

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LUCAS NATANIEL WISCH

**INTERAÇÕES ENTRE LEPIDÓPTEROS-PRAGA DA SOJA E
ENTOMOPATÓGENOS, COM ÊNFASE EM *BACILLUS*
THURINGIENSIS QUE EXPRESSA A PROTEÍNA CRY1Ac**

PONTA GROSSA – PR
2016

LUCAS NATANIEL WISCH

**INTERAÇÕES ENTRE LEPIDÓPTEROS-PRAGA DA SOJA E
ENTOMOPATÓGENOS, COM ÊNFASE EM *BACILLUS*
THURINGIENSIS QUE EXPRESSA A PROTEÍNA CRY1AC**

Tese apresentada para obtenção do título de doutor
na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de
Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jenny S. Cory

PONTA GROSSA – PR
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

- 811 Wisch, Lucas Nataniel
- Interações entre lepidópteros-praga da soja e entomopatógenos, com ênfase em *Bacillus thuringiensis* que expressa a proteína Cry1Ac/ Lucas Nataniel Wisch. Ponta Grossa, 2016. 89 f.
- Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez.
- Coorientadora: Prof^a Dr^a Jenny S Cory.
- 1.Cultura geneticamente modificada. 2.Noctuídeos. 3.Efeito subletal. 4.Vírus de poliedrose nuclear. 5.Metarhizium rileyi. I.Sosa-Gómez, Daniel Ricardo. II. Cory, Jenny S. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Agronomia. IV. T.

CDD: 630



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Tese: “Interações entre lepidópteros-praga da soja e entomopatógenos, com ênfase em *Bacillus thuringiensis* que expressa a proteína Cry1Ac”.

Nome: Lucas Nataniel Wisch

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Profª Drª Gislayne F. Lemes Trindade Vilas Boas

Dr. Adeney de Freitas Bueno

Dr. Marcos Rodrigues de Faria

Prof. Dr. Adalci Leite Torres

Data da Realização: 26 de fevereiro de 2016.

DEDICO

À minha família que sempre me incentivou e
apoiou em estudar como forma de
alcançar o sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar os caminhos da minha vida e por tudo que me concede a cada momento.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado “sanduíche”.

Em especial, ao Dr. Daniel R. Sosa-Gómez, pela amizade e, principalmente, pelas valiosas orientações, apoio, incentivo e dedicação que contribuíram ao meu desenvolvimento acadêmico e profissional, também por ensinar, pelo exemplo, valores éticos e humanos, serei eternamente grato.

À Embrapa Soja pela oportunidade de conduzir os trabalhos da tese, disponibilizando o Laboratório de Patologia de Insetos e, por usufruir, a Biblioteca para pesquisas bibliográficas.

À Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dos experimentos no Laboratório de Controle Biológico – Dra. Jenny S. Cory, Simon Fraser University (SFU).

À Dra. Jenny S. Cory, pela oportunidade concedida em realizar o estágio no Laboratório de Controle Biológico - SFU, pela dedicação e orientação aos trabalhos que complementaram este estudo.

À Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira, Pesquisadora em Estatística da Embrapa Soja, pela contribuição na realização das análises estatísticas, pela amizade e companheirismo.

À Profa. Dra. Gislayne T. Vilas-Boas, pela disponibilização de *Bacillus thuringiensis*, cepa HD-73, a qual foi essencial para o desenvolvimento da presente pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da UEPG, pela contribuição em aprendizado.

Ao Prof. Dr. Rui S. Furiatti, pela oportunidade de estágio de docência, pelas orientações e trabalhos desenvolvidos durante o doutorado.

Aos colaboradores do Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Soja, em especial ao Fábio Paro, Jovenil J. da Silva, Ivanilda Soldorio, Sérgio Henrique, José Jairo e Miguel Pereira, pelo carinho, amizade e que de certa forma, cada um teve específicas e importantes contribuições com o desenvolvimento da tese.

Aos colaboradores de Campo da Entomologia da Embrapa Soja, Oriverto Tonon, Adriano Dalbem e Wilson Pozenato, pela amizade e suporte aos ensaios em campo.

Aos colaboradores da Casa de Vegetação da Embrapa Soja, que deram suporte para as atividades desenvolvidas neste ambiente.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Soja, Patrícia Husch e Jhibran Ferral-Piña, pela colaboração prestada nas atividades desenvolvidas para a tese, como também pela amizade, convivência e companheirismo.

Às amizades realizadas durante essa jornada no Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Soja, pelo companheirismo e auxílio de Andressa, Grabiele, Gizele, Juliane, Lucimari, Silvia Cavaguchi e William.

Ao amigo Leonardo Cirilo, pelo suporte e apoio com a elaboração da tese.

À minha amiga e companheira Mariana Araujo, por sempre ter incentivado e apoiado em todos os momentos dessa jornada.

A todos colegas que sempre estiveram presentes, me aconselhando, ajudando e incentivando com carinho e dedicação.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho.

WISCH, Lucas Nataniel. **Interações entre lepidópteros-praga da soja e entomopatógenos, com ênfase em *Bacillus thuringiensis* que expressa a proteína Cry1Ac**. 2016. Tese de Doutorado em Agronomia – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

RESUMO

A soja é a principal cultura de importância econômica e comercialmente produzida em larga escala no Brasil. Porém, diversos são os fatores que afetam o potencial produtivo desta oleaginosa, entre eles destacam-se os insetos da ordem Lepidoptera. Como alternativa para controle destas pragas, diversos produtores têm adotado o uso da soja Bt, que expressa a toxina Cry1Ac. Contudo, a expansão da área com essa tecnologia gera dúvidas quanto ao impacto da exposição de Cry1Ac aos insetos-alvo e não-alvo e seus entomopatógenos, *Metarhizium rileyi* e os vírus de poliedrose nuclear. Assim, os objetivos desse trabalho foram: elucidar o impacto de concentrações subletais da cepa HD-73, que expressa Cry1Ac, i) no sistema imunológico de *Spodoptera frugiperda*, a fim de investigar se o desafio com Bt induz a “memória imunológica”; ii) na virulência e produção de corpos de oclusão do vírus em *S. frugiperda*; iii) na mortalidade larval das espécies de noctuídeos, quando aplicada de forma simultânea ou sequencial com VPN e *M. rileyi*; e iv) nos parâmetros biológicos de noctuídeos-alvo e não-alvo, quando aplicada em conjunto com os entomopatógenos. No ensaio imunológico, lagartas neonatas foram expostas *ad libitum* a diferentes concentrações de HD-73 (0, 15, 33, 72,6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), no quinto instar foi extraída a hemolinfa e avaliado o número de hemócitos, proteína total e atividade da fenoloxidase (PO). Neonatas descendentes destes indivíduos foram inoculadas com 0 e 40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de HD-73 e no quinto instar quantificou-se os mesmos componentes de resposta imune observados nos parentais, incluindo a atividade antibacteriana. Os parâmetros biológicos também foram observados nestes ensaios. Nas avaliações do impacto de Cry1Ac na infectividade de vírus sobre *S. frugiperda*, neonatas foram inoculadas com HD-73 (0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e mantidas até o final do terceiro instar, e no início do quarto instar ocorreu a infecção com vírus (0, 10^3 e 10^4 CO.lagarta $^{-1}$), após foi avaliado o peso larval (4 DAE), a mortalidade, o número de CO.cadáver $^{-1}$ e, posteriormente, teste de virulência (CL_{50}). Lagartas de *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *S. frugiperda*, *Chrysodeixis includens* e *Rachiplusia nu*, foram expostas de forma simultânea ou sequencial aos entomopatógenos, HD-73, *M. rileyi* e os respectivos vírus, para registrar a mortalidade e os parâmetros biológicos destas interações. As concentrações subletais de HD-73 não provocaram alterações no sistema imune dos parentais, como também não houve evidências de imunidade adquirida nas progênies. HD-73 afetou subletalmente os componentes biológicos de *S. frugiperda*, proporcionando menor peso larval e pupal, redução na fecundidade e viabilidade dos ovos. HD-73 proporcionou menor rendimento de CO.cadáver $^{-1}$ e menor virulência dos vírus multiplicados em lagartas expostas a 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. As interações não afetaram os parâmetros biológicos dos noctuídeos em estudo. Na maioria dos casos observou-se efeito negativo nas interações entre HD-73 e vírus, mas podendo ser promissor a inoculação simultânea de HD-73 e *M. rileyi* no controle de *S. eridania* e *S. frugiperda*. Concentrações subletais de HD-73 não proporcionaram maior mortalidade das Plusiinae nas interações com *M. rileyi* e vírus, exceto na associação HD-73+*M. rileyi* que apresentou efeitos positivos e negativos sobre *C. includens*.

Palavras-chave: cultura geneticamente modificada, noctuídeos, efeito subletal, sistema imunológico, vírus de poliedrose nuclear, *Metarhizium rileyi*.

ABSTRACT

Soybean is the main crop of economic importance and commercially produced on a large scale in Brazil. Nevertheless many are the factors that affect the productive potential of this oilseed, among them stand out the insects of the order Lepidoptera. As an alternative to control these pests, many growers have adopted the use of Bt soybean, which expresses the Cry1Ac toxin. However, the large area with this technology can generate a main concern that is Cry1Ac exposure to target and non-target insects and its entomopathogens, such *Metarhizium rileyi* and nuclear polyhedrosis virus. The aim of this study was to elucidate the HD-73 impacts, that expresses Cry1Ac, i) in the immune system of *S. frugiperda* in order to investigate whether Bt challenge parental induce "immune priming or transgenerational effects"; ii) on virulence and occlusion body yield in *Spodoptera frugiperda* iii) level of larval mortality of the noctuid species when applied simultaneously or sequentially with NPV and *M. rileyi*; and iv) the biological parameters of the noctuid species, when exposed in conjunction with entomopathogens. In the immune assay, neonate larvae were exposed *ad libitum* to different concentrations of HD-73 (0, 15, 33, 72.6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), in the fifth instar were extracted the haemolymph and measured the number of haemocytes, total protein and phenoloxidase activity (PO). Neonate offspring of those individuals were inoculated with 0 and 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of HD-73 and again was quantified the same immune components in fifth instar larvae, including antibacterial activity. In addition, biological parameters were observed in these tests. In the evaluation of Cry1Ac impacts on virus infectivity in *S. frugiperda*, neonate were exposed to HD-73 (0, 10, 40 and 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) until the end of the third instar and early of the fourth instar was inoculated with viruses (0, 10^3 and 10^4 OB.larvae $^{-1}$). For this assay was evaluated larval weight (4 DAE), mortality, number of OB/caterpillar and subsequently, virulence test (LC_{50}). *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania*, *S. frugiperda*, *Chrysodeixis includens* and *Rachiplusia nu* caterpillars were simultaneously or sequentially exposed to entomopathogens, HD-73, *M. rileyi* and their viruses, and record mortality and biological parameters of these interactions. The sublethal concentrations of HD-73 did not cause changes in the immune system of the parental, as well as there was no evidence for acquired immunity in the offspring. Sublethal concentration of HD-73 affected the biological components of *S. frugiperda*, providing lower larval and pupal weight, reduced fecundity and egg viability. HD-73 proved lower OB yield/caterpillar and lower virulence of the virus multiplied in caterpillars prior exposed to 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. The interactions did not affect the biological parameters of these noctuids. In most cases was observed negative effect in the interactions between HD-73 and viruses, but may be promising simultaneous inoculation of HD-73 and *M. rileyi* to control *S. eridania* and *S. frugiperda*. Sublethal concentrations of HD-73 did not provide larger mortality of Plusiinae in interactions with *M. rileyi* and viruses, except for HD-73+ *M. rileyi* that had positive and negative effects on *C. includens*.

Key-words: genetically modified crops, noctuid, sublethal effect, immune system, nuclear polyhedrosis virus, *Metarhizium rileyi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Delineamento experimental dos estudos da resposta imunológica de <i>Spodoptera frugiperda</i> à estirpe HD-73 (Cry1Ac), de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> . Parental: cada 128 neonatas foram expostas às concentrações: 0, 15, 33 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73. Adultos: cerca de 20 casais de cada tratamento (0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73) foram separados para obtenção das progênes. Progênes: cada 128 neonatas foram expostas às concentrações: 0 e 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73. As respectivas épocas e variáveis avaliadas foram: peso larval – 5 e 11 dias após exposição (DAE) ao patógeno; peso pupal (>72 h); extração de hemolinfa no quinto instar para mensuração de hemócitos, análise de proteína total, atividade de fenoloxidase (PO) e antibacteriana; quantificação de ovos/fêmeas e viabilidade dos ovos nos três primeiros dias de postura de cada fêmea.....	22
Figura 2.	Peso larval, aos 5 e 11 dias após a exposição (DAE) ao patógeno, peso pupal (>72 h) (a); e mortalidade larval (b) ($\pm\text{EP}$), na geração parental de <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição às concentrações 0, 15, 33 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac).....	25
Figura 3.	Fecundidade por fêmea e viabilidade dos ovos (a); e o número de ovos por fêmea nos três primeiros dias de postura (b) ($\pm\text{EP}$), após exposição das lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> às concentrações 0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac).....	26
Figura 4.	Peso larval, aos 5 e 11 dias após a exposição (DAE) ao patógeno, peso pupal (>72 h) (a); e mortalidade larval (b) ($\pm\text{EP}$) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após as progênes serem expostas às concentrações 0 e 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac), e previamente os parentais com 0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73	27
Figura 5.	Densidade de hemócitos (a), concentração total de proteína (b) e atividade de fenoloxidase [PO (c)] ($\pm\text{EP}$) quantificados em lagartas de quinto instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição às concentrações 0, 15, 33 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac).....	28
Figura 6.	Resposta imune [hemócitos (a), proteína total (b), atividade de fenoloxidase – PO (c) e atividade antibacteriana (d)] ($\pm\text{EP}$) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após as progênes serem expostas às concentrações 0 e 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac), e previamente os parentais com 0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73.....	30
Figura 7.	Delineamento experimental das infecções combinadas entre a estirpe HD-73 (Cry1Ac) e o vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), com diferentes tempos de exposição a cada patógeno e ao longo do desenvolvimento larval de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Exposição à HD-73: cerca de 200 neonatas foram expostas a 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 e mantidas até o final do terceiro instar. Jejum: no final do terceiro instar, as lagartas permaneceram em jejum por	

	aproximadamente 16 h. Exposição ao SfMNPV: cerca de 48 lagartas no início do quarto instar foram infectadas com 0, 10^3 e 10^4 corpos de oclusão (CO).lagarta ⁻¹	37
Figura 8.	Peso larval ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera frugiperda</i> aos quatro dias após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 0, 10^3 e 10^4 corpos de oclusão (CO).lagarta ⁻¹ , em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac).....	39
Figura 9.	Mortalidade larval (%) ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 0, 10^3 e 10^4 corpos de oclusão (CO).lagarta ⁻¹ , em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de HD-73 (Cry1Ac).....	40
Figura 10.	Tempo médio (dias) ($\pm$ EP) para mortalidade de <i>Spodoptera frugiperda</i> após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 10^3 e 10^4 corpos de oclusão (CO).lagarta ⁻¹ , em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de HD-73 (Cry1Ac).....	40
Figura 11.	Rendimento de corpos de oclusão (CO) por cadáver de <i>Spodoptera frugiperda</i> após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 10^3 e 10^4 CO.lagarta ⁻¹ , em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de HD-73 (Cry1Ac).....	41
Figura 12.	Concentração letal (CL_{50}) de vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV) em lagartas de quarto instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> . Teste de virulência do SfMNPV oriundo da multiplicação de corpos de oclusão (CO) em lagartas expostas previamente às concentrações 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de HD-73 (Cry1Ac) e, posteriormente, com 10^4 CO.lagarta ⁻¹	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Mortalidade larval, peso larval (7 DAE aos patógenos), peso pupal (<24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera eridania</i> após exposição simultânea aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (<i>S. eridania</i> VPN).....	52
Tabela 2.	Mortalidade larval, peso larval (7 DAE aos patógenos), peso pupal (<24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição simultânea aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).....	53
Tabela 3.	Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera eridania</i> após exposição sequencial aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (<i>Spodoptera eridania</i> VPN).....	54
Tabela 4.	Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera cosmioides</i> após exposição sequencial aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (<i>Spodoptera cosmioides</i> VPN).....	55
Tabela 5.	Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual de <i>Spodoptera cosmioides</i> após a exposição sequencial aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (<i>Spodoptera cosmioides</i> VPN).....	56
Tabela 6.	Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição sequencial aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).....	57
Tabela 7.	Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual de <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição sequencial aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).....	57
Tabela 8.	Mortalidade larval, peso larval (9 DAE ao tecido foliar), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição aos tecidos foliares, incorporado na dieta artificial ou “ <i>in natura</i> ”, dos genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR, e aos entomopatógenos, <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).....	59

Tabela 9.	Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual de <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição aos tecidos foliares, dos genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR, incorporados na dieta, e aos entomopatógenos, <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).....	59
Tabela 10.	Tipos de interações [negativa (Neg.), positiva (Pos.) e aditividade (Add.)] entre bactéria HD-73 ou genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR (Cry1Ac), os vírus de poliedrose nuclear (<i>Spodoptera cosmioides</i> VPN, <i>Spodoptera eridania</i> VPN e SfMNPV) e o fungo <i>Metarhizium rileyi</i> , determinada através da relação entre a porcentagem de mortalidade observada (Mo) e a mortalidade esperada (Me) de <i>Spodoptera cosmioides</i> , <i>Spodoptera eridania</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i> ...	61
Tabela 11.	Mortalidade larval, peso larval (7 DAE aos patógenos), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) após a exposição simultânea de lagartas de quarto instar de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Rachiplusia nu</i> aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73) e aos respectivos vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV e RanuMNPV).....	69
Tabela 12.	Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (> 24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) após a exposição sequencial de neonatas de <i>Chrysodeixis includens</i> aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV).....	71
Tabela 13.	Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual após a exposição sequencial de neonatas de <i>Chrysodeixis includens</i> aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV).....	71
Tabela 14.	Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) após a exposição sequencial de neonatas de <i>Rachiplusia nu</i> aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (RanuMNPV).....	73
Tabela 15.	Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual após a exposição sequencial de neonatas de <i>Rachiplusia nu</i> aos entomopatógenos, <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-73), <i>Metarhizium rileyi</i> (CNPSo-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (RanuMNPV).....	73
Tabela 16.	Tipos de interações [negativa (Neg.), positiva (Pos.) e aditividade (Add.)] entre bactéria HD-73 (Cry1Ac), os vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV e RanuMNPV) e o fungo <i>Metarhizium rileyi</i> , determinada através da relação entre a porcentagem de mortalidade observada (Mo) e a mortalidade esperada (Me) de <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Rachiplusia nu</i>	74

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CAPÍTULO 1 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA E PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> EXPOSTAS À HD-73 (Cry1Ac).....	18
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1.2.1 Colônia de insetos e obtenção do patógeno	20
1.2.2 Exposição dos parentais à cepa HD-73.....	20
1.2.3 Exposição das progênes à cepa HD-73.....	21
1.2.4 Quantificação dos componentes imunológicos.....	22
1.2.5 Contagem de hemócitos.....	23
1.2.6 Quantificação da atividade humoral.....	23
1.2.7 Análises estatísticas.....	24
1.3 RESULTADOS.....	24
1.3.1 Parâmetros biológicos parentais.....	24
1.3.2 Parâmetros biológicos das progênes.....	26
1.3.3 Resposta imune parental.....	27
1.3.4 Resposta imune de progênes.....	29
1.4 DISCUSSÃO.....	31
CAPÍTULO 2 - IMPACTO DA BACTÉRIA HD-73 (Cry1Ac) NA ATIVIDADE DE SfMNPV E A PRODUÇÃO DE CORPOS DE OCLUSÃO EM <i>Spodoptera frugiperda</i>.....	34
2.1 INTRODUÇÃO.....	34
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.2.1 Colônia de insetos e obtenção dos entomopatógenos.....	35
2.2.2 Protocolo de infecção.....	36
2.2.3 Infecções combinadas entre HD-73 e VPN.....	36
2.2.4 Teste de virulência de SfMNPV.....	38
2.2.5 Análises estatísticas.....	38
2.3 RESULTADOS.....	38

