelas citoplasmáticas, além do encolhimento do núcleo e destruição da bainha nuclear. Essa desintegração das células do intestino afeta a alimentação do inseto, pois pouco tempo após a infecção o inseto cessa sua alimentação, podendo morrer por inanição ou septicemia (Sanahuja et al. 2011).

A mortalidade das lagartas em um curto período de tempo resulta na redução do consumo e consequentemente em menores danos às plantas. Lalitha et al. (2011) também relatam a eficácia de isolados de *Bt* reduzindo a população de *H. armigera* em feijão *Lablab purpureus* (L.) Sweet, bem como a redução dos danos em vagens.

A área foliar consumida por lagartas de segundo ínstar para a formulação Thuricidae® também foi mínima, porém não diferiu da testemunha, provavelmente isso se deve ao fato de que houve sobrevivência de 2,5% dos indivíduos neste tratamento os quais continuaram se alimentando.

O menor consumo foliar e o prolongamento do período larval em lagartas de quarto ínstar sobreviventes se devem à suscetibilidade de *H. armigera* às toxinas *Bt*, pois a suscetibilidade está associada com a inibição do crescimento para a espécie (Bird & Akhurst 2007). Segundo Van Frankenhuyzen (2009) os efeitos subletais (inibição da alimentação e do crescimento) são os mais sensíveis indicadores de toxicidade das proteínas Cry de *Bt*. Assim, o prolongamento do período larval ocorre como estratégia para o inseto adquirir as reservas nutricionais e peso necessários para atingir a fase de pupa e posteriormente adulta.

Babu et al. (2002), Avilla et al. (2005) e Li e Bouwer (2012) relataram a inibição do crescimento larval em lagartas de *H. armigera* alimentadas com dieta contendo toxinas Cry. A mistura de diferentes toxinas Cry, o que geralmente ocorre em formulações comerciais de *Bt* (Bird & Akhurst 2007), apresenta efeitos aditivos na inibição do crescimento das larvas de *H. armigera* (Ibargutxi et al. 2008).

Os resultados aqui apresentados contrariam Babu et al. (2002), que sugerem que o fato da toxina Cry2Aa causar a inibição do crescimento em larvas sobreviventes, essas não se tornariam adultos normais. Como foi aqui observado as lagartas de quarto ínstar que sobrevivem e completam o período larval, sofrem um alongamento nesse período, mas as formulações não afetam a duração da fase pupal, a biomassa de pupas e a porcentagem de adultos deformados, indicando que os sobreviventes conseguem se desenvolver normalmente e atingir a fase adulta para dar continuidade ao seu ciclo

biológico. Assim, as aplicações de Bt formulados quando as lagartas estão em estádios iniciais, relatados como mais suscetíveis, são extremamente importantes, pois controlam de maneira eficaz os indivíduos evitando a sobrevivência e possíveis danos posteriores.

A maior porcentagem de sobrevivência das lagartas de quarto ínstar foi nas formulações de Dipel® e Thuricide® o que revela a menor sensibilidade de *H. armigera* a estas formulações e concentrações.

De maneira geral, as toxinas de *B. thuringiensis* dos produtos biológicos testados demonstraram ser mais eficientes no controle de lagartas de segundo ínstar de *H. armigera*, ocorrendo maior porcentagem de mortalidade em relação ao quarto ínstar. Vários estudos relatam a influência do estágio de desenvolvimento larval, reduzindo a suscetibilidade desta espécie às toxinas de *Bt* (Bird & Akhurst 2007; Li e Bouwer 2012). González-Cabrera et al. (2011) e Aggarwal et al. (2006) relatam que insetos em ínstares avançados comumente são mais tolerantes a inseticidas biológicos de *Bt*, sendo estes mais eficientes sobre lagartas em ínstares iniciais. Essa diminuição da suscetibilidade das lagartas ao *Bt* ao longo do desenvolvimento larval é explicada por Rausell et al. (2000) que em seus estudos com *Thaumetopoea pityocampa* (Schiff.) ((Lepidoptera: Notodontidae) correlacionaram a diminuição da toxicidade da toxina Cry1Ab durante o desenvolvimento larval com a perda ou redução da afinidade de um sítio de ligação para esta toxina em larvas de último ínstar. Uma vez que a ligação das toxinas Cry aos receptores do intestino médio do inseto é um passo fundamental no modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis*, a perda desses receptores com o aumento da idade larval resulta na diminuição da toxicidade destas toxinas às larvas (Rausell et al. 2000).