2.4	DISCUSSÃO.....	42
CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA BACTÉRIA HD-73 E SOJA Bt (Cry1Ac) EM COMBINAÇÃO COM ENTOMOPATÓGENOS DE <i>Spodoptera</i> spp.....		44
3.1	INTRODUÇÃO.....	44
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.2.1	Obtenção de noctuídeos e entomopatógenos.....	46
3.2.2	Características gerais dos bioensaios.....	47
3.2.2.1	Inoculações dos entomopatógenos na fase larval.....	47
3.2.2.2	Condução dos ensaios na fase adulta.....	48
3.2.3	Exposição de <i>Spodoptera</i> spp. aos entomopatógenos.....	48
3.2.3.1	Exposição simultânea de lagartas de <i>Spodoptera</i> spp. a entomopatógenos.....	48
3.2.3.2	Exposição sequencial de lagartas de <i>Spodoptera</i> spp. a entomopatógenos.....	49
3.2.3.3	Tecidos foliares de soja RR e BtRR incorporados na dieta artificial.....	49
3.2.3.4	Folhas “in natura” de soja RR e BtRR.....	50
3.2.4	Análises estatísticas.....	51
3.3	RESULTADOS.....	51
3.3.1	Exposição simultânea de lagartas de <i>Spodoptera</i> spp. a entomopatógenos.....	51
3.3.2	Exposição sequencial de lagartas de <i>Spodoptera</i> spp. a entomopatógenos.....	53
3.3.3	Bioensaios com folhas de soja RR e BtRR.....	57
3.3.4	Efeito das interações.....	60
3.4	DISCUSSÃO.....	61
CAPÍTULO 4 - EFEITO SUBLETAL DE HD-73 (Cry1Ac) NAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE PLUSIIINAE E NA ATIVIDADE DE SEUS ENTOMOPATÓGENOS.....		64
4.1	INTRODUÇÃO.....	64
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.2.1	Obtenção de noctuídeos e entomopatógenos.....	65
4.2.2	Características gerais dos bioensaios.....	66
4.2.2.1	Inoculações dos entomopatógenos na fase larval.....	66
4.2.2.2	Condução dos ensaios na fase adulta.....	67
4.2.3	Exposição de Plusiinae aos entomopatógenos.....	67
4.2.3.1	Exposição simultânea de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos.....	67
4.2.3.2	Exposição sequencial de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos.....	67

4.2.4	Análises estatísticas.....	68
4.3	RESULTADOS.....	69
4.3.1	Exposição simultânea de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos.....	69
4.3.2	Exposição sequencial de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos.....	70
4.3.3	Efeito das interações.....	74
4.4	DISCUSSÃO.....	75
CONCLUSÃO GERAL.....		77
REFERÊNCIAS.....		78

INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das principais commodities no Brasil, ocupando aproximadamente 57% de toda área cultivada com grãos, com estimativa de produção de 95,63 milhões de toneladas em 33,18 milhões de hectares cultivados na safra 2015/2016. Isto é, um acréscimo de aproximadamente 3,4% da área cultivada em relação ao ano agrícola 2014/2015 (CONAB, 2016). Mesmo sendo amplamente cultivada em todo território nacional, diversos são os fatores que afetam o potencial produtivo desta cultura, entre eles, destaca-se a ocorrência de insetos da ordem Lepidoptera, como a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidæ), a lagarta-falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidæ), algumas espécies de *Spodoptera* (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; MOSCARDI et al., 2012) e da subfamília Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidæ) (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013).

O uso de inseticidas ainda é o principal método de controle destas pragas, porém muitas vezes não são eficientemente controladas, devido ao hábito destes insetos e a ocorrência de resistência aos agrotóxicos, além das inadequadas técnicas de aplicação adotadas. Por outro lado, grande número de organismos pode controlar naturalmente estes lepidópteros, como os entomopatógenos *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S.A. Rehner & Humber, *Pandora* sp. e *Zoophthora* sp. (MORAES; LOECK; BELARMINO, 1991; SOSA-GÓMEZ; LASTRA; HUMBER, 2010), sendo a primeira espécie o principal agente causal de doença na maioria dos noctuídeos-praga da soja (IGNOFFO et al., 1976; MARUYA; PINTO; GRAVENA, 2001; SOSA-GÓMEZ et al. 2003) e, com menor frequência, os vírus de poliedrose nuclear (VALICENTE; BARRETO, 1999). Entretanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos tem ocasionado a redução destes agentes benéficos (BUENO et al., 2012).

Com o advento da biotecnologia, foi possível desenvolver mais um método de controle de pragas, através de plantas geneticamente modificadas que conferem resistência aos insetos, como os genótipos que expressam as proteínas inseticidas, Cry e VIP, de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). O uso destas culturas Bt torna-se uma importante ferramenta de estratégia para o manejo integrado de pragas, que além de controlarem diversos lepidópteros, favorecem o aumento da incidência de inimigos naturais, devido a maior especificidade no modo de ação e pela redução no uso de inseticidas de amplo espectro, levando, assim, ao equilíbrio o agroecossistema (BOBROWSKI et al., 2003; ROH et al., 2007).

A utilização de plantas Bt tem sido crescente desde 1996 em diversos países, entre eles Argentina, Canadá, China, Estados Unidos da América e a Índia (JAMES, 2014). No Brasil, as

primeiras culturas Bt, algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e milho (*Zea mays* L.), foram comercializadas em 2005 e 2007, respectivamente. Posteriormente, em 2013, foi liberada a comercialização da soja Bt, que expressa a proteína Cry1Ac, a qual já foi semeada em cerca de 60% do total da área cultivada com esta oleaginosa na safra 2015/16 (informação pessoal)¹. Um dos principais fatores desta rápida expansão é devido o evento controlar efetivamente as pragas-alvo primárias, *A. gemmatilis* e, principalmente, *C. includens* (CTNBio, 2010), e as pragas-alvo secundárias, *Chloridea virescens* (Fabricius, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) e *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae), além da supressão de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1818) (Lepidoptera: Pyralidae), *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) e *H. zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) (MONSANTO, 2015).

No entanto, outros lepidópteros não-alvo também são expostos à proteína Cry1Ac com adoção da soja Bt e podem ser afetados apenas subletalmente ao ingerirem partes destas plantas. Por exemplo, Bernardi et al. (2014), ao fornecerem discos foliares de soja Bt às espécies de *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae), observaram baixa mortalidade de *S. cosmioides* (Walker, 1858) e *S. eridania* (Cramer, 1782), estágio larval prolongado, viabilidade larval reduzida e aumento no tempo médio de geração para *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797). Além destas pragas não-alvo, seus inimigos naturais também poderão sofrer impactos diretamente ou indiretamente nesse agroecossistema. Uma vez que a planta Bt desempenhará um importante papel como fonte primária de alimento, consequentemente, poderia influenciar biologicamente no desenvolvimento da praga e na atividade de seu agente de controle natural (PRICE et al., 1980).

Assim, diferentes tipos de interações poderão ser esperados no controle de pragas com plantas Bt na presença de entomopatógenos, como a interação positiva ou negativa. Logo, as extensas áreas com soja Bt e as condições favoráveis de epizootias ou aplicações inundativas de patógenos, como fungos e vírus, torna-se importante elucidar os possíveis efeitos, primário e secundário, destas plantas Bt, tanto em organismos-alvo, não-alvo e suas principais doenças.

¹ Informação fornecida por Adeney de Freitas Bueno, em 26 de fevereiro de 2016.

1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as interações de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, cepa HD-73 que expressa a proteína Cry1Ac, em diferentes espécies de noctuídeos, *Chrysodeixis includens*, *Rachiplusia nu*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* e *Spodoptera frugiperda*, com os agentes entomopatogênicos, *Metarhizium rileyi* e os vírus de poliedrose nuclear.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos subletais de HD-73 no sistema imunológico (quantificando hemócitos, proteína total e atividade fenoloxidase) de *S. frugiperda*, a fim de investigar se as inoculações com Bt induzem à “memória imunológica” (imune primming).

Avaliar o impacto de HD-73 na virulência e produção de corpos de oclusão do SfMNPV sobre *S. frugiperda*.

Quantificar o nível de mortalidade larval das espécies de noctuídeos expostas a concentrações subletais de HD-73 ou soja Bt (Cry1Ac) isoladamente e em aplicação simultânea ou sequencial com VPN e *M. rileyi*.

Verificar a ocorrência de efeitos negativo (menor mortalidade), positivo (maior mortalidade) ou de aditividade nas diferentes espécies de noctuídeos, após exposição à HD-73 e aos patógenos, VPN e *M. rileyi*.

Avaliar os efeitos das interações entre os entomopatógenos nos parâmetros biológicos das espécies em estudo.

CAPÍTULO 1 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA E PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Spodoptera frugiperda* EXPOSTAS À HD-73 (Cry1Ac)

1.1 INTRODUÇÃO

Naturalmente os insetos são capazes de viverem em diferentes ecossistemas e rapidamente se adaptarem à diversos agentes estressores abióticos e bióticos do ambiente (SCHMIDT; THEOPOLD; BECKAGE, 2008). Nessas circunstâncias, o sistema de defesa imunológico dos insetos é um dos mais importantes mecanismos de adaptação e proteção contra uma gama de organismos prejudiciais, tais como bactérias, fungos e vírus (LAVINE; STRAND, 2002; SMILANICH; DYER; GENTRY, 2009). Os insetos podem apresentar diferentes mecanismos de defesa, por exemplo, as barreiras físicas presentes no tegumento e no intestino, e o sistema imunológico inato que está subdividido em dois tipos de respostas, celular e humoral (SCHMIDT et al., 2010; VILMOS; KURUCZ, 1998). Defesa celular é composta de células especializadas denominadas hemócitos, as quais circulam livremente na hemolinfa e desempenham uma variedade de funções imunológicas, principalmente o reconhecimento e exclusão de patógenos ou corpos estranhos através da fagocitose, como também pela encapsulação, nodulação e melanização (MARMARAS; LAMPROPOULOU, 2009; STRAND, 2008; VILMOS; KURUCZ, 1998). A defesa humoral é caracterizada pela secreção de peptídeos antimicrobianos, intermediários reativos de oxigênio ou nitrogênio e uma complexa cascata enzimática, como a fenoloxidase (PO), que desempenha uma importante função na melanização (LAVINE; STRAND, 2002; STRAND, 2008). Os eventos da defesa humoral são de extrema importância para atacar o organismo invasor, caso este não seja bloqueado pela defesa celular.

Diversos estudos foram publicados elucidando a defesa imunológica inata em diferentes espécies de insetos contra microrganismos (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997; LAVINE; STRAND, 2002; MA et al., 2005; MA et al., 2008; SCHULENBURG et al., 2009), mas ainda são obscuras algumas reações do sistema imune, tais como os componentes que participam da resposta humoral (LAVINE; STRAND, 2002). Além disso, determinados experimentos demonstraram evidências da existência de imunidade adquirida ou “memória imunológica transgeracional - transgenerational immune priming” (TGIP) em invertebrados (KURTZ; ARMITAGE, 2006; MORET; SIVA-JOTHY, 2003; ROH et al., 2007; SCHMID-HEMPEL, 2005; SCHULENBURG et al., 2009; SHIKANO et al., 2015), evento que era relatado como função própria dos vertebrados (GRINDSTAFF; BRODIE; KETTERSON, 2003). TGIP pode ser interpretado como um ajuste plástico da resposta imunológica quando ambas as gerações, parental e progênes,

são submetidas às mesmas condições de estresse, assim os parentais beneficiarão seus descendentes com elevado nível de imunidade para aquele específico agente estressor (MOREAU et al., 2012). Porém, como consequência, existe um custo adaptativo associado com estes investimentos em imunidade quando requeridos (MORET, 2006; MORET; SCHMID-HEMPEL, 2001).

Bacillus thuringiensis Berliner (Bt) é amplamente usado na agricultura, como um produto comercial ou em culturas geneticamente modificadas, sendo uma opção no manejo integrado de pragas (MIP), por apresentar eficiência no controle de pragas-alvo, especificidade no modo de ação e proporcionar uma redução no uso de produtos químicos (BOBROWSKI et al., 2003; ROH et al., 2007). No entanto, por ser um importante agente de controle biológico e usado em larga escala, algumas investigações já comprovaram que certas endotoxinas de Bt afetam negativamente o sistema imunológico inato, como também apresentam capacidade de induzirem TGIP em insetos-praga (CUNHA et al., 2013; GRIZANOVA et al. 2014; RAHMAN et al., 2004; ROTH et al., 2010; SHIKANO et al., 2015). Neste contexto, considerando a recente adoção da soja Bt [*Glycine max* (L.) Merrill] (Cry1Ac), a disponibilidade em larga escala e os níveis de expressão da proteína inseticida, surge um questionamento: as pragas não-alvo podem ser afetadas subletalmente por esta biotecnologia? Por exemplo, nos últimos anos tem sido comum a ocorrência de lagartas que pertencem ao complexo *Spodoptera*, como *S. cosmioides* (Walker, 1858), *S. eridania* (Cramer, 1782) e *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), causando danos à cultura da soja (MOSCARDI et al., 2012; QUINTELA et al., 2007). Mesmo que estas espécies apresentem naturalmente baixa suscetibilidade à Cry1Ac, há relatos de efeitos subletais nos parâmetros biológicos de *S. frugiperda* e baixa mortalidade de *S. cosmioides*, quando alimentadas com folhas de soja Bt (BERNARDI et al., 2014).

Embora existam estudos focados nos efeitos de Bt na resposta imune dos insetos, poucos trabalhos foram conduzidos com lepidópteros que mostram natural tolerância às endotoxinas Bt, tais como *S. frugiperda* à Cry1Ac. Considerando que no Brasil é comum a sucessão de culturas e que existem condições favoráveis para que os insetos-praga apresentem várias gerações durante uma safra agrícola, torna-se importante investigar se a exposição de pragas não-alvo, a baixas concentrações de Cry1Ac, poderia resultar em alterações na imunidade inata e induzir TGIP, como também causar impacto na biologia do inseto.

Em consequência, as hipóteses do presente estudos são: i) as concentrações subletais de HD-73 (Cry1Ac) poderão alterar a resposta imune inata de pragas não-alvo; ii) a imunidade dos descendentes poderá ser adquirida através do desafio parental com HD-73; iii) os efeitos subletais de HD-73 poderão refletir na interação com outros entomopatógenos; e iv) HD-73 afetará subletalmente a praga não-alvo.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi mensurar (i) os componentes da resposta imunológica (número de hemócitos, proteína total, PO e atividade antibacteriana) e (ii) os componentes biológicos em duas gerações de *S. frugiperda*, após exposição às concentrações subletais da cepa HD-73, que expressa a proteína Cry1Ac.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Colônia de insetos e obtenção do patógeno

Uma colônia de *S. frugiperda*, oriunda de Carlisle, PA, EUA, foi estabelecida em 2014 e mantida a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo. As lagartas foram criadas de acordo com o método adaptado de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) e alimentadas com dieta artificial de gérmen de trigo. Em todos os bioensaios se utilizou uma cultura liofilizada esporulada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, estirpe HD-73 produtora da proteína Cry1Ac, cedida pela Dra. Gislayne T. Vilas-Boas (Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil).

1.2.2 Exposição dos parentais à cepa HD-73

Como um método padrão dos ensaios, a cepa HD-73 liofilizada foi pesada e diluída em água destilada autoclavada (H_2O_d autoclavada) e a sua incorporação na dieta foi de acordo com o protocolo sugerido por Morales et al. (1995). As concentrações 15, 33 e $72,6\text{ }\mu\text{g}$ de HD-73 por ml de dieta ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) foram adicionadas quando a temperatura da dieta, sem formaldeído e antibiótico (estreptomicina), alcançou aproximadamente 50°C (Figura 1). Posteriormente, a dieta com patógeno foi misturada com auxílio de uma batedeira elétrica de mão (Black & Decker, 175 W) e, então, vertida em bandeja de 128 células (Bio-serv, Frenchtown, NJ). Após solidificação da dieta, neonatas de *S. frugiperda* foram colocadas individualmente em cada célula, seladas com folhas plásticas autoadesivas, que possibilitam a troca gasosa, e mantidas até o final do terceiro instar. Posteriormente, estas lagartas foram transferidas para copos plásticos de 30 ml (Solo Cup Company, Lake Forest, IL), contendo dieta com às mesmas concentrações iniciais de HD-73 ou livre desse patógeno, nos quais permaneceram individualmente até a emergência dos adultos. H_2O_d autoclavada foi incorporada na mesma proporção que as suspensões de Bt para o tratamento controle ($0\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$). As lagartas de *S. frugiperda* foram alimentadas *ad libitum* com dieta livre ou não do patógeno até a pupação, e mantidas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo.

Os parâmetros biológicos avaliados foram: mortalidade larval diária, peso larval aos cinco e 11 dias após a exposição (DAE) à HD-73, e peso pupal após 72 horas da completa formação (>72 h). Lagartas de quinto instar foram usadas para quantificar hemócitos, proteína total e atividade de fenoloxidase (PO). Como os ensaios foram replicados, primeira e segunda repetição, a quantidade de lagartas por tratamento amostradas para avaliar os parâmetros biológicos e a resposta imunológica foram de 20 e 10 e de 32 e 20, respectivamente.

Cerca de 20 casais, constituídos por indivíduos que alcançaram o estágio adulto com no máximo 48 h de diferença na emergência entre macho e fêmea, foram separados para cada tratamento (0, 15 e 72,6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Cada casal foi acondicionado em copo parafinado de 473 ml (Solo Cup Company, Highland Park, IL, USA) e selado com plástico filme. Os adultos foram alimentados com uma solução de sucrose a 10% e papel preto fixado nas laterais, como substrato para oviposição. Nos três primeiros dias de postura, os ovos foram coletados e quantificados por fêmea de cada tratamento. Além disso, uma massa de ovos ou pelo menos 100 ovos foram separados e armazenados em copos plásticos (30 ml), a fim de obter a porcentagem de lagartas eclodidas no quarto dia após a oviposição. Ovos do dia com maior número de postura por tratamento foram incubados para os ensaios com progênie. Tanto os adultos quanto os ovos foram mantidos a $25\pm 1^\circ\text{C}$, $50\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo.

1.2.3 Exposição das progênie à cepa HD-73

Com o propósito de avaliar se há efeitos transgeracionais na resposta imune e parâmetros biológicos, após prévio imune desafio com HD-73, aproximadamente 128 neonatas oriundas de cada tratamento (0, 15 e 72,6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) foram inoculadas com uma única concentração de HD-73 (40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) ou com H_2O d autoclavada, constituindo-se o controle (0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) (Figura 1). As lagartas foram alimentadas *ad libitum* com estas dietas até a fase de pupação. Em ambas as replicações, primeira e segunda, as variáveis registradas foram mortalidade larval diária, peso larval aos cinco e 11 DAE à HD-73 e o peso pupal (>72 h) em 32 lagartas. A quantidade de hemócitos, proteína total, atividade de PO e antibacteriana foram estimadas em 20 lagartas de quinto instar por tratamento.