Bird e Akhurst (2007) relatam que lagartas de terceiro ínstar de *H. armigera* apresentaram maior tolerância às toxinas de *Bt* em relação a lagartas neonatas. No entanto, existem relatos conflitantes sobre a suscetibilidade dos estágios larvais ao *B. thuringiensis* (Liao et al. 2002). Liao et al. (2002) comparando a suscetibilidade de *H. armigera* ao *Bt*, em dieta incorporada com solução de Dipel®, observaram que houve diminuição da mortalidade no quinto ínstar quando comparado ao segundo ínstar, porém a mortalidade do terceiro ínstar quando comparada a das neonatas não diferiu. Esses resultados revelam a necessidade do cuidado ao se comparar dados oriundos de diferentes protocolos experimentais (Avilla et al. 2005; Bird & Akhurst 2007; Van Frankenhuyzen 2009).

Faz-se necessário ressaltar que vários fatores podem afetar a suscetibilidade da praga às toxinas de *B. thuringiensis*, entre esses a variabilidade entre populações geográficas diferentes (Frankenhuyzen 2009; Li e Bouwer 2012; Sebastião et al. 2015), o histórico das táticas de controle utilizadas na área de coleta (Chandrashekar et al. 2005), as diferenças nos protocolos de bioensaios e nas condições experimentais, tais como temperatura e umidade, e também o vigor da população podem influenciar na capacidade de tolerância de um inseto para suportar o estresse imposto pelo *Bt* (Avilla et al. 2005; Bird & Akhurst 2007).

Os dados apresentados em nosso estudo fornecem informações sobre a suscetibilidade de lagartas de *H. armigera* às formulações *Bt* e sobre o efeito destas sobre os indivíduos sobreviventes. Estas informações são importantes para o desenvolvimento de programas de manejo integrado da praga em campo, visando à definição de aplicações de controle efetivo, bem como a utilização desses produtos para o controle de lagartas em áreas de ocorrência de escape do controle por plantas *Bt* e também para produtores que optam pela produção orgânica, uma vez que são alternativos aos químicos e apresentam eficiência de controle e redução de danos.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão de bolsa de Doutorado (Processo nº 23/200.733/2013). A José Jairo da Silva da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja) pela colaboração com as técnicas de PCR-RFLP para identificação molecular da espécie.

Referências Citadas

- Abd El-Ghany NM, Saker M, Salame HS, Ragaie M. 2015. Histopathology of the larval midgut of *Helicoverpa armigera* (Hubner) fed on *Bacillus thuringiensis* crystals and *Bt*-tomato plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13: 221–225.
- Aggarwal N, Holaschke ME, Basedow T. 2006. Evaluation of bio-rational insecticides to control *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera exigua* (Hübner)

- (Lepidoptera: Noctuidae) fed on *Vicia faba* L. Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie 15: 245-250.
- Alvi AHK, Sayyed AH, Naeem M, Ali M. 2012. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. PLoS ONE 7:1-9.
- Arneodo JD, Balbi EI, Flores FM, Sciocco-Cap A. 2015. Molecular Identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) in Argentina and Development of a Novel PCR-RFLP Method for its Rapid Differentiation From *H. zea* and *H. gelotopoeon*. Journal of Economic Entomology 108: 2505-2510.
- Avilla C, Vargas-Osuna E, González-Cabrera J, Ferré J, González-Zamora JE. 2005. Toxicity of several delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. Journal of Invertebrate Pathology 90: 51–4.
- Babu BG, Udayasuriyan V, Mariam MA, Sivakumar NC, Bharathi M, Balasubramanian G. 2002. Comparative toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (H.). Crop Protection 21: 817–822.
- Behere GT, Tay WT, Russell DA, Batterham P. 2008. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). Bulletin of Entomological Research 98: 599-603.
- Bird LJ, Akhurst RJ. 2007. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. Journal of Invertebrate Pathology 94: 84–94.
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41: 423-431.
- Bués R, Bouvier JC, Boudinhon L. 2005. Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. Crop Protection 24: 814-820.
- Chandrashekar K, Kumari A, Kalia V, Gujar GT. 2005. Baseline susceptibility of the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* Berl. var. *kurstaki* and its endotoxins in India. Current Science 88: 167–175.