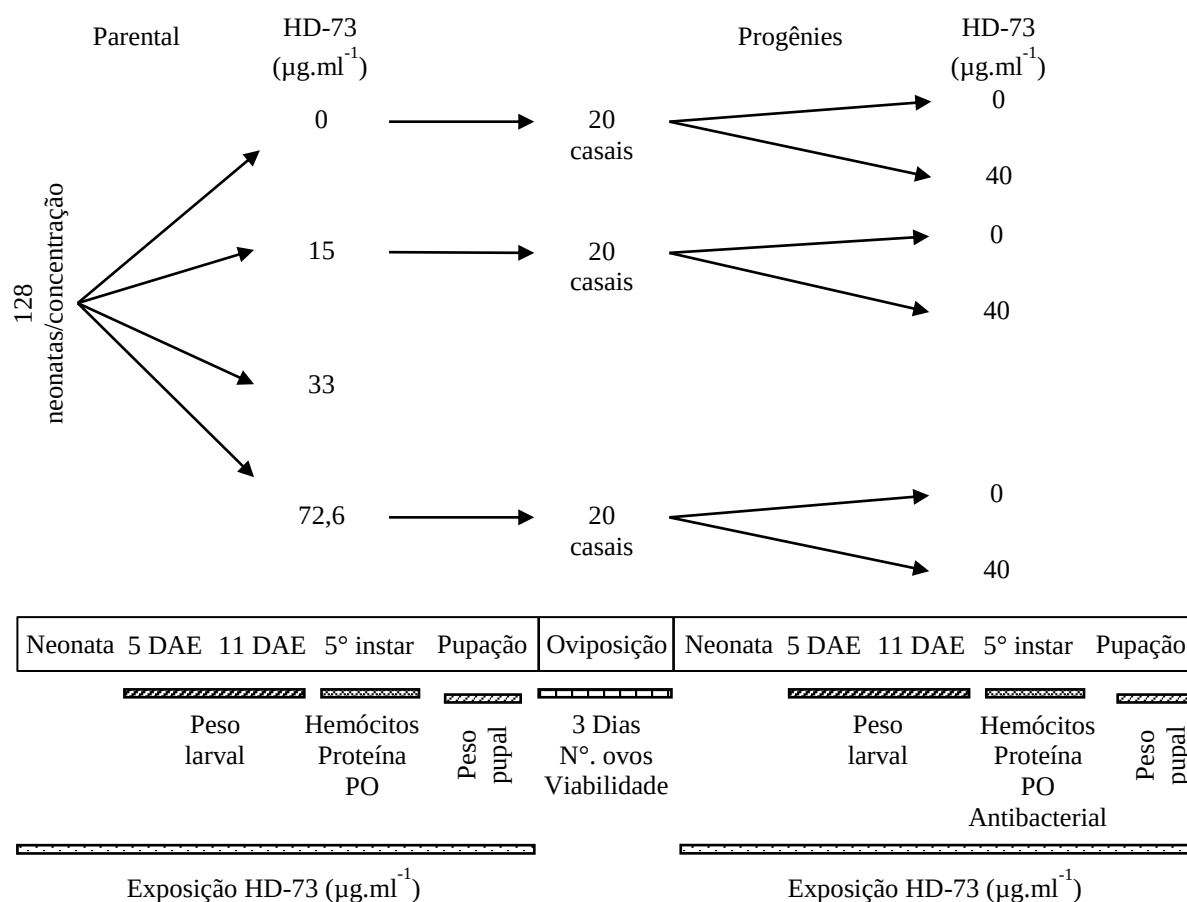


Figura 1. Delineamento experimental dos estudos da resposta imunológica de *Spodoptera frugiperda* à estirpe HD-73 (Cry1Ac), de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Parental: cada 128 neonatas foram expostas às concentrações: 0, 15, 33 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73. Adultos: cerca de 20 casais de cada tratamento (0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73) foram separados para obtenção das progênies. Progênies: cada 128 neonatas foram expostas às concentrações: 0 e 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73. As respectivas épocas e variáveis avaliadas foram: peso larval – 5 e 11 dias após exposição (DAE) ao patógeno; peso pupal (>72 h); extração de hemolinfa no quinto instar para mensuração de hemócitos, análise de proteína total, atividade de fenoloxidase (PO) e antibacteriana; quantificação de ovos/fêmeas e viabilidade dos ovos nos três primeiros dias de postura de cada fêmea.

1.2.4 Quantificação dos componentes imunológicos

Para mensurar os componentes imunológicos da resposta imune celular e humoral, a lagarta foi fixada sobre um pedaço de parafilme (3 cm x 2 cm; Bemis, Neenah, WI) e, com o auxílio de uma agulha fina, perfurou-se a última falsa perna esquerda da lagarta para exsudação de hemolinfa. Através de pipeta, coletou-se a quantidade suficiente de hemolinfa para cada mensuração, sendo 2 μl para contagem de hemócitos, 2 μl para avaliar a atividade antibacteriana (quando avaliada) e 5 μl para quantificar a proteína total e PO.

1.2.5 Contagem de hemócitos

Alíquotas de 2 μ l de hemolinfa foram misturados em 11 μ l de tampão fosfato-salino (PBS, 1x, pH 7,4), transferidos para câmara de Neubauer, e os hemócitos quantificados imediatamente após a extração da hemolinfa em um microscópio óptico, de magnificação 400x.

1.2.6 Quantificação da atividade humoral

Protocolo de Shikano et al. (2010) foi seguido com pequenas modificações para estimar a atividade de PO e proteína total em *S. frugiperda*. Cinco μ l de hemolinfa foram adicionados em 60 μ l de solução PBS gelado e armazenados a -20°C , até obtenção de todas as amostras para mensuração. Na avaliação da atividade de PO, 50 μ l de cada amostra hemolinfa-PBS, juntamente com 150 μ l da solução cloridrato de dopamina (11.3 mM), foram transferidas para placas de cultura de tecido de 96 células (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Absorbância a 492 nm foi lida a cada 45 segundos por 45 min em um espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). O aclave (slope) da absorbância ao longo do tempo (V_{max}) forneceu a atividade de PO para cada amostra.

A proteína total foi mensurada em 5 μ l da amostra hemolinfa-PBS, misturada em 200 μ l de reagente Bradford (Sigma-Aldrich; for 1-1, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ proteína, Saint Louis, MO) e adicionada na placa de cultura (96 células). Diluição em série de albumina de soro bovino, variando de 0 a 2 mg.mL^{-1} , foi adicionada em cada placa para estabelecer uma curva padrão de concentrações conhecida das proteínas para comparação. As placas foram agitadas brevemente dentro do espectrofotômetro, incubadas a 23°C por 15 minutos e, posteriormente, a absorbância foi lida a 595 nm.

Nos ensaios com as progênes, a atividade antibacteriana foi estimada de acordo com a metodologia de Wilson et al. (2002) e modificada para *Trichoplusia ni* (Hübner, [1803]) (Lepidoptera: Noctuidae) (OLSON; SHIKANO; CORY, não publicado). Placas estéreis de 100 mm de diâmetro com meio de cultura foram feitas através da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC n°. 4698, Sigma-Aldrich), diluído em 10 ml da solução, 1% de ágar em tampão de fosfato de potássio (67 mM, pH 6,4) e sulfato de estreptomicina (0,1 mg.mL^{-1}), a 50°C . Subsequentemente, uma mistura de 4 μ l, sendo 2 μ l de hemolinfa e 2 μ l de feniltioureia (PTU) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), para prevenir a coagulação e melanização da hemolinfa, foram pipetados em orifícios de 3 mm de diâmetro dispostos nas placas de *M. lysodeikticus* e

incubados a 33°C por 24 h. Diluições de lisozima de ovos brancos de galinha, variando de 0,062 a 1 mg.ml⁻¹ (Sigma-Aldrich), foram adicionados em cada placa para produzir a curva padrão.

1.2.7 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, replicados e analisados em conjunto. Os dados foram submetidos a uma análise exploratória para verificar se atendem às pressuposições da análise de variância, incluindo distribuição normal (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade de variâncias (BURR; FOSTER, 1972; HARTLEY, 1940). Os dados de peso larval aos 5 DAE (parental) e proteína total (parental e progênes) foram transformados por box-cox, e os de PO (parental e progênes), por log x, por não apresentarem distribuição normal. O teste de comparação múltipla de médias utilizado foi de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os dados que não apresentaram normalidade foram comparados pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$). A mortalidade foi comparada pelo modelo linear generalizado, distribuição binomial, função link logit e comparada através do teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$). Os dados foram analisados pelo pacote científico JMP (Version 11.2.1, SAS Institute Inc, Cary, NC).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Parâmetros biológicos parentais

O peso larval de *S. frugiperda* foi negativamente afetado com o aumento das concentrações de HD-73. Similar, menor peso pupal foi registrado em lagartas expostas à HD-73, mas não houve diferença entre as concentrações do patógeno (Figura 2a). HD-73 proporcionou baixa mortalidade de *S. frugiperda*, variando entre 7,41% a 20,49% (Figura 2b).

A fecundidade das fêmeas foi significativamente afetada quando previamente expostas à HD-73, porém o número total de ovos não diferiu entre as concentrações de Bt, 15 e 72,6 µg.ml⁻¹, com média de 919,42 e 740,50 ovos/fêmea, respectivamente (Figura 3a). O primeiro e segundo dia de postura não diferiram entre os tratamentos, entretanto, no terceiro dia estatisticamente diminuiu o número de ovos depositados pelas fêmeas oriundas de lagartas expostas à Bt, comparado aos indivíduos que foram criados livres do patógeno (Figura 3b). Em geral, a porcentagem de lagartas eclodidas no tratamento controle (57,43%) foi superior aquelas expostas à HD-73, 15 µg.ml⁻¹ (52,07%) e 72,6 µg.ml⁻¹ (48,57%) (Figura 3a).

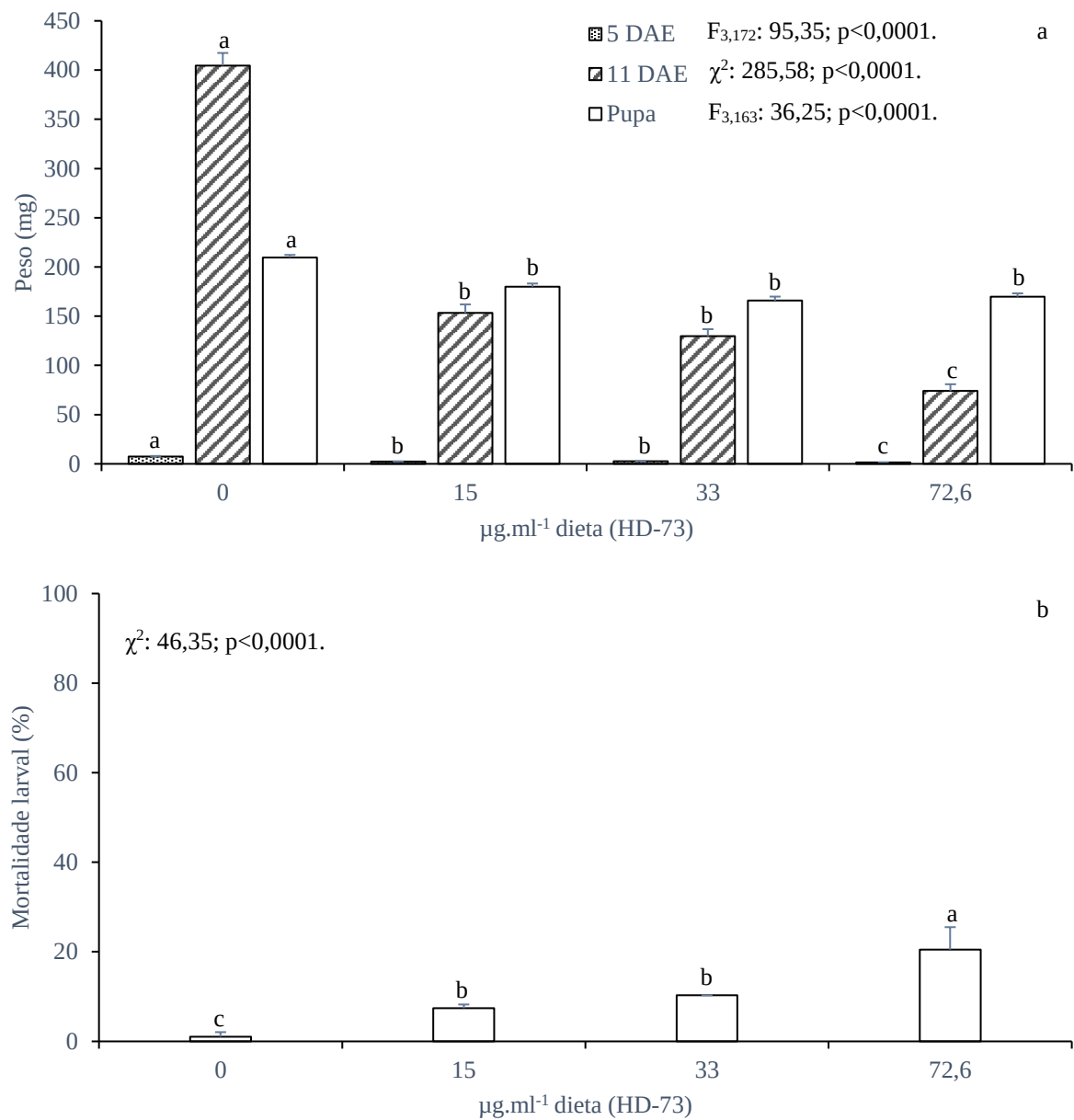


Figura 2. Peso larval, aos 5 e 11 dias após a exposição (DAE) ao patógeno, peso pupal (>72 h) (a); e mortalidade larval (b) ($\pm\text{EP}$), na geração parental de *Spodoptera frugiperda* após exposição às concentrações 0, 15, 33 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta da cepa HD-73 (Cry1Ac). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre os tratamentos dentro de cada variável pelo teste de Qui-quadrado ($p\leq 0,05$) ou Tukey ($p\leq 0,05$).

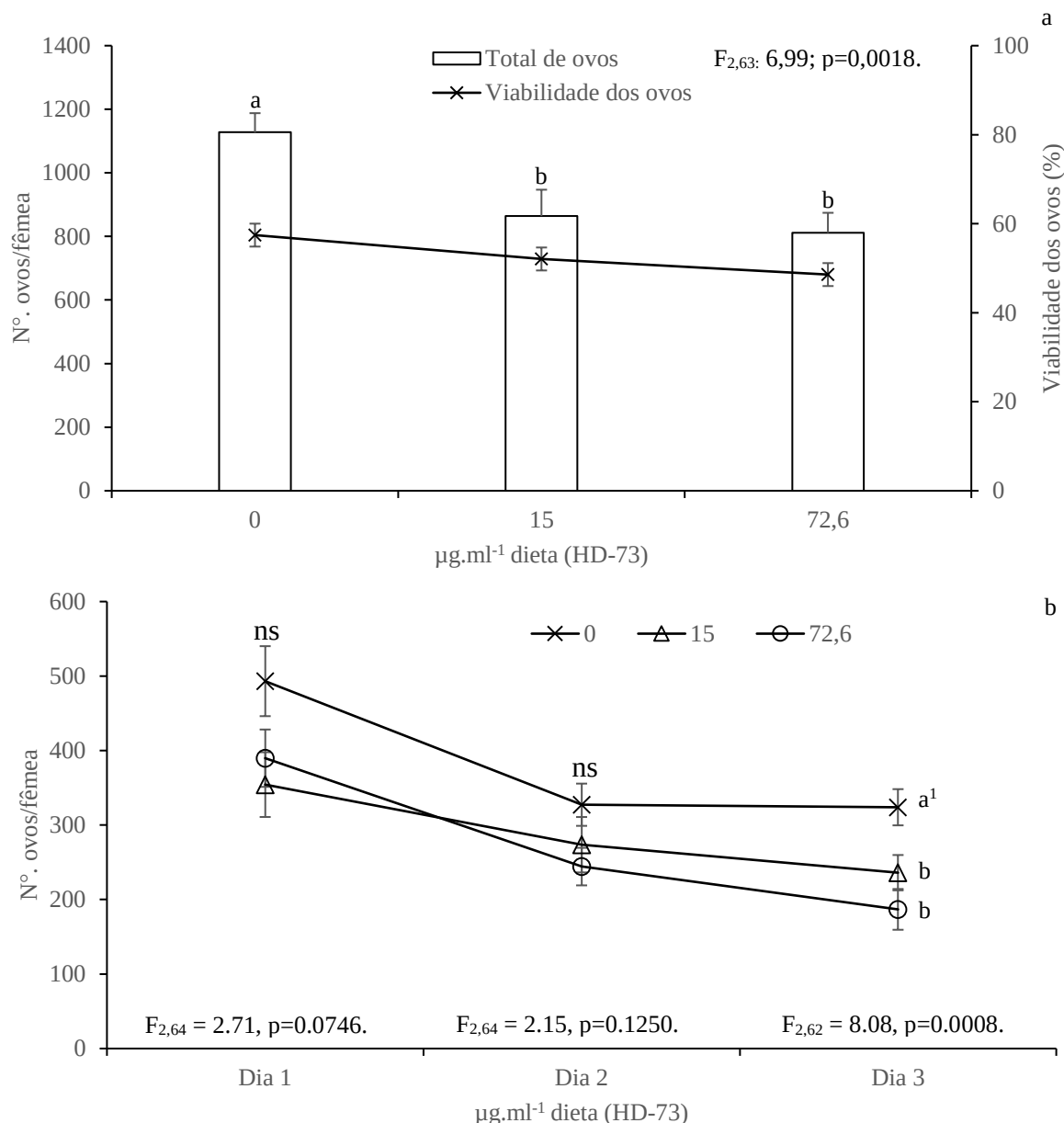


Figura 3. Fecundidade por fêmea e viabilidade dos ovos (a); e o número de ovos por fêmea nos três primeiros dias de postura (b) ($\pm$ EP), após exposição das lagartas de *Spodoptera frugiperda* às concentrações 0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ¹Médias comparadas entre os tratamentos em cada dia de oviposição. ns= não significativo.

1.3.2 Parâmetros biológicos das progênes

Independentemente de o inseto ter sido ou não previamente exposto ao patógeno, demonstra-se não haver indução da TGIP. Tanto o peso larval (11 DAE), quanto o peso pupal e a mortalidade, não diferiram entre as concentrações 0+40, 15+40 e 72,6+40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de HD-73, inoculadas previamente em parentais e, posteriormente, nas progênes, respectivamente. Similarmente ao observado na geração parental, menor peso larval e pupal de *S. frugiperda* foram registrados nos tratamentos com HD-73 (Figura 4a). De fato, HD-73 proporciona baixa mortalidade em *S. frugiperda*, menor que 30% (Figura 4b).