- Chelliah A, Gupta GP, Karuppiyah S, Kumar PA. 2011. Chimeric *d*-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* with increased activity against *Helicoverpa armigera*. International Journal of Tropical Insect Science 31: 59-68.
- Czepak C, Albernaz KC, Vivan LM, Guimarães HO, Carvalhais T. 2013a. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. Pesquisa Agropecuária Tropical 43:110-113.
- Czepak C, Vivan LM, Albernaz KC. 2013b. Pragas da vez. Cultivar 167: 20-27.
- Degrande PE, Omoto C. 2013. Pragas: Estancar prejuízos. Cultivar 167:30-34.
- Embrapa. 2013. Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas, [online] [http://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa/Manejo Helicoverpa.pdf/view](http://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa/Manejo%20Helicoverpa.pdf/view) (Acesso pela última vez em: 15 de junho de 2013).
- González-Cabrera J, Mollá O, Montón H, Urbaneja A. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). BioControl 56: 71-80.
- Ibargutxi MA, Muñoz D, Escudero IRD, Caballero P. 2008. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). Biological Control 47: 89-96.
- Kranthi KR, Jadhav DR, Kranthi S, Wanjari RR, Ala SS, Russell CDA. 2002. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. Crop Protection 21: 449-460.
- Kriticos DJ, Ota N, Hutchison WD, Beddow J, Walsh T, Tay WT, Borchert DM, Paula-Moreas SV, Czepak C, Zalucki MP. 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? PLoS One 10: 1-24.
- Lalitha C, Muralikrishna T, Rao VS. 2011. Field evaluation of native *Bacillus thuringiensis* strains against *Helicoverpa armigera* (Hubner) in field bean (*Lablab purpureus*). Pest Management in Horticultural Ecosystems 17: 121-126.
- Li H, Bouwer G. 2012. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. Journal of Invertebrate Pathology 109: 110-6.

- Li H, Bouwer G. 2014. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 7-13.
- Liao C, Heckel DG, Akhurst R. 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 55–63.
- Liu YB, Tabashnik BE, Moar WJ, Smith RA. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1385-1389.
- Murúa MG, Scalora FS, Navarro FR, Cazado LE, Casmuz A, Villagrán ME, Lobos E, Gastaminza G. 2014. First Record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist* 97: 854-856.
- Pereira JM, Seii AH, Oliveira MF, Brustolin C, Fernandes PM. 2009. Mortalidade de lagartas de *Spodoptera eridania* (Cramer) pela utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Pesquisa Agropecuária Tropical* 39: 140-143.
- Perez-Guerrero S, Aldebis HK, Vargas-Osuna H. 2012. Toxicity of six *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against the olive moth *Prays oleae*. *Bulletin of Insectology* 65: 119-122.
- Rausell C, Martínez-Ramírez AC, García-Robles I, Real MD. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1553–1558.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9: 283–300.
- Santos Junior HJG, Marques EJ, Polanczyk RA, Pratissoli D, Rondelli VM. 2009. Suscetibilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). *Arquivos do Instituto Biológico* 76: 635-641.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceire KW. 2012. Nih Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.
- Sebastião I, Lemes ARN, Figueiredo CS, Polanczyk RA, Desidério JA, Lemos MVF. 2015. Toxicidade e capacidade de ligação de proteínas Cry1 a receptores intestinais de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 50: 999-1005.

- Senave. 2013. Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola, [online] <http://www.abc.com.py/edicion-impresa/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html> (Acesso pela última vez em: 15 de junho de 2013).
- Specht A, Sosa-Gomez DR, Paula-Moraes SV, Yano SAC. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 689-692.
- Tay WT, Soria MF, Walsh T, Thomazoni D, Silvie P, Gajanan TB, Craig A, Sharon D. 2013. A brave new world for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE* 8:1-7.
- Torres-Vila LM, Rodriguez-Molina C, Plasencia AL, Bielza-Lino P, Rodriguez-Del-Rincón A. 2002. Pyrethroid resistance of *Helicoverpa armigera* in Spain: current status and agroecological perspective. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 93: 55-65.
- Valicente FH, Fonseca MM. 2004. Suscetibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 3: 21-29.
- Van Frankenhyuzen K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.
- Zhuang L, Zhou Z, Wang Y, Liu Z, Xu R. 2011. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresource Technology* 102: 4820-4826.

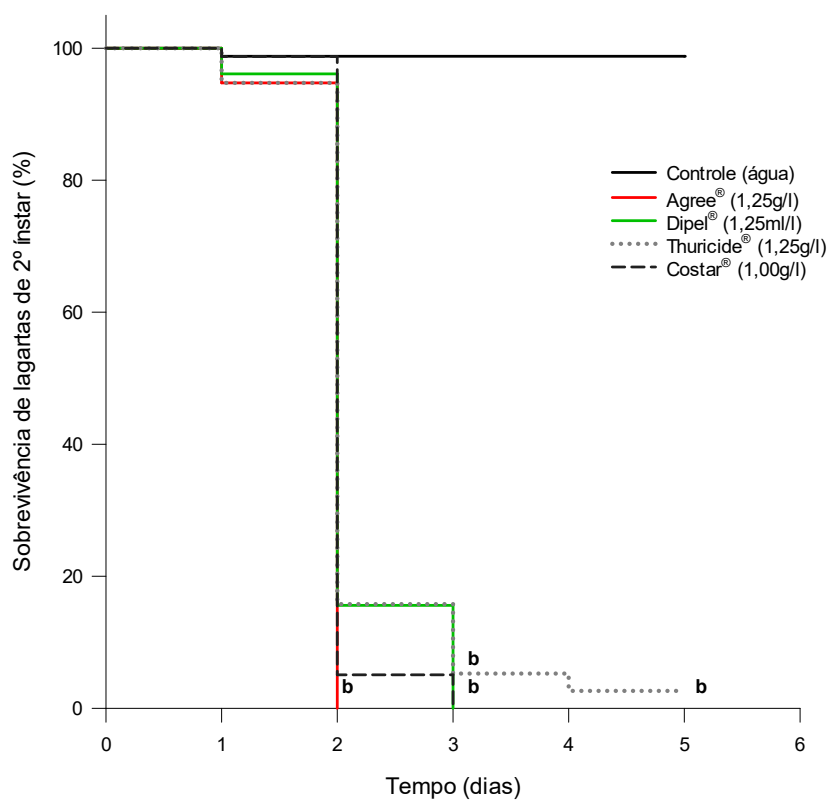


Figura 1. Curvas de sobrevivência de lagartas de segundo ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de soja tratadas com diferentes formulações inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Análise estatística da sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier (Gehan-Breslow).

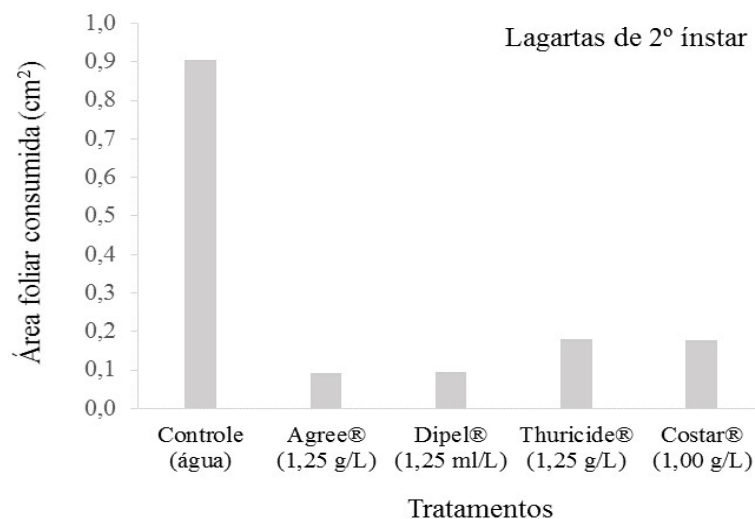


Figura 2. Média da área foliar consumida (cm²) em 48h por lagartas de segundo ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de soja tratadas com diferentes formulações inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* em condições de laboratório (25 ± 2° C, 70 ± 10% UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade.