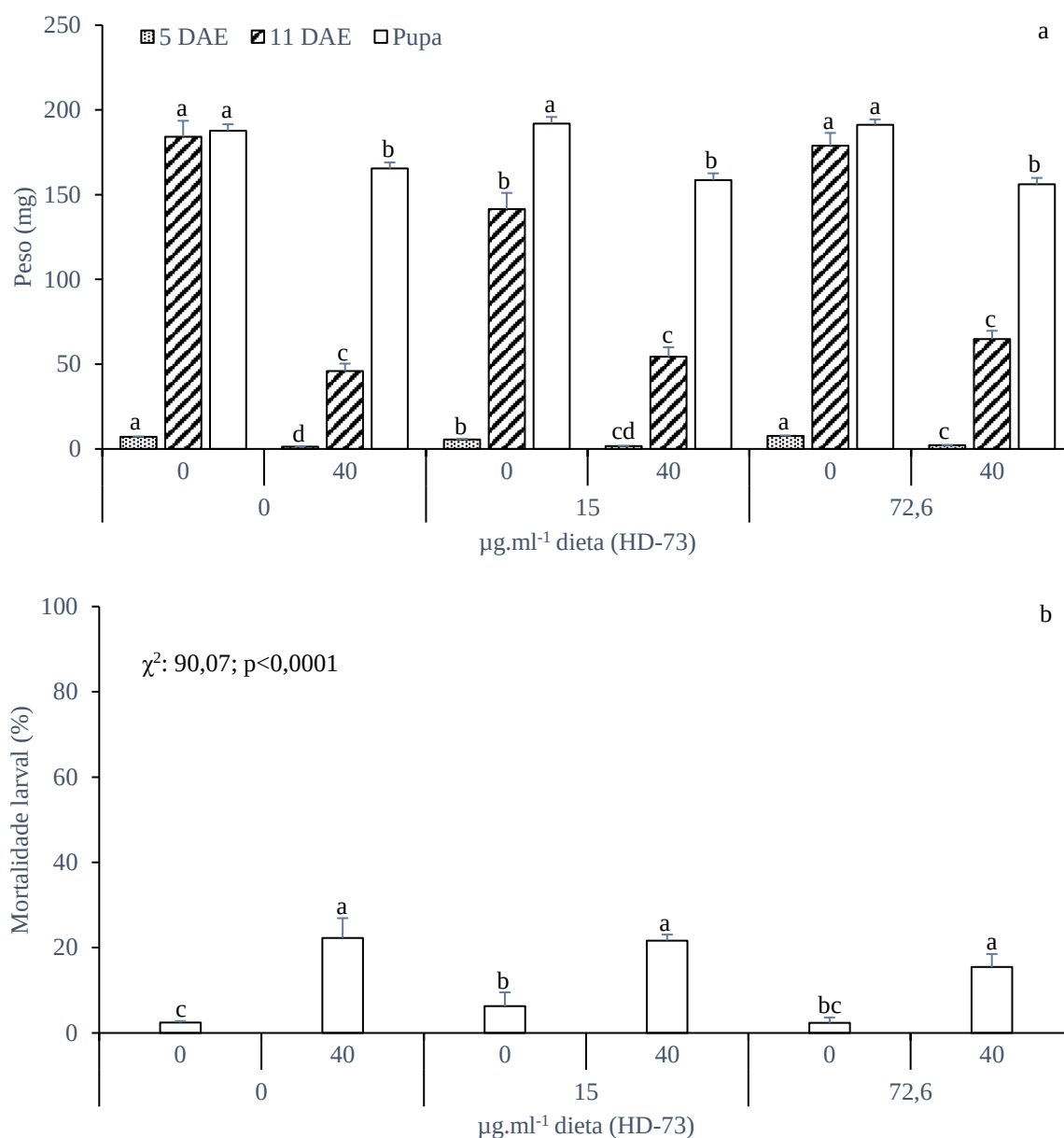


Figura 4. Peso larval, aos 5 e 11 dias após a exposição (DAE) ao patógeno, peso pupal (>72 h) (a); e mortalidade larval (b) ($\pm$ EP) de *Spodoptera frugiperda* após as progêneses serem expostas às concentrações 0 e 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac), e previamente os parentais com 0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre os tratamentos dentro de cada variável pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$) ou Tukey ($p \leq 0,05$). 5 DAE: $\chi^2: 334,79; p < 0,0001$; 11 DAE: $\chi^2: 273,45; p < 0,0001$; Pupa: $F_{3, 371}: 20,88; p < 0,0001$.

1.3.3 Resposta imune parental

A resposta imune em quinto instar de *S. frugiperda* foi pouca expressiva aos desafios com Bt. Somente PO mostrou significativo aumento em sua atividade quando as lagartas foram expostas à concentração 15 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (HD-73), comparado a 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Figura 5c). Diferença significativa não foi observada na densidade de hemócitos e proteína total na hemolinfa (Figura 5a e b).

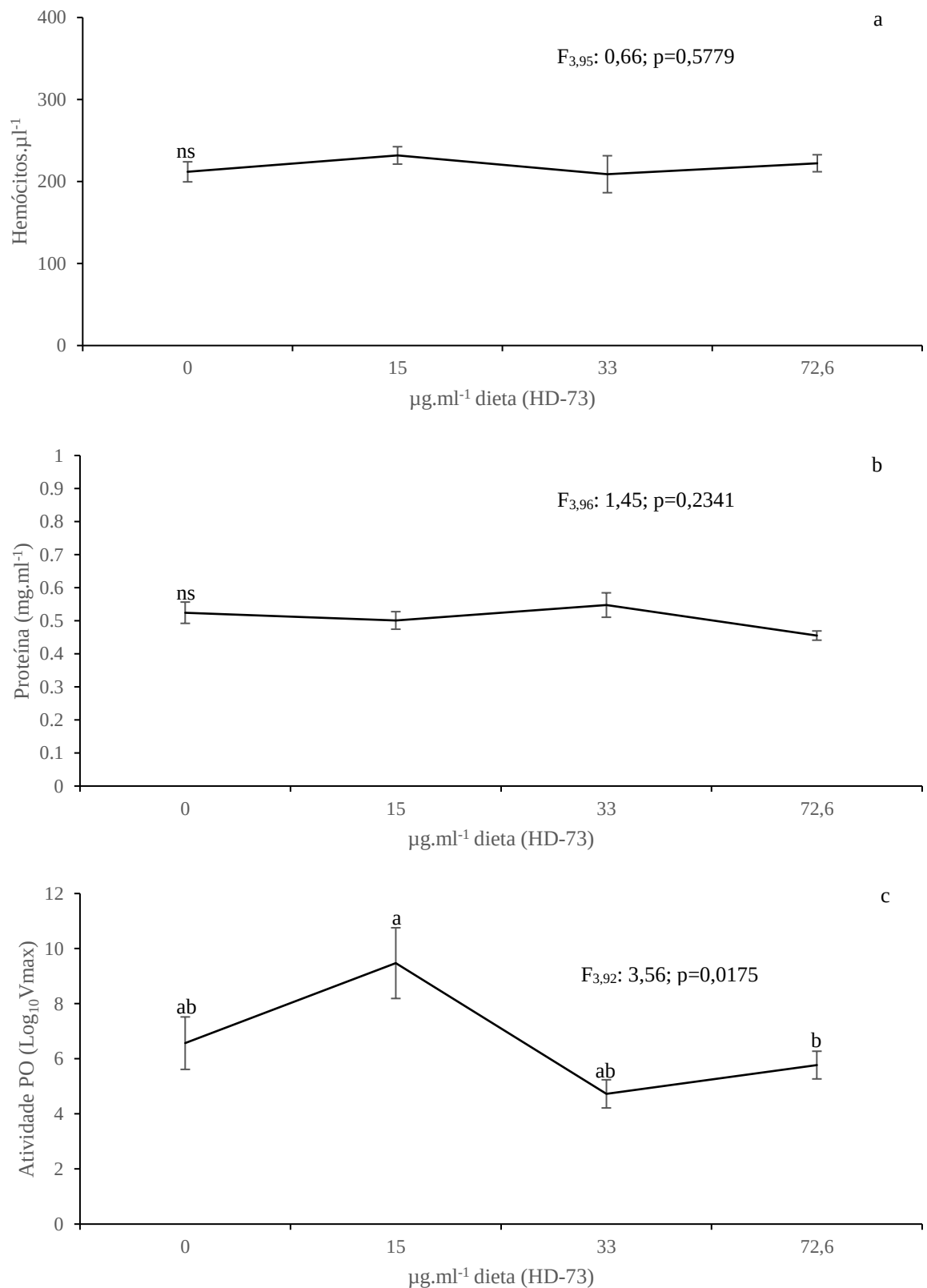


Figura 5. Densidade de hemócitos (a), concentração total de proteína (b) e atividade de fenoloxidase [PO (c)] ($\pm$ EP) quantificados em lagartas de quinto instar de *Spodoptera frugiperda* após exposição às concentrações 0, 15, 33 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre os tratamentos pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). ns= não significativo.

1.3.4 Resposta imune de progênes

A densidade de hemócitos, proteína total, atividade de PO e antibacteriana em progênes de *S. frugiperda* não foram influenciadas pelos desafios com Bt nos parentais. Embora tenha sido observado menor número de hemócitos, para a combinação 15+40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, aumento na proteína total, 72.6+0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, e maior atividade de PO, em 72.6+40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, não houve diferença significativa entre todos estes componentes de imune defesa, comparados aos tratamentos 0+0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ou 0+40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Figura 6a, b e c). A atividade antibacteriana não diferiu entre lagartas provenientes e alimentadas com HD-73 ou livre do patógeno (Figura 6d).

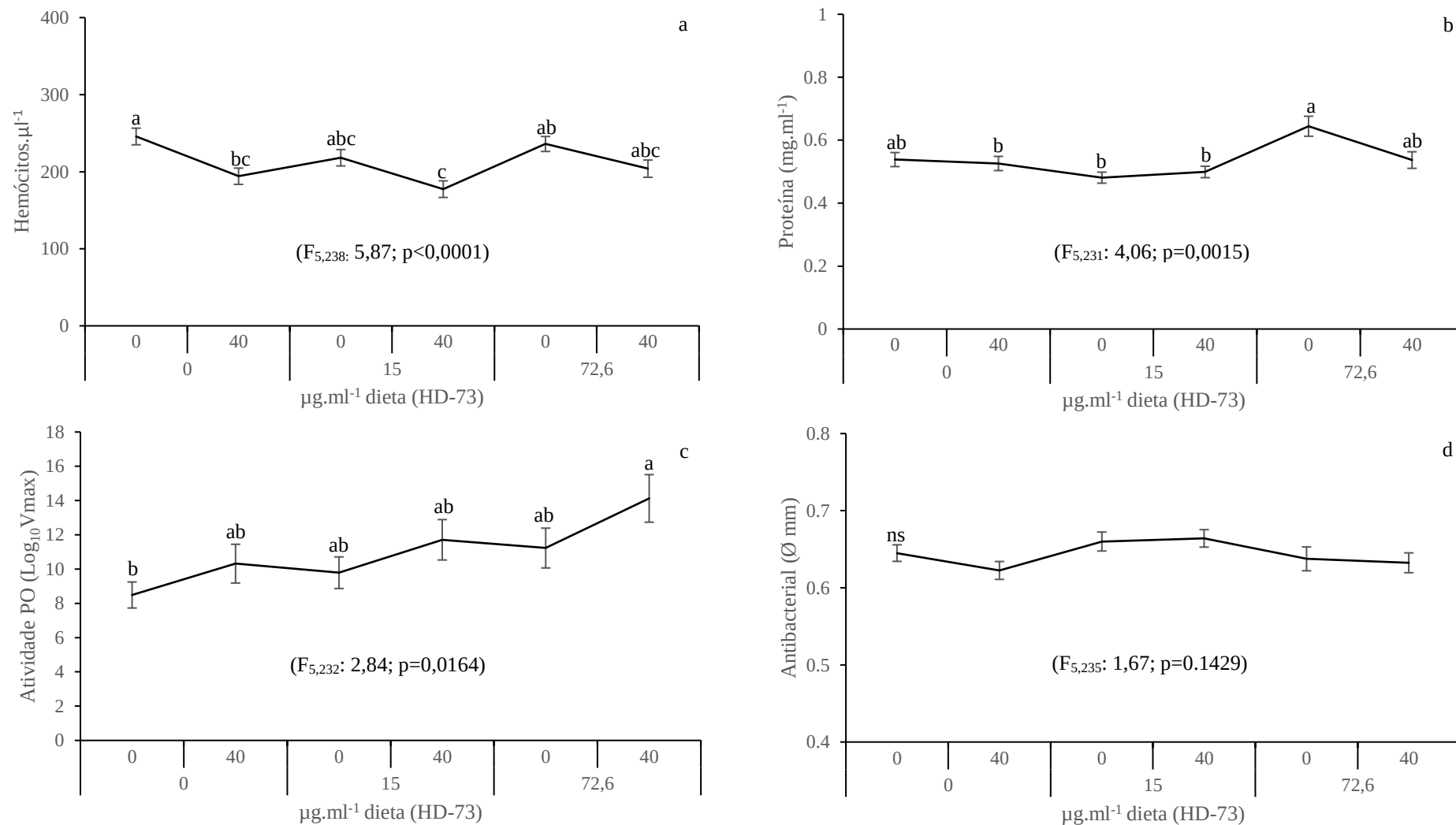


Figura 6. Resposta imune [hemócitos (a), proteína total (b), atividade de fenoloxidase – PO (c) e atividade antibacteriana (d)] ($\pm$ EP) de *Spodoptera frugiperda* após as progênes serem expostas às concentrações 0 e 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac), e previamente os parentais com 0, 15 e 72,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ns= não significativo.

1.4 DISCUSSÃO

Questões sobre tais efeitos de Bt em pragas não-alvo da biotecnologia são importantes, uma vez que os resultados, positivos ou negativos, podem interferir nas interações com um segundo agente de controle biológico, como também refletir nas estratégias para o manejo integrado de pragas.

Neste experimento foi observado que HD-73 proporcionou baixa mortalidade de *S. frugiperda*, tanto nos parentais quanto nas progênies, e que a proporção foi similar entre as duas gerações. Esta tolerância à Cry1Ac é uma característica do gênero *Spodoptera*, previamente relatada na literatura (LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; ADAMCZYK JR.; SUMERFORD, 2001; GREENBERG; LI; LIU, 2010; SILVA et al., 2016; BERNARDI et al., 2014). Porém, em ambas as gerações, HD-73 afetou o peso larval e pupal. Adamczyk et al. (1998) também descreveram efeitos subletais de algodão Bt (Cry1Ac) em *S. frugiperda*, com menor peso larval e prolongamento no tempo para pupação e emergência dos adultos. Por outro lado, Adamczyk e Sumerford (2001) observaram menor peso de lagartas alimentadas com Cry1Ac na geração parental, no entanto as progênies mostraram peso elevado quando comparado àquelas não expostas à Bt. Para os autores, mostra-se imprecisa a suposição que os efeitos subletais de Cry1Ac, em uma única geração, possam causar impactos negativos no custo adaptativo ou vigor da subsequente geração.

A fecundidade por fêmea diminuiu em indivíduos que foram expostos à HD-73, como também os ovos apresentaram viabilidade ligeiramente inferior. Experimentos realizados por Bernardi et al. (2014) mostraram que *S. frugiperda*, alimentadas com folhas de soja Bt (Cry1Ac), tiveram a capacidade de oviposição reduzida em 65%, indicando um declínio no crescimento populacional de até 81%. Isto sugere que, para *S. frugiperda*, a proteína Cry1Ac não causa efeito imediato, tal como alta mortalidade em curto período, como observado em *A. gemmatilis* e *C. includens* (BERNARDI et al., 2012), mas existe um efeito prejudicial ao desenvolvimento da espécie em estudo.

As baixas concentrações de HD-73 parecem afetar mais os parâmetros biológicos do que o sistema imunológico de *S. frugiperda*. Embora na geração parental ocorreu um aumento leve na atividade de PO em lagartas expostas à 15 µg.ml⁻¹, a densidade de hemócitos, proteína total e atividade de PO não foram significativos entre os tratamentos com ou sem Bt. Os resultados obtidos diferem daqueles registrados por Cunha et al. (2013), os quais observaram que o algodão Bt (Cry1Ac) provocou menor número de hemócitos e um aumento na atividade de PO, sendo significativamente igual o total de proteínas entre lagartas de *S. frugiperda*

expostas ao algodão Bt e não Bt. Nos estudos de resposta imunológica com outras espécies de lepidópteros expostas à Bt, Grizanova et al. (2014) observaram que a exposição de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) à Bt, na concentração letal 15 (CL₁₅), as lagartas apresentaram na hemolinfa elevada atividade de PO e lisozima, fagocitose e encapsulação. Por outro lado, quando os autores aplicaram a concentração CL₅₀ houve um aumento na atividade de PO e lisozima na hemolinfa, porém diminuiu o índice de coagulação e a atividade de PO nos hemócitos. A tolerância induzida por endotoxinas de Bt em *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) foi correlacionada com uma elevada resposta imune, como maior atividade de melanização, comparada aos indivíduos suscetíveis (RAHMAN et al., 2004). De fato, a variabilidade na resposta imune é comum interespecífica e intraespecífica nas espécies, uma vez que estas expressões dependem da suscetibilidade do inseto, o tipo e a concentração da endotoxina, além de considerar os efeitos abiótico e biótico.

Concentrações subletais de HD-73 empregadas neste estudo não foram suficientes para provocar imunidade adquirida ou TGIP, ou seja, não ocorreram mudanças expressivas nas respostas celular e humoral em progênies de *S. frugiperda*, após a exposição de parentais à Bt. Porém, se adquirida a imunidade, isto implicaria em resistência das progênies aos entomopatógenos e, conseqüentemente, poderia reduzir a eficiência do controle biológico. Por exemplo, em estudos com espécies suscetíveis à Bt, Shikano et al. (2015) observaram que as lagartas descendentes de *T. ni*, oriundas de parentais desafiados com Dipel 2x DF, tiveram maior atividade antibacteriana e um aumento na resistência de quase 1,5x a este agente microbiano, comparadas as progênies dos parentais que não foram expostos à Bt.

TGIP é um ajuste plástico da imunidade das progênies como resultado da imunidade parental. Normalmente, exige-se um custo para o parental transferir a imunidade e, como consequência, nem todos os descendentes serão beneficiados com a proteção imune (ZANCHI, 2012). Em nossos testes, coletou-se lagartas do dia com maior massa de ovos, presumivelmente isto poderia ter interferido nas observações de TGIP, assim existindo a possibilidade de usar lagartas sem imunidade adquirida da mãe. Em contraste, estes fatos também podem estar correlacionados com os receptores da proteína Cry1Ac no intestino médio de *S. frugiperda*, os quais são compostos por dois mecanismos de ação. A primeira fase é reversível, em que envolve específicas ligações entre proteína e o receptor na membrana do intestino médio, e posteriormente, na segunda fase, ocorre o efeito irreversível, quando a proteína penetra na membrana celular e causa a ruptura, formando poros (VAN RIE et al., 1990; SCHNEPF et al., 1998). De acordo com Pinheiro (2013), nos estudos com interações entre proteínas de Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac), na membrana apical do intestino médio em *S. frugiperda* existem ligações

não específicas entre a proteína Cry e a membrana do intestino médio, e possivelmente, a ligação é fraca na primeira fase. Assim, a proteína é desligada e bloqueada no receptor, evitando a sua entrada na membrana para causar atividade tóxica.

Por esta razão, Cry1Ac parece ser uma fraca ameaça para *S. frugiperda*, quando as lagartas ingerem baixas concentrações da proteína, não sendo necessário ativar grandes quantidades da cascata de pro-fenoloxidasas e peptídeos antimicrobianos, os quais são uns dos principais efetores de TGIP (MORET; SCHMID-HEMPEL, 2001; MORET, 2006; TRAUER; HILKER, 2013) para combater os patógenos. Além disso, é importante enfatizar que existe variabilidade genética intraespecífica e diferentes níveis de tolerância à Cry1Ac em *S. frugiperda* (PINHEIRO, 2013), sendo que esta especificidade poderia refletir na resposta imune inata e nos efeitos transgeracionais.

Em conclusão, HD-73 causa baixa mortalidade e impacto negativo nos parâmetros biológicos, como menor peso larval e pupal, redução na fecundidade e viabilidade dos ovos. Relato que é totalmente útil para dar suporte ao MIP em áreas cultivadas com culturas Bt. Não existem evidências de HD-73 provocar mudanças imunológicas na geração parental e efeitos transgeracionais às progênes, pressupondo que os efeitos negativos de Cry1Ac na interação com entomopatógenos podem estar envolvendo diferentes mecanismos de ação e reação do hospedeiro ou até mesmo de compostos liberados pelos patógenos. Trabalhos adicionais deveriam incluir experimentos em condições de campo, como também em laboratório, com folhas de soja Bt em diferentes gerações de *Spodoptera*, para elucidar as interações entre todo o sistema, planta-inseto-patógeno.

CAPÍTULO 2 - IMPACTO DA BACTÉRIA HD-73 (Cry1Ac) NA ATIVIDADE DE SfMNPV E NA PRODUÇÃO DE CORPOS DE OCLUSÃO EM *Spodoptera frugiperda*

2.1 INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das mais importantes pragas na cultura do milho, *Zea mays* L. (CAPINERA, 1999; WISEMAN et al., 1996), podendo também atacar outras espécies de plantas cultivadas, como o algodão (SANTOS, 2011), arroz (MARTINS et al., 2000), soja (MOSCARDI et al., 2012), trigo (SALVADORI, 2000) e sorgo (CORTEZ; WAQUIL, 1997). Esta espécie é multivoltina, apresentando várias gerações durante um ano agrícola, e altamente voraz, podendo causar potenciais danos econômicos às culturas (BARROS et al., 2010; CRUZ; TURPIN, 1982; WISEMAN, 1999).

O principal método para controle desta praga é através da aplicação de inseticidas (VIANA; COSTA, 1998), que nem sempre é bem-sucedida, devido a vários fatores, tais como o hábito e os diferentes níveis de resistência aos agrotóxicos, além das inadequadas técnicas de aplicação adotadas. Em contraste, amplo número de organismos age como inimigos naturais, na forma de predadores, parasitoides ou patógenos (VALICENTE, 1989; VALICENTE; BARRETO, 1999). Dentre os agentes microbianos, destacam-se os vírus de poliedrose nuclear (VPN), os quais normalmente apresentam alta especificidade ao hospedeiro (SOSA-GÓMEZ et al., 2008). Mesmo ocorrendo naturalmente em baixa proporção no ambiente, estes vírus têm alto potencial para serem aplicados artificialmente no controle biológico de lepidópteros-praga (VALICENTE; CRUZ, 1991; VALICENTE; TUELHER, 2009; VÁSQUEZ; ZEDDAM; TRESIERRA, 2002).

Outra alternativa contra *S. frugiperda* é a adoção de plantas geneticamente modificadas, as quais tem como característica a resistência a insetos-praga através da expressão das proteínas inseticidas Cry ou VIP, de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). Contudo, diferentes tipos de proteínas, isoladamente ou em combinação, podem ser expressas em culturas Bt e não serem eficazes contra *Spodoptera* spp., como o caso da soja Bt, recentemente liberado no mercado brasileiro (ano 2013), que expressa Cry1Ac (BERNARDI et al., 2014). Como a soja é a principal cultura do Brasil e por ser um método eficiente no controle dos principais lepidópteros-praga, em 2015 a soja Bt já ocupava cerca de 20% da área total cultivada (6,3 milhões de hectares,) com a oleaginosa (GALVÃO, 2015). Em consequência, as extensas áreas com soja Bt e a ampla disponibilidade da proteína Cry1Ac poderão ter implicações nas interações com agentes de controle de pragas não-alvo da tecnologia, como *S. frugiperda* e seu baculovírus.

Na literatura encontram-se estudos que consideram a interação entre Bt e vírus em diferentes lepidópteros-praga (HATEM; AMER; VARGAS-OSUNA, 2012; KALANTARI et al., 2013; LIU et al., 2006; MARZBAN et al., 2009; POLANCZYK; ALVES, 2005), como tentativa de se potencializar a ação desses agentes microbianos no controle biológico, porém poucos elucidaram os efeitos de Bt em pragas não-alvo e na infectividade dos entomopatógenos (HESKETH; HAILS, 2015). Dados que podem ser importantes para o controle de pragas, uma vez que a produção de inóculo das lagartas mortas pelo vírus e expostas à Bt, pode ser comprometida, assim como sua virulência nas subsequentes infecções, interferindo com a transmissão horizontal.

Assim, considerando a sucessão de culturas, prolongado período de cultivo da soja e o potencial reprodutivo de *S. frugiperda*, torna-se importante investigar quais seriam as possíveis consequências da infecção por Cry1Ac na atividade dos vírus. Neste contexto, levantam-se as seguintes hipóteses: i) a interação entre HD-73 (Cry1Ac) e vírus proporcionará maior mortalidade de *S. frugiperda*; ii) a exposição de *S. frugiperda* às concentrações subletais de HD-73 afetará o rendimento e a virulência do vírus; e iii) HD-73 causará impacto na infecção secundária do vírus. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis impactos de HD-73, que expressa Cry1Ac, na infectividade do vírus, SfMNPV, em *S. frugiperda*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Colônia de insetos e obtenção dos entomopatógenos

Uma colônia de *S. frugiperda*, oriunda de Carlisle, PA, EUA, foi estabelecida em 2014 e mantida a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo. As lagartas foram criadas de acordo com o método adaptado de Hoffmann-Campo; Oliveria e Moscardi (1985) e alimentadas com uma dieta artificial baseada em gérmen de trigo. Em todos os bioensaios se utilizou uma cultura liofilizada esporulada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, estirpe HD-73 produtora da proteína Cry1Ac, produzida e fornecida pela Dra. Gislayne T. Vilas-Boas (Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil).

O vírus de poliedrose nuclear de *S. frugiperda* (SfMNPV) encontra-se disponível na coleção de entomopatógenos da Embrapa Soja (Londrina, PR). O SfMNPV foi multiplicado em lagartas de terceiro instar, da referida colônia, e os indivíduos mortos pelo patógeno foram coletados e armazenados em tubos de microcentrifuga (2 ml) a -20°C . Uma porção do cadáver com SfMNPV foi diluída em água destilada autoclavada (H_2O_d autoclavada) e filtrada através de um algodão hidrófilo para remover quaisquer detritos, como também manter a integridade

do vírus. A concentração de corpos de oclusão (CO) foi estimada com o auxílio de um hemocitômetro (Hausser Scientific) e microscópio óptico com magnificação 400x.

2.2.2 Protocolo de infecção

A bactéria HD-73 liofilizada foi pesada e diluída em H₂O autoclavada e a sua incorporação na dieta foi de acordo com o protocolo sugerido por Morales et al. (1995). Uma concentração específica do patógeno foi adicionada quando a temperatura da dieta, sem formaldeído e antibiótico, atingiu aproximadamente 50°C. Posteriormente, a dieta com patógeno foi misturada com auxílio de uma batedeira elétrica de mão (Black & Decker, 175 W) e então, vertida em bandeja de 128 células (Bio-serv, Frenchtown, NJ). Após solidificação da dieta, lagartas neonatas foram colocadas em par em cada célula, seladas com folhas plásticas autoadesivas, que possibilitam a troca gasosa, e mantidas até o final do terceiro instar.

Lagartas de final de terceiro instar, isto é, após ter cessado a alimentação antes da ecdise, localizadas na parte superior do recipiente e cor mais clara, foram transferidas para placas de cultura de tecido de 48 células (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). As mesmas foram mantidas em jejum por 16 h, a fim de eliminar a dieta com patógeno do intestino, previamente consumida. Lagartas no início do quarto instar foram realocadas para novas placas de 48 células, contendo pedaço de dieta (2mm x 4mm) inoculada com as específicas concentrações de SfMNPV. Neste caso, 1µl da suspensão desejada de vírus foi adicionada sobre cada pedaço de dieta, sem antibiótico. Após 24 h da inoculação, os indivíduos que consumiram toda a dieta foram transferidos individualmente para copos plásticos de 30 ml (Solo Cup Company, Lake Forest, IL) com dieta livre de patógenos, permanecendo até a pupação. As lagartas de *S. frugiperda* foram alimentadas *ad libitum* com dieta e mantidas a 25±1°C, 50±10% UR e 14 h (L:E) de fotoperíodo. H₂O autoclavada foi incorporada na mesma proporção que as suspensões dos patógenos para o tratamento controle.

2.2.3 Infecções combinadas entre HD-73 e VPN

Duzentas neonatas foram expostas a cada concentração, 0, 10, 40 e 80 µg de HD-73 por ml de dieta (µg.ml⁻¹) e mantidas até o final do terceiro instar. Cerca de 48 lagartas de quarto instar de cada tratamento foram infectadas com 0, 10³ ou 10⁴ CO.lagarta⁻¹ (Figura 7). No quarto dia após exposição (DAE) ao SfMNPV, o peso de 20 lagartas.tratamento⁻¹ foi registrado e a mortalidade avaliada até a pupação. Indivíduos com sintomas característicos da doença,

causado pelo vírus, foram separados, colocados em tubos de microcentrífuga (1,5 ml) e, após 24 h, avaliados pela mortalidade. Lagartas mortas foram coletadas e armazenadas a -20°C .

O rendimento de corpos de oclusão por cadáver foi quantificado em oito indivíduos por tratamento. Inicialmente, H_2O autoclavada foi adicionada até completar 1 ml em cada tubo de microcentrífuga contendo o cadáver. Na sequência, estes foram agitados no Vortex (Phoenix tubes shaker, Model AP 56) e uma porção da suspensão foi diluída na proporção de 1:100 ($10\ \mu\text{l} : 990\ \mu\text{l}$). A concentração foi estimada através da contagem de CO em cinco quadrantes, do quadrado central, da câmara de Neubauer, através de um microscópio óptico, magnificação 400x. Quatro contagens separadas foram realizadas por cada cadáver e calculada a média. Como os bioensaios foram replicados, na segunda repetição houve um acréscimo no número de lagartas.tratamento⁻¹, ao invés de 200 neonatas.concentração⁻¹ de HD-73, 48 lagartas.concentração⁻¹ do SfMNPV, e oito cadáveres (CO contagem), foram usadas 300, 60 e 10, respectivamente.

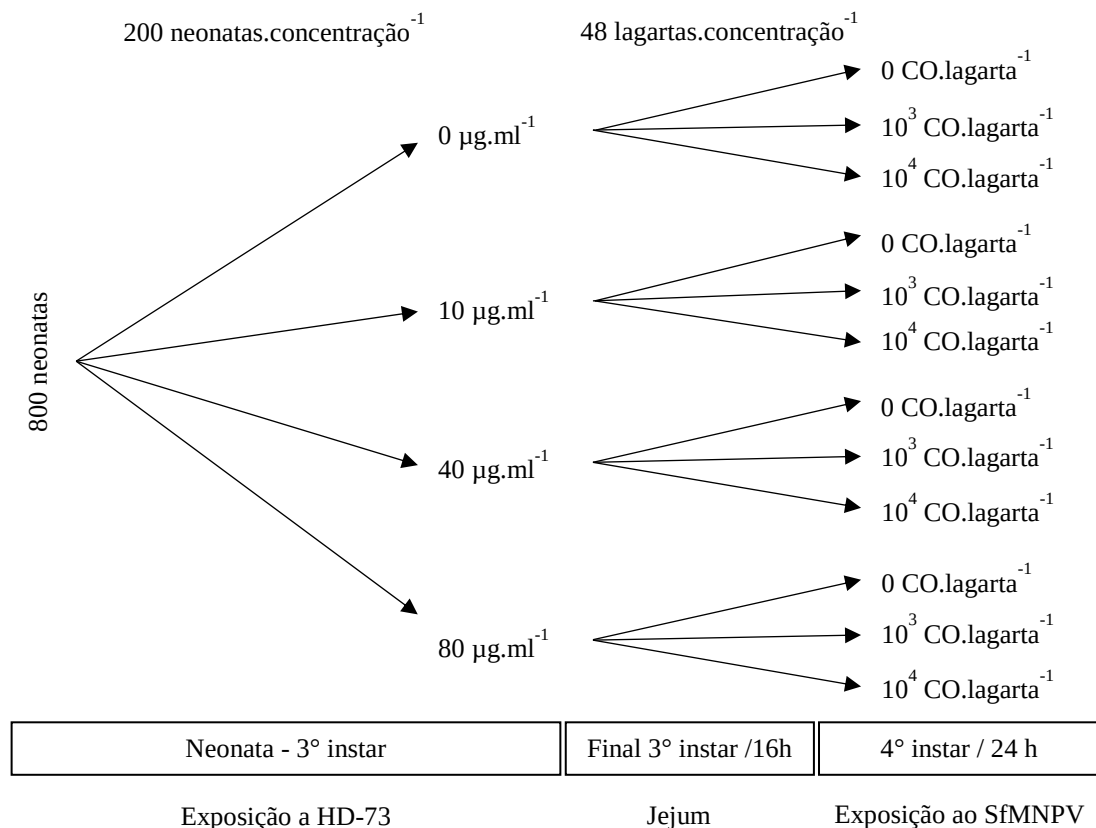


Figura 7. Delineamento experimental das infecções combinadas entre a estirpe HD-73 (Cry1Ac) e o vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), com diferentes tempos de exposição a cada patógeno e ao longo do desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda*. Exposição à HD-73: cerca de 200 neonatas foram expostas a 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 e mantidas até o final do terceiro instar. Jejum: no final do terceiro instar, as lagartas permaneceram em jejum por aproximadamente 16 h. Exposição ao SfMNPV: cerca de 48 lagartas no início do quarto instar foram infectadas com 0, 10^3 e 10^4 corpos de oclusão (CO).lagarta⁻¹.

2.2.4 Teste de virulência de SfMNPV

Com o propósito de verificar se as concentrações subletais de HD-73 (Cry1Ac) ingeridas pelas lagartas afetariam a virulência do SfMNPV, 10 cadáveres provenientes de cada infecção combinada, $0+10^4$, $10+10^4$, $40+10^4$ e $80+10^4$, HD-73 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ + CO.lagarta $^{-1}$, respectivamente, foram separados em dois grupos de cinco. A quantidade de 20 μl foi coletada de cada cadáver, totalizando 100 μl , e diluídos em 900 μl de H₂O autoclavada. Corpos de oclusão foram quantificados e preparada uma diluição serial, 50, 500, 5.000 e 50.000 CO.lagarta $^{-1}$. Um total de 48 lagartas de quarto instar foram inoculadas com cada concentração do SfMNPV, via dieta, como mencionado previamente no protocolo de infecção por vírus. A mortalidade foi avaliada diariamente após a exposição ao SfMNPV até a completa formação da pupa. As lagartas foram mantidas a $25\pm 1^\circ\text{C}$, $50\pm 10\%$ UR e 14 h (L:E) de fotoperíodo.

2.2.5 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, replicados e analisados em conjunto. Os dados foram submetidos a uma análise exploratória para verificar se atendem as pressuposições da análise de variância, incluindo distribuição normal (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade de variâncias (BURR; FOSTER, 1972; HARTLEY, 1940). Os dados de números de corpos de oclusão foram transformados com $\log(x)$, por não apresentarem distribuição normal. O teste de comparação múltipla de médias utilizado foi de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p\leq 0,05$). Os dados que não apresentaram normalidade foram analisados pelo modelo linear generalizado, distribuição normal e função link identity, e comparados pelo teste de Qui-quadrado ($p\leq 0,05$). A mortalidade e a concentração letal 50 (CL₅₀) foram avaliadas pelo modelo linear generalizado, distribuição binomial, função link logit e comparadas através do teste de Qui-quadrado ($p\leq 0,05$). Os dados foram analisados pelo pacote científico JMP (Version 11.2.1, SAS Institute Inc, Cary, NC).

2.3 RESULTADOS

O peso larval foi significativamente afetado com o aumento da concentração de HD-73. Similarmente, observou-se para os tratamentos com inoculações isoladas do vírus, $0+10^3$ e $0+10^4$ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ + CO.lagarta $^{-1}$, respectivamente. Porém, neste caso, os efeitos negativos foram inferiores daqueles em que as lagartas ficaram expostas a ambos os patógenos, HD-73 e SfMNPV. As infecções sequenciais de HD-73 e baculovírus em lagartas de *S. frugiperda*, que

proporcionaram menor peso larval, foram as combinações $40+10^3$ e $40+10^4$ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ + CO.lagarta^{-1} , respectivamente (Figura 8).

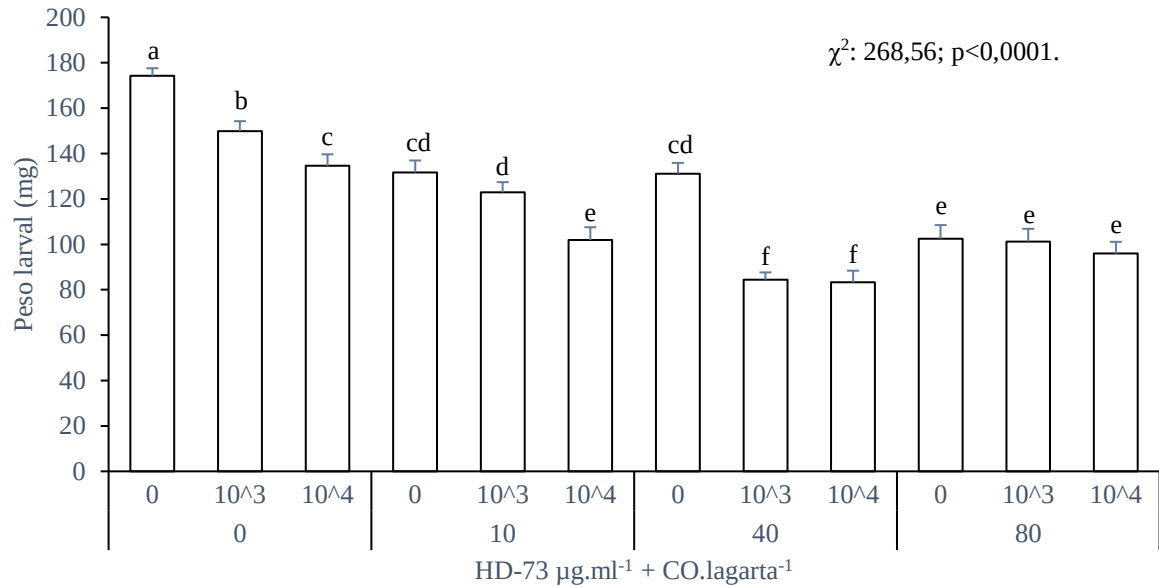


Figura 8. Peso larval ($\pm$ EP) de *Spodoptera frugiperda* aos quatro dias após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 0, 10^3 e 10^4 corpos de oclusão (CO).lagarta $^{-1}$, em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dieta de HD-73 (Cry1Ac). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

A mortalidade causada pela concentração 10^4 CO.lagarta $^{-1}$ do SfMNPV em *S. frugiperda* foi significativamente superior quando observado com 10^3 CO.lagarta $^{-1}$, porém não diferiu entre as lagartas expostas ou não à Bt. A combinação, entre HD-73+VPN, $10+10^3$ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ +CO.lagarta $^{-1}$ proporcionou menor mortalidade comparada às inoculações com $40+10^3$ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ +CO.lagarta $^{-1}$ e $0+10^3$ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ +CO.lagarta $^{-1}$, mas não diferiu de $80+10^3$ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ +CO.lagarta $^{-1}$, respectivamente (Figura 9). Diferença estatística não foi observada para o tempo médio de mortalidade causada pelo vírus entre os tratamentos com ou livre de HD-73 (Figura 10).