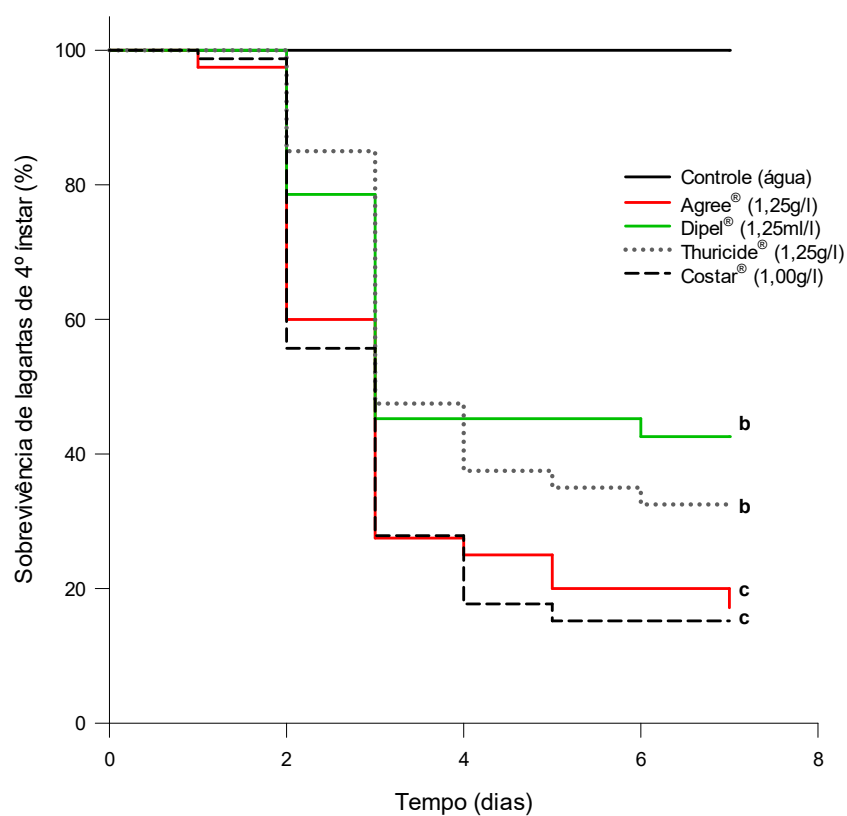


Figura 3. Curvas de sobrevivência de lagartas de quarto ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de soja tratadas com diferentes formulações inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Análise estatística da sobrevivência pelo teste de Kaplan-Meier (Gehan-Breslow).