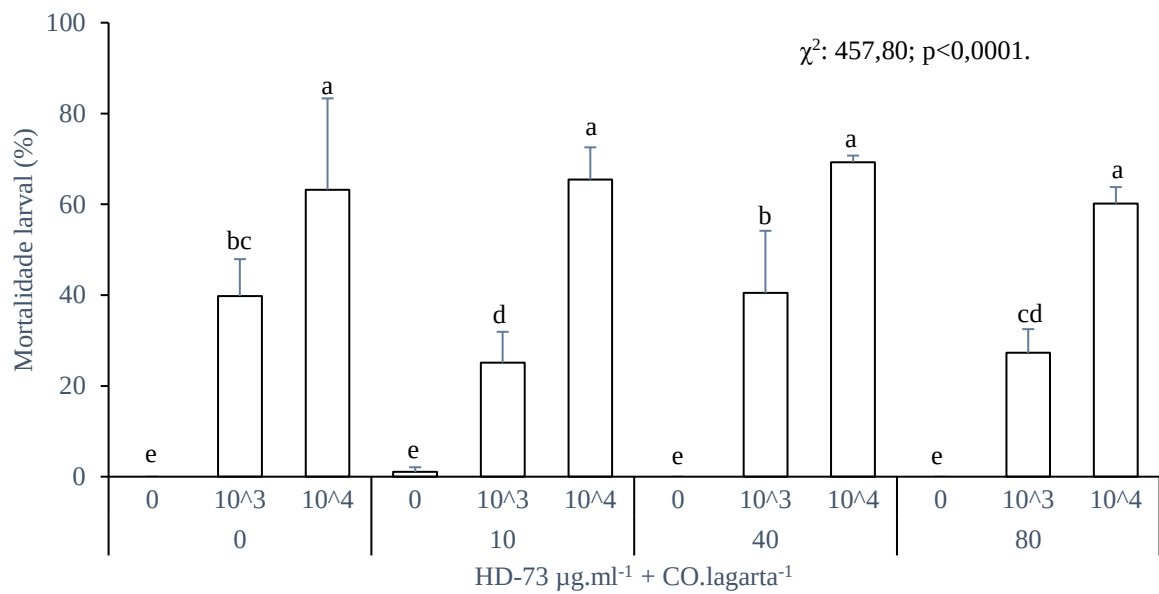


Figura 9. Mortalidade larval (%) ($\pm$ EP) de *Spodoptera frugiperda* após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 0, 10³ e 10⁴ corpos de oclusão (CO).lagarta⁻¹, em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 µg.ml⁻¹ de HD-73 (Cry1Ac). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

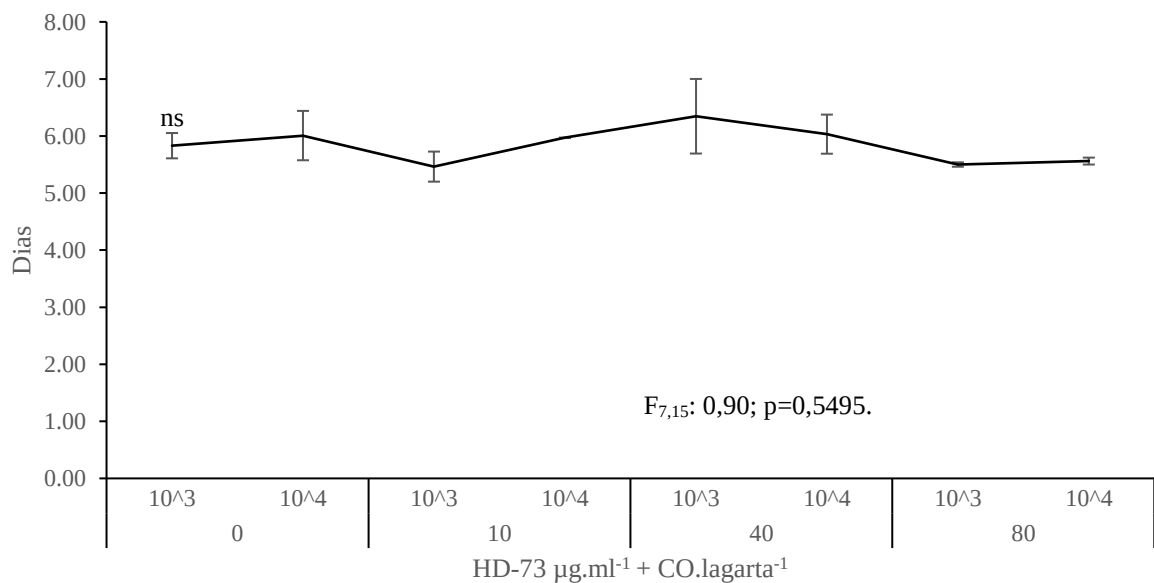


Figura 10. Tempo médio (dias) ($\pm$ EP) para mortalidade de *Spodoptera frugiperda* após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 10³ e 10⁴ corpos de oclusão (CO).lagarta⁻¹, em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 µg.ml⁻¹ de HD-73 (Cry1Ac). ns= não significativo.

Por outro lado, a infecção inicial de *S. frugiperda* com 40 e 80 µg.ml⁻¹ de HD-73 significativamente afetou o número de corpos de oclusão por cadáver, em ambas as concentrações do SfMNPV, 10³ e 10⁴ CO.lagarta⁻¹ (Figura 11).

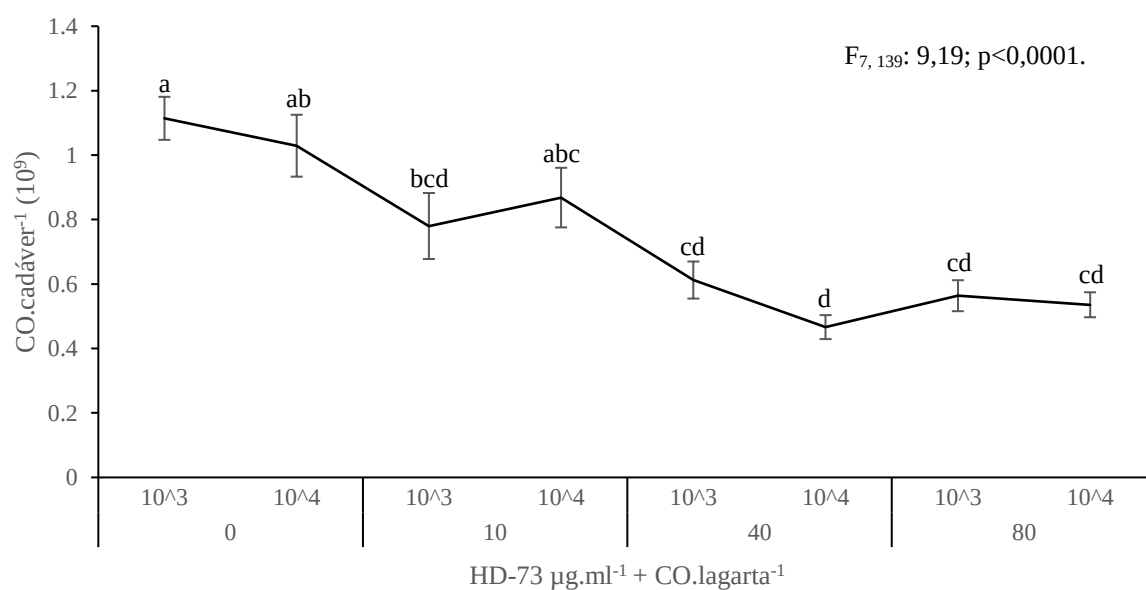


Figura 11. Rendimento de corpos de oclusão (CO) por cadáver de *Spodoptera frugiperda* após infecção com vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), nas concentrações 10^3 e 10^4 CO.lagarta⁻¹, em lagartas previamente expostas às concentrações subletais 0, 10, 40 e 80 µg.ml⁻¹ de HD-73 (Cry1Ac). Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A concentração letal (CL_{50}) do SfMNPV em lagartas expostas a 10 µg.ml⁻¹ de HD-73 foi 1,9 e 2,35 vezes significativamente superior aos vírus que, reproduziram-se em indivíduos inoculados com 40 µg.ml⁻¹ e 0 µg.ml⁻¹, respectivamente, porém não diferiu da infecção com 80 µg.ml⁻¹ (Figura 12).

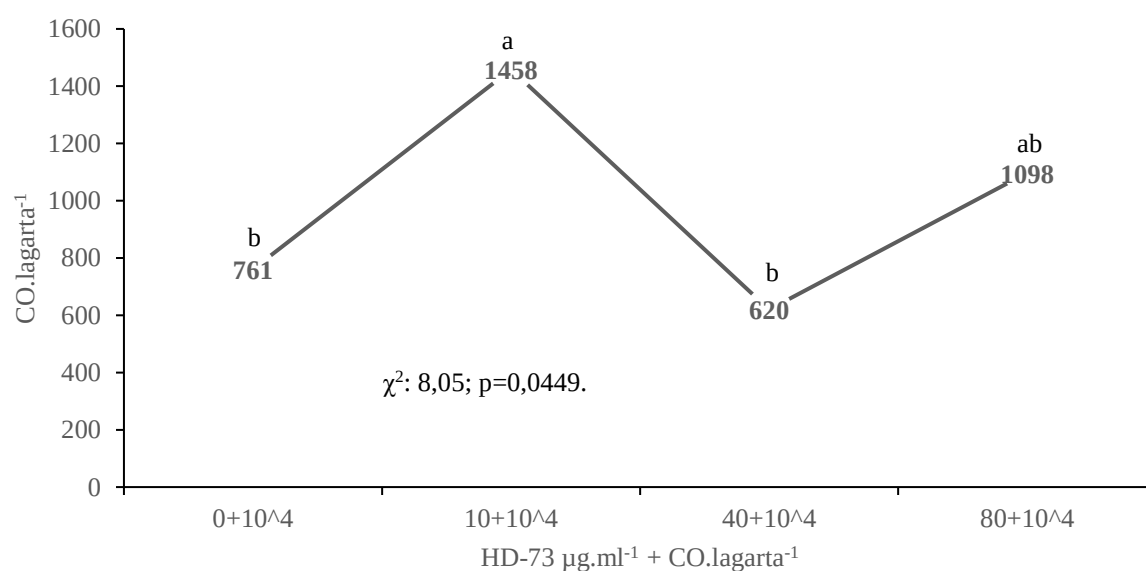


Figura 12. Concentração letal (CL_{50}) de vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV) em lagartas de quarto instar de *Spodoptera frugiperda*. Teste de virulência do SfMNPV oriundo da multiplicação de corpos de oclusão (CO) em lagartas expostas previamente às concentrações 0, 10, 40 e 80 µg.ml⁻¹ de HD-73 (Cry1Ac) e, posteriormente, com 10^4 CO.lagarta⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

2.4 DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que as concentrações subletais de HD-73 afetaram negativamente o peso larval de *S. frugiperda*, podendo causar maior impacto na biomassa da lagarta quando associado com o vírus de poliedrose nuclear, SfMNPV, no entanto estes resultados dependem das concentrações adotadas. Por exemplo, as melhores associações da aplicação sequencial de HD-73 e SfMNPV, que proporcionaram menor peso larval, foram $10+10^4$, $40+10^3$ e $40+10^4$ $\mu\text{g.ml}^{-1}+\text{CO.lagarta}^{-1}$, respectivamente.

A infecção prévia de *S. frugiperda* com HD-73 não ocasionou ganhos significativos na mortalidade pelo baculovírus, sendo a proporção de indivíduos mortos pelas inoculações combinadas de HD-73 e SfMNPV, semelhante a ação do vírus isoladamente. Efeito negativo na mortalidade de insetos tem sido frequentemente citado na literatura para interações entre Bt e os VPN (HATEM; AMER; VARGAS-OSUNA, 2012; LIU et al., 2006; LOPEZ LASTRA; BOUCIAS; SOARES JR., 1995), no entanto estes efeitos podem ser mais prejudiciais ao considerar a transmissão secundária ou horizontal dos baculovírus. Em nossas investigações fica evidente que a exposição prévia de *S. frugiperda* à HD-73 (Cry1Ac) reflete no número de CO por cadáver, efeito que pode estar correlacionado com o menor peso larval. Consequentemente, reduz drasticamente a fonte de inóculo para subseqüentes infecções. Independentemente da presença ou não de Bt e da quantidade de CO.lagarta⁻¹, o tempo médio para mortalidade dos indivíduos por vírus foi similar entre todos os tratamentos.

Outro fator relevante é que, dependendo da quantidade da proteína Bt ingerida pela lagarta, pode ocorrer menor virulência do baculovírus multiplicado nestes indivíduos. Assim, consequentemente, requerendo maior quantidade de corpos de oclusão para causar significativa mortalidade dos indivíduos a serem infectados. Ao avaliarem se a coinfeção de Bt e o baculovírus, PaflNPV, afetaria a dinâmica de transmissão viral em *Mamestra brassicae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Noctuidae), Hesketh e Hails (2015) registraram que na transmissão primária a aplicação simultânea de PaflNPV e Bt ocasionaram maior mortalidade, comparado à aplicação do vírus isoladamente, porém o rendimento de CO foi afetado na presença de Bt. Como consequência, os autores observaram impacto negativo na transmissão secundária, o que resultou em menor taxa na transmissão viral. Além disso, a mortalidade de lagartas por vírus oriundos da combinação foi inferior aos indivíduos infectados com vírus isoladamente, resultados estes que corroboram com as observações da presente investigação.

O mecanismo pelo qual está relacionado a menor virulência do baculovírus, após a multiplicação em lagartas expostas à Bt, ainda é obscuro. Normalmente, as hipóteses de efeitos

negativos entre Bt e VPN são baseados no modo de ação de cada patógeno ou na resposta imune do hospedeiro. Alterações provocadas por Bt no sistema imune de *S. frugiperda* não foram observadas na presente pesquisa (Capítulo 1), sugerindo que existem outros mecanismos envolvidos nestas reações.

Portanto, pode-se concluir que concentrações subletais de HD-73 (Cry1Ac) causam impactos negativos na interação com SfMNPV em *S. frugiperda*. Os efeitos mais drásticos são na multiplicação do SfMNPV, que reflete em menor fonte de inóculo para infecções secundárias. Como projeto piloto dos efeitos subletais de Cry1Ac em organismos não-alvo, estes resultados indicam que não seria viável a adoção conjunta de soja Bt e do vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV), para o controle biológico de *S. frugiperda*. Entretanto, validação em ensaios de campo é necessária para confirmação dos resultados de laboratório, ora apresentados. É provável que outras espécies com baixa suscetibilidade à toxina Cry1Ac, como *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) e *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae), também apresentem interações negativas com baculovírus, havendo, no entanto, a necessidade de mais estudos nesta área.

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA BACTÉRIA HD-73 E SOJA Bt (Cry1Ac) EM COMBINAÇÃO COM ENTOMOPATÓGENOS DE *Spodoptera* spp.

3.1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das principais culturas de importância econômica e comercialmente produzida em larga escala no Brasil, sendo responsável por 55% de toda área cultivada com grãos. Somente na safra 2015/2016, cerca de 33,18 milhões de hectares foram semeados com esta oleaginosa (CONAB, 2016). Entre os fatores que podem afetar a produtividade e a qualidade da produção desta cultura, destacam-se os insetos-praga, os quais atacam desde a fase de plântula até a completa maturação fisiológica da planta. Dentre as mais importantes pragas estão as espécies que pertencem à ordem Lepidoptera, como a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae), espécie considerada praga-chave da soja, devido à maior abundância e ocorrência frequente em todas as regiões agrícolas do país (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; MOSCARDI et al., 2012).

Outras espécies de noctuídeos, anteriormente consideradas pragas secundárias, têm se destacado por demonstrarem elevado potencial de dano, maior tolerância aos inseticidas e regular ocorrência na cultura da soja. Dentre estas, estão as lagartas do gênero *Spodoptera* (BUENO et al., 2010; MOSCARDI et al., 2012; QUINTELA et al., 2007), como as lagartas-das-vagens, *S. cosmioides* (Walker, 1858) e *S. eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae), as quais causam os maiores danos na fase reprodutiva, alimentando-se das folhas e, principalmente, de vagens (GAZZONI; YORINORI, 1995; SOSA-GÓMEZ et al., 2014), como também são de maior abundância na região de cerrado do Brasil (QUINTELA et al., 2007). Da mesma forma, a lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar, *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), observada atacando ocasionalmente a soja, principalmente na fase de plântula (HOFFMANN-CAMPO et al., 2012; SOSA-GÓMEZ et al., 1993), que geralmente ocorre em baixas infestações em relação às outras duas espécies de *Spodoptera* (PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012).

Paralelamente aos insetos-praga, existe uma diversidade de organismos que se hospedam na cultura da soja e desempenham a função como agentes de controle biológico, sendo parasitoides, predadores ou patógenos (BUENO et al., 2012). Entre os mais abundantes entomopatógenos está a “doença-branca”, ocasionada pelo fungo *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S.A. Rehner & Humber, que potencialmente causa epizootias, durante períodos de umidade relativa elevada (ALVES et al., 2008), e mortalidade de uma ampla gama de lepidópteros, que ocorrem na soja (AGOSTINI, 2014; COSTA et al., 2015; IGNOFFO et al., 1976; LIMA et al., 2015;

MARUYA; PINTO; GRAVENA, 2001; SOSA-GÓMEZ et al. 2003), favorecendo, assim, o declínio populacional destas pragas. Outros entomopatógenos importantes são os vírus de poliedrose nuclear (VPN), os quais apresentam alta especificidade aos hospedeiros (VALICENTE; BARRETO, 1999). Porém, o uso indiscriminado e de inadequadas técnicas de aplicação de agrotóxicos, tanto para o controle de pragas como de doenças na cultura da soja, tem favorecido o desequilíbrio no agroecossistema e prejudicado a atividade destes inimigos naturais (BUENO et al., 2012), como o impacto negativo na atividade patogênica de *M. rileyi* quando exposto a diferentes fungicidas (SOSA-GÓMEZ, 2005; SOSA-GÓMEZ et al., 2003) e inseticidas (BARBOSA et al., 1997).

Como alternativa no manejo integrado de pragas e reduzir o uso de inseticidas, a fim de minimizar os impactos ambientais e favorecer o equilíbrio no agroecossistema, tem-se empregado o uso de plantas resistentes a insetos, como as plantas geneticamente modificadas, que expressam proteínas Cry e VIP. Recentemente, no Brasil foi liberado comercialmente o cultivo da soja Bt, que expressa a proteína Cry1Ac (CTNBio, 2010), para o controle de lepidópteros. Entretanto, a quantidade de Cry1Ac expressa nos tecidos da soja Bt é apenas suficiente para controlar específicas lagartas desfolhadoras, como *A. gemmatilis* e *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) (CTNBio, 2010; BERNARDI et al., 2012), enquanto para outras espécies não-alvo desta tecnologia, apenas podem afetá-las subletalmente. Por exemplo, Bernardi et al. (2014) observaram que ao fornecerem discos de folhas de soja Bt, as lagartas de *S. cosmioides* e *S. eridania* apresentavam baixa mortalidade, e em *S. frugiperda* prolongava a fase larval, reduzia a viabilidade e aumentava o intervalo entre as gerações.

Além destes insetos-praga, outros organismos estarão expostos aos efeitos letais ou subletais com a adoção de plantas Bt, assunto que tem levantado questionamentos entre alguns pesquisadores, quanto ao impacto desta tecnologia em organismos não-alvo, como os inimigos naturais (ANDOW; HILBECK, 2004; ANDOW, LÖVEI; ARPAIA, 2006; CATARINO et al., 2015; GARCIA; ALTIERI, 2005; LÖVEI; ANDOW). No entanto, ainda são poucos os estudos que investigaram as possíveis interações entre estas plantas geneticamente modificadas e entomopatógenos (CORY; ERICSSON, 2010), uma vez que juntos, poderiam atuar eficientemente no controle das pragas não-alvo desta tecnologia. Em geral, diferentes tipos de respostas poderão ser observados nas interações entre a proteína Cry e a atividade dos patógenos sobre o inseto, sendo de forma negativa ou positiva, ou ainda, terem efeitos independentes (BOTTRELL; BARBOSA; GOULD, 1998; HARE, 2002). Porém, todos esses fatores são variáveis, uma vez que dependem da suscetibilidade, das concentrações aplicadas e ingeridas pelo hospedeiro e que os organismos diferem no modo de ação e reação (HATEM; AMER; VARGAS-OSUNA, 2012; MANTZOUKAS et al.,

2013; MARZBAN et al., 2009; POLANCZYK; ALVES, 2005). Assim, em virtude das extensas áreas com soja Bt, a ocorrência de espécies do complexo *Spodoptera*, consideradas tolerantes a Cry1Ac e de difícil controle, e das condições favoráveis para epizootias ou aplicações inundativas de fungos e vírus para o controle biológico, torna-se importante elucidar os possíveis efeitos das combinações destes entomopatógenos no controle de pragas não-alvo da tecnologia. Portanto, o propósito do presente estudo foi avaliar os efeitos de concentrações subletais de Cry1Ac expressas pela cepa HD-73 e folhas de soja Bt, na interação com vírus de poliedrose nuclear (VPN) e o fungo *M. rileyi* em *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção de noctuídeos e entomopatógenos

As espécies *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda* foram criadas em dieta artificial citada por Parra (2001) e conforme o protocolo de Hoffmann-Campo, Oliveira e Moscardi (1985), a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo, no laboratório de Entomologia da Embrapa Soja. Cultura liofilizada esporulada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, estirpe HD-73 produtora da toxina Cry1Ac, foi produzida e fornecida pela Dra. Gislayne T. Vilas-Boas (Universidade Estadual de Londrina, PR). Os vírus de poliedrose nuclear (VPN) de *S. cosmioides* (*Spodoptera cosmioides* VPN), *S. eridania* (*Spodoptera eridania* VPN) e *S. frugiperda* (SfMNVPV), e o fungo *M. rileyi*, isolado CNPSo-Nr10, encontram-se disponíveis na coleção de entomopatógenos da Embrapa Soja.

Os VPN's foram multiplicados em lagartas de terceiro instar, de sua respectiva espécie, e os indivíduos mortos pelo patógeno foram coletados e armazenados em tubos de microcentrifuga (2ml) a -20°C . Os vírus foram diluídos em água destilada autoclavada (H_2O_d autoclavada) e filtrados através de um algodão hidrófilo, para remoção dos detritos. As concentrações de corpos de oclusão (CO) foram estimadas com o auxílio de um hemocítômetro (Hausser Scientific) e microscópio óptico com magnificação 400x. O fungo *M. rileyi* foi cultivado “in vitro”, em meio de cultura SMAY (caseína, 10g; extrato de levedura, 10g; maltose, 40g; ágar, 15g; e água destilada, 1 L) com hemolinfa, das específicas espécies em estudo, diluída a 1% v/v (*S. frugiperda* – 1 ml hemolinfa / 99 ml SMAY) e 2% v/v (*S. cosmioides* e *S. eridania*), posteriormente sendo vertido em placas de Petri estéreis (50 mm x 10 mm) e mantido sob temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo.

3.2.2 Características gerais dos bioensaios

3.2.2.1 Inoculações dos entomopatógenos na fase larval

Primeiramente, para obter as concentrações desejadas, a bactéria HD-73 liofilizada foi pesada e diluída em H₂O autoclavada, e os vírus quantificados e diluídos em H₂O autoclavada. A incorporação de ambos os entomopatógenos, HD-73 e VPN, na dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976), foi de acordo com o protocolo sugerido por Morales et al. (1995). Uma concentração específica do patógeno foi adicionada quando a temperatura da dieta, sem formaldeído e antibiótico, atingiu aproximadamente 50°C. Posteriormente, a dieta com patógenos foi misturada com o auxílio de um mixer vertical (Philips Walita) e então vertida, aproximadamente 10 ml, em cada copo plástico de 50 ml (Copaza, Içara, SC). Após a solidificação, a dieta foi dividida em duas partes e transferida uma metade para outro copo, os quais foram cobertos e selados com papel dupla face contendo um indivíduo.

A inoculação de *M. rileyi* foi realizada através da distribuição de uma concentração conhecida (conídios.mm⁻²) sobre a superfície da dieta ou via aplicação tópica. No primeiro método, um volume de inóculo (40 µl) foi pipetado sobre a dieta vertida em copos plásticos (50 ml) e, então, espalhado com um bastão de plástico. A dieta inoculada permaneceu em repouso na câmara de fluxo para evaporação do excesso de água. No segundo método, esporos secos da colônia do fungo foram transferidos sobre o dorso das lagartas ($\pm 2,5 \times 10^5$ conídios.larva⁻¹), com auxílio de uma alça de platina de 1 µl. Em ambos os métodos de inoculação foram usadas colônias entre 11 a 15 dias de cultivo e previamente avaliada a germinação dos conídios. Para determinar a viabilidade, uma suspensão de conídios em 0,1% de Tween 80 ($\pm 1 \times 10^6$ conídios.ml⁻¹) foi pulverizada, com auxílio de um inalador compressor (NEC 801 – OMRON, São Paulo), sobre meio de cultura SMAY, disposta em lâminas de microscopia. Após 48 horas de incubação, a 26±1°C, 60±10% UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo, quantificaram-se os conídios germinados e não germinados. Cem conídios foram contados em três campos microscópicos de observação. Em geral, a germinação dos conídios foi superior a 90%.

Na dieta sem patógenos foi adicionada H₂O autoclavada, na mesma proporção das suspensões dos patógenos inoculados. Todos os ensaios foram mantidos a 26±1°C, 60±10% UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo.

3.2.2.2 Condução dos ensaios na fase adulta

Nos ensaios que foram conduzidos até a oviposição, 5 a 12 casais foram separados em pares, com no máximo 48 horas de diferença na emergência entre fêmea e macho, e colocados em gaiolas de tubo PVC (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro). Os tubos foram vedados com tampa de gerbox, juntamente com papel filtro, e com filme plástico, na extremidade inferior e superior, respectivamente. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% e mantidos em câmara climatizada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo. Papel sulfite branco, fixado na parede interna do tubo, foi utilizado como substrato para oviposição. Diariamente foram coletados e quantificados os ovos/fêmeas de todos os casais de cada tratamento, até a mortalidade das fêmeas. Além disso, uma postura ou pelo menos 100 ovos, exceto para os últimos dias de oviposição, nos quais se coletou um menor número de ovos, devido ao definhamento, foram separados, acondicionados em copos plásticos (50 ml) e vedados com tampa de papel de dupla face. Os ovos foram incubados a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo, e avaliada a porcentagem de eclosão larval no quarto dia após a data de postura.

3.2.3 Exposição de *Spodoptera* spp. aos entomopatógenos

Em geral, os ensaios diferiram entre as espécies em estudo, as concentrações dos patógenos e o momento de inoculação, simultânea ou sequencial, e na fonte de alimentação.

3.2.3.1 Exposição simultânea de lagartas de *Spodoptera* spp. a entomopatógenos

Nas investigações dos efeitos da cepa HD-73 aplicada simultaneamente com VPN ou *M. rileyi*, em *S. eridania* e *S. frugiperda*, dois ensaios para cada espécie foram realizados, em diferentes concentrações dos patógenos. Lagartas de terceiro instar foram expostas às dietas inoculadas com as concentrações de 10 μg de HD-73 por ml de dieta ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) e 1×10^5 corpos de oclusão por ml de dieta (CO.ml^{-1}), no primeiro ensaio, e 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml^{-1} , respectivamente, no segundo ensaio. No segundo ensaio de ambas as espécies foi adicionado o tratamento com *M. rileyi* (Nr10), distribuindo-se 40 conídios. mm^{-2} sobre a superfície das dietas com ou livre de HD-73. As lagartas foram mantidas em dietas com os patógenos por 96 horas, sendo, posteriormente, fornecida a dieta livre destes organismos. Em ambas as espécies e ensaios, os parâmetros registrados foram: mortalidade larval diária, peso larval – 7 dias após a exposição (DAE) aos patógenos, viabilidade larval e pupal e, exceto no primeiro ensaio, o peso

de pupa recém-formada (<24 horas). Os tratamentos consistiram em: controle, inoculação com a cepa HD-73, VPN e HD-73+VPN, totalizando 40 lagartas/tratamento; e controle, HD-73, VPN, Nr10, HD-73+VPN e HD-73+Nr10, com 60 lagartas/tratamento, no primeiro e segundo ensaios, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos até a obtenção dos adultos.

3.2.3.2 Exposição sequencial de lagartas de *Spodoptera* spp. a entomopatógenos

A fim de observar a interação dos entomopatógenos aplicados sequencialmente em *Spodoptera* spp., quatro ensaios foram conduzidos, sendo um para cada espécie, *S. eridania* e *S. frugiperda*, e dois para *S. cosmioides*. Em todos os ensaios, lagartas neonatas foram mantidas em contato por 48 horas em dieta inoculada ou não com a bactéria HD-73, sendo, na sequência, transferidas para dieta contendo VPN ou em dieta livre de patógenos, para inoculação tópica com *M. rileyi*. As lagartas permaneceram por 96 horas até a substituição por dieta sem patógenos. Em cada ensaio e espécie foram adotadas as seguintes concentrações de HD-73 e VPN: *S. eridania*, 67 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$; *S. frugiperda*, 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$; e para *S. cosmioides*, 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1,24 \times 10^4$ CO.ml $^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$, respectivamente. As variáveis observadas nas três espécies foram: mortalidade larval diária, peso larval – 9 DAE à HD-73, peso pupal - 24 h após sua completa formação (>24 h), viabilidade larval e pupal. Somente para *S. cosmioides* e *S. frugiperda*, os ensaios foram conduzidos até a fase adulta, quando foram avaliados a razão sexual, número de ovos/fêmea, viabilidade de ovos e longevidade de macho e fêmea. Cada tratamento foi composto por 60 lagartas e distribuídos em: controle, HD-73, VPN, Nr10, HD-73+VPN, HD-73+Nr10 e VPN+Nr10.

3.2.3.3 Tecidos foliares de soja RR e BtRR incorporados na dieta artificial

Dois genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR, foram semeados em vasos plásticos (3 L), contendo mistura de terra, areia e esterco curtido, na relação 3:2:2, e cultivados em casa de vegetação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Em cada vaso foram mantidas de duas a três plântulas e, quando necessário, aplicado solução de leite a 5% para o controle de oídio, *Microsphaera diffusa* (Cke. & Pk.). Defensivos agrícolas não foram empregados a fim de evitar efeitos negativos no bioensaio. Plantas no estágio fenológico vegetativo, entre V4 e V6, foram cortadas na base da haste principal e removidas todas as folhas sadias para o processo de desidratação. Inicialmente, obteve-se o peso fresco das folhas de cada genótipo e, na sequência, as mesmas

foram acondicionadas em sacos de papel, submetidas à desidratação em uma estufa, de esterilização e secagem digital, por 72 horas a 50°C. As folhas desidratadas foram pesadas e calculado o teor de matéria seca $[MS (\%) = (\text{Peso final} \times 100) / \text{Peso inicial}]$.

A concentração de Cry1Ac ($\mu\text{g/g}$) no tecido desidratado pode ser, em média, até sete vezes superior à concentração expressa no tecido fresco, durante a fase vegetativa da soja (U.S. EPA, 2010). A fim de fornecer uma concentração subletal de Cry1Ac durante todo desenvolvimento larval de *S. frugiperda*, a quantidade de tecido desidratado incorporada na dieta foi com base no teor de matéria seca de cada genótipo, BRS 283 RR (18,4%) e BRS 283 BtRR (18,6%). Assim, pesou-se 1,84 g (BRS 283 RR) e 1,86 g (BRS 283 BtRR) de folhas desidratadas, as quais foram incorporadas e misturadas em 100 g de dieta a 50°C. O mesmo procedimento citado anteriormente para inoculação dos patógenos (item 3.2.2.1) foi aplicado para SfMNPV ($5 \times 10^3 \text{ CO.ml}^{-1}$) e *M. rileyi* (tópica). Os tratamentos foram: BRS 283 RR (controle), BRS 283 RR+VPN, BRS 283 RR+Nr10, BRS 283 BtRR, BRS 283 BtRR+VPN e BRS 283 BtRR+Nr10, com 64 lagartas/tratamento. As avaliações consistiram em: mortalidade larval diária, peso larval - 9 DAE à soja Bt, peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal, razão sexual, número de ovos/fêmea, viabilidade de ovos e longevidade de fêmeas e machos.

3.2.3.4 Folhas “*in natura*” de soja RR e BtRR

Folhas de soja “*in natura*” dos genótipos BRS 283 RR e BRS 283 BtRR, cultivados conforme citado no bioensaio anterior, foram fornecidas durante todo o desenvolvimento larval, para estudar os efeitos de Cry1Ac em *S. frugiperda* e seus entomopatógenos. O último trifólio totalmente expandido da planta de soja, coletado a partir do estágio fenológico V4, foi fornecido para as lagartas neonatas até o final do terceiro instar. Posteriormente, devido ao maior consumo alimentar a partir do quarto instar, as lagartas foram permitidas a se alimentarem do penúltimo e último trifólio, totalmente expandidos. Os folíolos foram desinfetados em solução de hipoclorito a 0,5%, por cinco minutos e, então, lavados em água corrente antes de serem fornecidos às lagartas.

Inicialmente, neonatas foram separadas em grupos de 10 e acondicionadas em potes de plástico transparente de 200 ml (P13 – Copaza, Içara, SC), juntamente com um folíolo de soja e um pedaço de algodão hidrófilo umedecido no pecíolo, para evitar a desidratação foliar. Após 48 horas, as lagartas foram infectadas com VPN ou fungo. A inoculação de vírus (SfMNPV) foi realizada via aplicação foliar, com o auxílio de um pulverizador de mão (PRATIK AGRO, 1 L), aplicando um total de $1 \times 10^4 \text{ CO}$ sobre a face adaxial dos folíolos. *M.*

rileyi foi inoculado topicamente com a alça de platina de 1 µl. Novos folíolos foram ofertados após o total consumo foliar. No final do terceiro instar, as lagartas foram individualizadas e alimentadas *ad libitum* até a completa formação da pupa. Cada tratamento constituiu-se com 64 lagartas, sendo BRS 283 RR (controle), BRS 283 RR+VPN, BRS 283 RR+Nr10, BRS 283 BtRR, BRS 283 BtRR+VPN e BRS 283 BtRR+Nr10. As variáveis registradas foram: mortalidade larval diária, peso larval - 9 DAE à soja Bt, peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal.

3.2.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso. Os tratamentos na fase larval foram compostos por quatro repetições, e na fase adulta, cada casal constituiu uma repetição. Os dados foram submetidos a uma análise exploratória para verificar se atendem às pressuposições da análise de variância, incluindo o modelo de aditividade (TUKEY, 1949), distribuição normal (SHAPIRO; WILK, 1965), homogeneidade de variâncias (BURR; FOSTER, 1972; HARTLEY, 1940) e independência entre os resíduos. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975). O teste de comparação múltipla de médias utilizado foi de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), analisado pelo pacote científico SAS-Statistical Analysis System, versão 9.2, 2009.

A razão sexual foi determinada pela fórmula: $rs = \text{fêmea} / (\text{fêmea} + \text{macho})$ (SILVEIRA NETO et al., 1976). O tipo de interação foi determinado pela equação de Abbott (LEVY et al., 1986), a qual determina a razão entre a mortalidade observada ($M_{\text{obs}}\%$) na combinação dos patógenos e a respectiva mortalidade esperada ($M_{\text{esp}}\%$), $M_{\text{obs}}/M_{\text{esp}}$. A mortalidade esperada é obtida pela fórmula $M_{\text{esp}} = a + b - (ab/100)$, em que “a” é % de mortalidade ocasionada pelo patógeno 1 isolado e “b”, % de mortalidade pelo patógeno 2 isolado. Se a razão $M_{\text{obs}}/M_{\text{esp}}$ for igual a 1, indica aditividade na interação entre ambos patógenos, se a razão for <1 ou >1, a interação é negativa ou positiva, respectivamente (LEVY et al., 1986).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Exposição simultânea de lagartas de *Spodoptera* spp. a entomopatógenos

Lagartas de *S. eridania* expostas às dietas inoculadas com $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1 \times 10^5 \text{ CO.ml}^{-1}$ apresentaram maior mortalidade por vírus isoladamente (67,50%) e HD-73+VPN (52,50%),

comparadas com a infecção causada por HD-73 isoladamente (7,50%) e ao controle (0,00%). Comportamento similar foi observado no ensaio com $50 \mu\text{g.ml}^{-1} + 5 \times 10^3 \text{ CO.ml}^{-1}$ e $40 \text{ conídios.mm}^{-2}$, em que ocorreu maior mortalidade nas infecções provocadas por HD-73+VPN (40,69%) e VPN (27,71%), em relação à bactéria HD-73 (9,69%), ao fungo Nr10 (1,67%) e ao controle (1,79%). O peso larval foi estatisticamente afetado na presença dos entomopatógenos neste último ensaio, sendo que a inoculação combinada de HD-73+VPN ocasionou menor peso das lagartas de *S. eridania*, comparada com a aplicação de Nr10 isolada e a simultânea de HD-73+Nr10. O menor peso pupal foi registrado na inoculação de VPN isoladamente, que diferiu das infecções com Nr10, HD-73+VPN e HD-73+Nr10. A viabilidade larval e pupal não diferiu entre os indivíduos sobreviventes de cada tratamento (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade larval, peso larval (7 DAE aos patógenos), peso pupal (<24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de *Spodoptera eridania* após exposição simultânea aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (*S. eridania* VPN).

	Mortalidade (%)	Peso Larval (g)	Peso Pupal (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
(10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1 \times 10^5 \text{ CO.ml}^{-1}$)					
Controle	$0,00 \pm 0,00 \text{ b}$	$0,07 \pm 0,01^{\text{ns}}$	-	$97,22 \pm 2,78^{\text{ns}}$	$36,88 \pm 13,13^{\text{ns}}$
HD-73	$7,50 \pm 4,79 \text{ b}$	$0,07 \pm 0,00$	-	$100,00 \pm 0,00$	$8,68 \pm 5,39$
HD-73+VPN	$52,50 \pm 9,46 \text{ a}$	$0,07 \pm 0,01$	-	$91,67 \pm 4,81$	$30,00 \pm 19,15$
VPN	$67,50 \pm 7,50 \text{ a}$	$0,07 \pm 0,01$	-	$100,00 \pm 0,00$	$35,00 \pm 23,63$
p-valor	<0,0001	0,9976	-	0,2421*	0,6289
C.V. (%)	40,75	26,29	-	-	121,43
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; $5 \times 10^3 \text{ CO.ml}^{-1}$; $40 \text{ conídios.mm}^{-2}$) ¹					
Controle	$1,79 \pm 1,79 \text{ c}$	$0,12 \pm 0,02 \text{ a}$	$0,29 \pm 0,01 \text{ abc}$	$98,33 \pm 1,67^{\text{ns}}$	$20,74 \pm 7,91^{\text{ns}}$
HD-73	$9,69 \pm 4,07 \text{ c}$	$0,05 \pm 0,01 \text{ bc}$	$0,26 \pm 0,01 \text{ bc}$	$96,51 \pm 2,03$	$10,10 \pm 2,10$
HD-73+VPN	$40,69 \pm 8,32 \text{ a}$	$0,02 \pm 0,00 \text{ c}$	$0,30 \pm 0,00 \text{ a}$	$97,92 \pm 2,08$	$45,40 \pm 10,19$
VPN	$27,71 \pm 4,53 \text{ ab}$	$0,05 \pm 0,00 \text{ bc}$	$0,25 \pm 0,01 \text{ c}$	$96,67 \pm 3,33$	$23,26 \pm 9,37$
HD-73+Nr10	$11,90 \pm 1,76 \text{ bc}$	$0,06 \pm 0,01 \text{ b}$	$0,29 \pm 0,01 \text{ ab}$	$100,00 \pm 0,00$	$30,54 \pm 6,057$
Nr10	$1,67 \pm 1,67 \text{ c}$	$0,07 \pm 0,00 \text{ b}$	$0,31 \pm 0,00 \text{ a}$	$100,00 \pm 0,00$	$23,93 \pm 8,20$
p-valor	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,5977	0,1358
C.V. (%)	52,13	24,59	5,02	3,50	60,56

Médias seguidas de letras iguais na coluna em cada ensaio não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

* Médias não significativas pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml^{-1}) e *M. rileyi* (conídios.mm^{-2}).