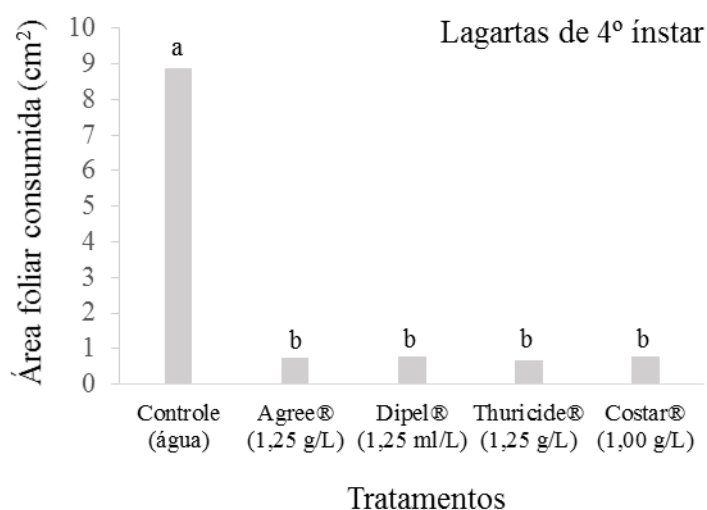


Figura 4. Média da área foliar consumida (cm²) em 48h por lagartas de quarto ínstar de *Helicoverpa armigera* alimentadas com folhas de soja tratadas com diferentes formulações inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* em condições de laboratório (25 ± 2° C, 70 ± 10% UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Médias ($\pm$ EP) das variáveis biológicas de lagartas de quarto ínstar de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) sobreviventes após alimentação em laboratório com folhas de soja tratadas com diferentes formulações inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* em condições de laboratório ($25 \pm 2^\circ$ C, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Tratamentos	Duração das fases imaturas (dias)		Biomassa de pupas (g) ^{ns}	Deformação de adultos (%)
	Larva ¹	Pupa ^{ns}		
Controle (água)	20.46 $\pm$ 0.15 b (39)	13.13 $\pm$ 0.14 (38)	0.246 $\pm$ 0.00 (39)	0.00 (38)
Agree [®] (1,25 g/L)	25.75 $\pm$ 0.75 a (4)	13.25 $\pm$ 0.48 (4)	0.240 $\pm$ 0.01 (4)	0.00 (4)
Dipel [®] (1,25 ml/L)	26.43 $\pm$ 0.51 a (14)	13.07 $\pm$ 0.22 (14)	0.227 $\pm$ 0.01 (14)	0.00 (14)
Thuricide [®] (1,25 g/L)	26.50 $\pm$ 0.57 a (12)	13.18 $\pm$ 0.23 (11)	0.254 $\pm$ 0.01 (12)	0.00 (11)
Costar [®] (1,00 g/L)	26.00 $\pm$ 0.63 a (6)	13.00 $\pm$ 0.45 (6)	0.248 $\pm$ 0.01 (6)	0.00 (6)
Valor de p	<0.05	>0.05	>0.05	-

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5%.

^{ns}Médias não significativas pelo teste de Kruskal Wallis a 5%.

Número de indivíduos entre parênteses.

Conclusões e considerações finais

A variação de hospedeiros afetou o desempenho biológico de *H. armigera*. Quando alimentada com folhas de soja, algodoeiro e feijoeiro essa espécie sobrevive, desenvolve e reproduz, demonstrando que *H. armigera* tem potencial de multiplicação em culturas agrícolas de importância econômica no Brasil. Já as folhas de milho não permitem o desenvolvimento de *H. armigera*, entretanto em meristema do cartucho do milho a espécie se desenvolve e reproduz. Em buva as lagartas não se desenvolvem, demonstrando que esta planta espontânea atue apenas como um hospedeiro temporário na ausência de hospedeiros preferenciais e adequados para espécie.

A soja *Bt* que expressa a proteína Cry 1Ac é uma tática de controle eficiente sobre os seis instares larvais de *H. armigera*, recém introduzida no Brasil.

Os algodoeiros *Bt* DP 555BGRR[®] (Cry1Ac), FM 975WS[®] (Cry1Ac + Cry1F), DP 1228B2RF[®] (Cry1Ac + Cry2Ab2) e FM 940GLT[®] (Cry1Ab + Cry2Ae) afetaram negativamente a sobrevivência das lagartas *H. armigera*. Em indivíduos sobreviventes, nas variedades *Bt* DP 555BGRR[®] e FM 975WS[®], ocorreu o alongamento do período larval e redução no peso de pupas. A utilização de eventos de algodão piramidados, com duas proteínas *Bt* com mecanismos de ação distintos, se mostrou mais efetiva no controle dos instares larvais de *H. armigera*.

As lagartas de *H. armigera* foram susceptíveis as proteínas Cry de *B. thuringiensis* presentes nos produtos formulados Agree[®], Dipel[®], Costar[®] e Thuricide[®]. Em lagartas de quarto instar sobreviventes apenas ocorre um alongamento do período larval, mas essas conseguem se desenvolver e tornam-se adultas normais para dar continuidade ao seu ciclo biológico. De maneira geral, as lagartas em estádios iniciais foram mais suscetíveis aos formulados à base de *Bt*, desmonstrando que a realização das aplicações quando as lagartas estão em estádios iniciais, mais suscetíveis, são importantes, pois controlam de maneira mais eficaz os indivíduos evitando a sobrevivência e interrompendo o ciclo da praga.

Nossos resultados contribuem com informações para entender as consequências da introdução de *H. armigera* no Brasil, fornecem informações importantes para subsidiar táticas de MIP, indicando que esta praga tem ótimas condições de adaptação às culturas da soja, do algodão e do feijão no Brasil, com controle biotecnológico efetivo disponível para as duas primeiras espécies vegetais e controle microbiano capaz de promover elevadas mortalidades de lagartas desta praga.