Na exposição de *S. frugiperda* a $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1 \times 10^5 \text{ CO.ml}^{-1}$, a mortalidade induzida por VPN isoladamente (92,50%), e na aplicação simultânea de HD-73+VPN (92,50%), foi significativamente superior à ação isolada de HD-73 (5,00%) e na ausência de patógenos (2,50%). Entretanto, na inoculação com $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ CO.ml}^{-1}$ e $40 \text{ conídios.mm}^{-2}$, a mortalidade não diferiu entre as formas de inoculação, isolada ou combinada. O peso larval de

S. frugiperda foi estatisticamente inferior na inoculação com VPN isolado, mas não diferiu das associações, HD-73+VPN e HD-73+Nr10. O peso pupal, a viabilidade larval e pupal não foram afetados pelos entomopatógenos (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade larval, peso larval (7 DAE aos patógenos), peso pupal (<24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de *Spodoptera frugiperda* após exposição simultânea aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso Larval (g)	Peso Pupal (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
(10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 1×10^5 CO.ml $^{-1}$)					
Controle	2,50 $\pm$ 2,50 b	0,31 $\pm$ 0,04 ^{ns}	-	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
HD-73	5,00 $\pm$ 5,00 b	0,31 $\pm$ 0,02	-	100,00 $\pm$ 0,00	90,00 $\pm$ 5,77
HD-73+VPN	92,50 $\pm$ 4,79 a	0,23 $\pm$ 0,05	-	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
VPN	92,50 $\pm$ 4,79 a	0,28 $\pm$ 0,02	-	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
p-valor	<0,0001	0,3832	-	-	-
C.V. (%)	18,24	23,94	-	-	-
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 5×10^3 CO.ml $^{-1}$; 40 conídios.mm $^{-2}$) ¹					
Controle	1,67 $\pm$ 1,67 ^{ns}	0,15 $\pm$ 0,00 a	0,27 $\pm$ 0,00 ^{ns}	98,33 $\pm$ 1,67 ^{ns}	86,35 $\pm$ 0,32 ^{ns}
HD-73	0,00 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00 b	0,27 $\pm$ 0,00	97,92 $\pm$ 2,08	88,51 $\pm$ 3,90
HD-73+VPN	7,28 $\pm$ 2,92	0,05 $\pm$ 0,00 bc	0,26 $\pm$ 0,01	98,08 $\pm$ 1,92	88,09 $\pm$ 5,26
VPN	2,22 $\pm$ 2,22	0,03 $\pm$ 0,00 c	0,26 $\pm$ 0,00	94,46 $\pm$ 1,88	87,74 $\pm$ 3,89
HD-73+Nr10	1,67 $\pm$ 1,67	0,04 $\pm$ 0,01 bc	0,27 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	72,07 $\pm$ 3,93
Nr10	0,00 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00 b	0,26 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	81,07 $\pm$ 3,15
p-valor	0,0906	<0,0001	15,0900	0,1818	0,0820
C.V. (%)	53,35	13,42	4,38	3,15	8,76

Médias seguidas de letras iguais na coluna e por ensaio não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (conídios.mm $^{-2}$).

3.3.2 Exposição sequencial de lagartas de *Spodoptera* spp. a entomopatógenos

Nos estudos com aplicações sequenciais dos entomopatógenos em lagartas neonatas, a única diferença significativa observada na mortalidade de *S. eridania* foi entre as causadas pelas aplicações isoladas de *M. rileyi* (33,83%) e HD-73 (6,35%). Os tratamentos realizados com HD-73, isoladamente e nas aplicações sequenciais, HD-73+VPN e HD-73+Nr10, resultaram em menor peso larval de *S. eridania*, comparado à inoculação com VPN, Nr10, VPN+Nr10 e ao controle. Em todos os tratamentos, os entomopatógenos não afetaram estatisticamente o peso pupal e a viabilidade de lagartas e pupas (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de *Spodoptera eridania* após exposição sequencial aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (*Spodoptera eridania* VPN).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso larval (g)	Peso Pupal (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
(67 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹					
Controle	15,76 $\pm$ 7,45 ab	0,24 $\pm$ 0,01 a	0,31 $\pm$ 0,01 ^{ns}	96,74 $\pm$ 1,90 ^{ns}	51,92 $\pm$ 3,33 ^{ns}
HD-73	6,35 $\pm$ 3,72 b	0,12 $\pm$ 0,02 bc	0,32 $\pm$ 0,01	87,47 $\pm$ 2,13	46,67 $\pm$ 4,51
HD-73+VPN	13,60 $\pm$ 5,47 ab	0,10 $\pm$ 0,01 c	0,31 $\pm$ 0,00	94,58 $\pm$ 1,85	51,14 $\pm$ 8,82
VPN	20,61 $\pm$ 2,25 ab	0,24 $\pm$ 0,01 a	0,31 $\pm$ 0,00	93,56 $\pm$ 4,03	60,42 $\pm$ 6,25
HD-73+Nr10	17,93 $\pm$ 4,10 ab	0,10 $\pm$ 0,02 c	0,29 $\pm$ 0,01	94,34 $\pm$ 3,48	63,36 $\pm$ 9,79
Nr10	33,83 $\pm$ 5,71 a	0,22 $\pm$ 0,02 a	0,32 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	57,50 $\pm$ 7,83
VPN+Nr10	28,96 $\pm$ 4,03 ab	0,18 $\pm$ 0,02 ab	0,31 $\pm$ 0,01	97,22 $\pm$ 2,78	71,82 $\pm$ 12,00
p-valor	0,0135	<0,0001	0,2392	0,0747	0,3777
C.V. (%)	50,33	18,51	4,64	5,41	27,86

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

Na exposição sequencial de *S. cosmioides* a 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1,24 \times 10^4$ CO.ml $^{-1}$ ou 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$ foi significativamente evidente a maior mortalidade ocasionada pelo vírus, isolado ou em combinação, comparada às infecções por bactéria e fungo isolados (Tabela 4).

Nas inoculações com 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1,24 \times 10^4$ CO.ml $^{-1}$, a interação entre HD-73 e *M. rileyi* (23,61%) proporcionou mortalidade superior às aplicações isoladas destes dois patógenos (6,79% e 9,50%, respectivamente). A aplicação sequencial de HD-73+Nr10 resultou em maior peso de pupa do que a infecção isolada e simultânea de VPN e *M. rileyi*, porém não diferiu de HD-73 isoladamente e controle (Tabela 4).

O peso larval de *S. cosmioides* foi estatisticamente inferior nas exposições isoladas ou simultâneas de VPN e *M. rileyi*, em relação às aplicações com HD-73 isoladamente e o controle, para as infecções com 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de *Spodoptera cosmioides* após exposição sequencial aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (*Spodoptera cosmioides* VPN).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso Larval (g)	Peso Pupal (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1,24 \times 10^4$ CO.ml $^{-1}$) ¹					
Controle	2,94 $\pm$ 2,94 c	0,14 $\pm$ 0,02 ^{ns}	0,49 $\pm$ 0,00 ab	91,87 $\pm$ 4,22 ^{ns}	53,92 $\pm$ 2,59 d
HD-73	6,79 $\pm$ 2,72 c	0,10 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,06 ab	96,67 $\pm$ 3,33	86,81 $\pm$ 1,85 b
HD-73+VPN	98,44 $\pm$ 1,56 a	0,06 $\pm$ 0,01	-	-	-
VPN	95,31 $\pm$ 3,00 a	0,12 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,02 b	100,00 $\pm$ 0,00	-
HD-73+Nr10	23,61 $\pm$ 4,86 b	0,09 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01 a	89,06 $\pm$ 6,44	59,55 $\pm$ 3,49 d
Nr10	9,50 $\pm$ 1,79 c	0,13 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,01 b	98,21 $\pm$ 1,79	73,46 $\pm$ 2,42 c
VPN+Nr10	97,14 $\pm$ 1,69 a	0,13 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,02 b	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 a
p-valor	<0,0001	0,1304	0,0046	0,4266	<0,0001
C.V. (%)	10,74	35,65	4,01	8,35	6,82
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$)					
Controle	4,69 $\pm$ 3,00 b	0,44 $\pm$ 0,02 a	0,45 $\pm$ 0,01 ^{ns}	95,16 $\pm$ 1,65 ^{ns}	93,35 $\pm$ 2,44 ^{ns}
HD-73	6,28 $\pm$ 2,73 b	0,46 $\pm$ 0,01 a	0,46 $\pm$ 0,01	94,74 $\pm$ 3,25	83,09 $\pm$ 6,81
HD-73+VPN	98,44 $\pm$ 1,56 a	-	-	-	-
VPN	93,33 $\pm$ 4,71 a	0,26 $\pm$ 0,03 bc	0,44 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
HD-73+Nr10	6,32 $\pm$ 2,74 b	0,37 $\pm$ 0,01 ab	0,44 $\pm$ 0,01	91,95 $\pm$ 1,06	87,56 $\pm$ 7,22
Nr10	3,14 $\pm$ 1,82 b	0,31 $\pm$ 0,03 bc	0,45 $\pm$ 0,00	93,53 $\pm$ 2,56	86,81 $\pm$ 9,07
VPN+Nr10	90,30 $\pm$ 4,52 a	0,25 $\pm$ 0,04 c	0,44 $\pm$ 0,02	100,00 $\pm$ 0,00	72,22 $\pm$ 14,70
p-valor	<0,0001	<0,0001	0,6928	0,1339	0,4352
C.V. (%)	14,88	11,19	4,08	4,29	17,72

Médias seguidas de letras iguais na coluna e por ensaio não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

Devido à elevada mortalidade provocada por vírus, não foi possível obter adultos para realizar os ensaios de fecundidade, fertilidade e longevidade. Não foram observados efeitos negativos na oviposição de *S. cosmioides* comparada ao controle, quando tratada com os entomopatógenos, HD-73 e *M. rileyi* (Tabela 5). A exposição larval à HD-73 e *M. rileyi*, isolados ou combinados, não interferiram na longevidade das fêmeas e dos machos. Somente no ensaio com 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1,24 \times 10^4$ CO.ml $^{-1}$, que foi registrado maior razão sexual de fêmeas em *S. cosmioides*, quando ocorreu a aplicação sequencial de HD-73 e *M. rileyi* (Tabela 5).

Tabela 5. Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual de *Spodoptera cosmioides* após a exposição sequencial aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (*Spodoptera cosmioides* VPN).

Tratamentos	N. ovos/fêmea	Viab. ovos (%)	Long. fêmea (dias)	Long. macho (dias)	Razão sexual
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $1,24 \times 10^4$ CO. ml^{-1}) ¹					
Controle	3025,36 $\pm$ 544,81 ^{ns}	5,91 $\pm$ 4,07 ^{ns}	18,45 $\pm$ 1,42 ^{ns}	20,54 $\pm$ 1,22 ^{ns}	0,49
HD-73	3903,33 $\pm$ 534,76	12,11 $\pm$ 5,09	17,75 $\pm$ 1,11	21,92 $\pm$ 0,86	0,42
HD-73+VPN	-	-	-	-	-
VPN	-	-	-	-	-
HD-73+Nr10	2630,83 $\pm$ 669,19	0,00 $\pm$ 0,00	21,33 $\pm$ 2,60	25,33 $\pm$ 2,85	0,63
Nr10	3065,08 $\pm$ 422,13	9,99 $\pm$ 6,18	15,67 $\pm$ 2,01	19,42 $\pm$ 1,79	0,46
VPN+Nr10	-	-	-	-	-
p-valor	0,4206	0,4919	0,2369	0,1298	-
C.V. (%)	52,63	206,90	30,83	23,49	-
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO. ml^{-1})					
Controle	1607,33 $\pm$ 309,85 b	0,00 $\pm$ 0,00	18,50 $\pm$ 2,44 ^{ns}	19,25 $\pm$ 1,75 ^{ns}	0,45
HD-73	3422,00 $\pm$ 252,49 a	7,35 $\pm$ 5,77	16,25 $\pm$ 1,12	16,92 $\pm$ 0,10	0,51
HD-73+VPN	-	-	-	-	-
VPN	-	-	-	-	-
HD-73+Nr10	1888,83 $\pm$ 227,45 b	0,67 $\pm$ 0,60	22,50 $\pm$ 2,29	18,42 $\pm$ 1,34	0,43
Nr10	2098,67 $\pm$ 465,66 b	0,02 $\pm$ 0,02	18,08 $\pm$ 2,36	17,75 $\pm$ 2,01	0,49
VPN+Nr10	-	-	-	-	-
p-valor	0,0015	-	0,2173	0,7560	-
C.V. (%)	50,29	-	39,01	30,13	-

Médias seguidas de letras iguais na coluna e por ensaio não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO. ml^{-1}) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

Lagartas de *S. frugiperda* apresentaram maior suscetibilidade à exposição simultânea de VPN+Nr10 (41,42%), seguida pela infecção isolada de vírus (28,06%), do que as interações entre HD-73+VPN (7,97%) e HD-73+Nr10 (5,96%), a ação isolada de cada patógeno, HD-73 (6,08%) e Nr10 (0,00%), e ao controle (0,00%) (Tabela 6).

O peso larval foi afetado na exposição combinada dos patógenos, HD-73+VPN, HD-73+Nr10, VPN+Nr10, e de VPN isolado, comparado à aplicação isolada de *M. rileyi* e na ausência de patógenos. O peso de pupa na interação VPN+Nr10 foi inferior ao VPN isolado, porém não diferiu dos outros tratamentos. Semelhante aos resultados obtidos para *S. cosmioides* e *S. eridania*, as aplicações isoladas ou em combinações dos entomopatógenos não provocaram efeitos significativos na viabilidade larval e pupal de *S. frugiperda* (Tabela 6).

Tabela 6. Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de *Spodoptera frugiperda* após exposição sequencial aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso larval (g)	Peso pupa (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹					
Controle	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,57 $\pm$ 0,01 a	0,29 $\pm$ 0,00 ab	100,00 $\pm$ 0,00 ^{ns}	97,14 $\pm$ 1,65 ^{ns}
HD-73	6,08 $\pm$ 2,41 c	0,50 $\pm$ 0,02 ab	0,29 $\pm$ 0,00 ab	100,00 $\pm$ 0,00	98,44 $\pm$ 1,56
HD-73+VPN	7,97 $\pm$ 1,90 c	0,43 $\pm$ 0,02 b	0,28 $\pm$ 0,00 ab	95,00 $\pm$ 3,19	96,16 $\pm$ 2,29
VPN	28,06 $\pm$ 2,33 b	0,47 $\pm$ 0,02 b	0,29 $\pm$ 0,01 a	94,95 $\pm$ 2,94	92,29 $\pm$ 2,71
HD-73+Nr10	5,96 $\pm$ 2,19 c	0,44 $\pm$ 0,00 b	0,28 $\pm$ 0,00 ab	98,21 $\pm$ 1,79	93,80 $\pm$ 2,42
Nr10	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,56 $\pm$ 0,02 a	0,29 $\pm$ 0,00 ab	100,00 $\pm$ 0,00	92,25 $\pm$ 4,56
VPN+Nr10	41,42 $\pm$ 4,17 a	0,43 $\pm$ 0,02 b	0,27 $\pm$ 0,00 b	95,83 $\pm$ 4,17	93,94 $\pm$ 6,06
p-valor	<0,0001	<0,0001	0,0169	0,3402	0,7146
C.V. (%)	35,57	7,11	2,77	4,39	6,46

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

O número de ovos por fêmea, assim como a viabilidade de ovos de *S. frugiperda*, não foram afetados pelos entomopatógenos aplicados na fase larval. No entanto, a inoculação simultânea de VPN+Nr10 resultou na menor longevidade das fêmeas, comparada à ação de *M. rileyi* isoladamente, e na menor razão sexual, em relação aos demais tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7. Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual de *Spodoptera frugiperda* após exposição sequencial aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).

Tratamentos	N. ovos/fêmea	Viab. ovos (%)	Long. fêmea (dias)	Long. macho (dias)	Razão Sexual
(50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 5×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹					
Controle	2334,08 $\pm$ 287,50 ^{ns}	38,76 $\pm$ 8,78 ab	15,42 $\pm$ 1,70 ab	15,25 $\pm$ 0,95 ^{ns}	0,58
HD-73	2450,25 $\pm$ 224,32	35,95 $\pm$ 8,04 ab	12,83 $\pm$ 1,32 ab	18,00 $\pm$ 0,73	0,58
HD-73+VPN	2607,75 $\pm$ 241,44	61,28 $\pm$ 6,35 a	12,82 $\pm$ 0,86 ab	16,50 $\pm$ 1,30	0,52
VPN	2055,00 $\pm$ 225,94	21,48 $\pm$ 9,65 b	14,54 $\pm$ 1,70 ab	15,92 $\pm$ 1,46	0,56
HD-73+Nr10	3026,30 $\pm$ 262,49	60,19 $\pm$ 6,23 a	14,18 $\pm$ 1,02 ab	16,08 $\pm$ 0,93	0,47
Nr10	2549,75 $\pm$ 261,91	46,47 $\pm$ 10,55 ab	16,64 $\pm$ 0,97 a	16,58 $\pm$ 1,27	0,54
VPN+Nr10	2229,92 $\pm$ 331,39	69,10 $\pm$ 4,62 a	10,83 $\pm$ 0,92 b	17,92 $\pm$ 1,43	0,37
p-valor	0,2738	0,0024	0,0430	0,6138	-
C.V. (%)	37,02	55,15	30,96	24,65	-

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo

- = parâmetro não avaliado

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

3.3.3 Bioensaios com folhas de soja RR e BtRR

As taxas de mortalidades de *S. frugiperda* causadas após a inoculação da dieta com tecidos foliares desidratados dos genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR, em

combinação com os entomopatógenos, não diferiram significativamente do controle (BRS 283 RR). Em todos os casos, o menor peso larval registrado foi encontrado nos tratamentos que apresentavam tecidos de soja Bt incorporados à dieta. Diferente do observado para o peso larval, o peso pupal não foi afetado. A inoculação do VPN, após 48h de alimentação da dieta com tecidos de BRS 283 BtRR, proporcionou menor viabilidade larval (77,61%) e pupal (56,46 %), este último, diferiu apenas dos tratamentos compostos com tecido foliar do genótipo BRS 283RR (Tabela 8).

Mortalidades larvais superiores foram obtidas ao fornecer folha “*in natura*” e posterior inoculação com *M. rileyi*, BRS 283 BtRR+Nr10 (96,67 %) e BRS 283 RR+Nr10 (80,95 %), em comparação aos tratamentos com vírus e na ausência de patógenos (Tabela 8).

O menor peso larval registrado foi nos tratamentos de lagartas alimentadas com soja BtRR e soja RR inoculadas com *M. rileyi*, sendo também afetado em menor proporção pelos tratamentos com VPN, aplicados nos folíolos de ambos os genótipos. Por outro lado, o peso das pupas foi estatisticamente inferior quando ofertadas folhas “*in natura*” do genótipo BRS 283 BtRR, livre de patógenos e na presença de VPN, enquanto que a menor viabilidade pupal foi verificada nos indivíduos provenientes do tratamento com soja não Bt (BRS 283 RR) e *M. rileyi*. Não se observou efeito significativo sobre a viabilidade larval (Tabela 8).

O número de ovos por fêmea, a viabilidade de ovos e a longevidade de fêmeas e machos, não apresentaram diferenças significativas em comparação à testemunha, quando o tecido foliar foi incorporado na dieta e os entomopatógenos inoculados após 48 h. Predominância de machos foi registrada nos tratamentos com BRS 283 RR+VPN (0,32) e BRS 283 BtRR+Nr10 (0,39), enquanto o maior número de fêmeas ocorreu na inoculação com BRS 283 RR+Nr10 (0,67) (Tabela 9).

Tabela 8. Mortalidade larval, peso larval (9 DAE ao tecido foliar), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) de *Spodoptera frugiperda* após exposição aos tecidos foliares, incorporado na dieta artificial ou “in natura”, dos genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR, e aos entomopatógenos, *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso larval (g)	Peso pupal (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
Tecido foliar incorporado na dieta artificial					
BRS 283 RR	3,12 $\pm$ 1,80 ^{ns}	0,53 $\pm$ 0,01 a	0,28 $\pm$ 0,00 ^{ns}	100,00 $\pm$ 0,00 a	96,97 $\pm$ 1,75 a
BRS 283 BtRR	1,67 $\pm$ 1,67	0,45 $\pm$ 0,01 b	0,26 $\pm$ 0,00	95,67 $\pm$ 1,44 a	80,54 $\pm$ 6,16 ab
BRS 283 BtRR + VPN ¹	4,69 $\pm$ 3,00	0,44 $\pm$ 0,02 b	0,27 $\pm$ 0,01	77,61 $\pm$ 4,09 b	56,46 $\pm$ 9,07 b
BRS 283 RR + VPN	3,12 $\pm$ 1,80	0,55 $\pm$ 0,03 a	0,27 $\pm$ 0,00	96,67 $\pm$ 1,92 a	94,76 $\pm$ 1,75 a
BRS 283 BtRR + Nr10 ²	9,19 $\pm$ 4,00	0,39 $\pm$ 0,00 b	0,27 $\pm$ 0,01	91,15 $\pm$ 3,49 a	73,89 $\pm$ 9,40 ab
BRS 283 RR + Nr10	4,69 $\pm$ 4,69	0,53 $\pm$ 0,02 a	0,27 $\pm$ 0,00	96,87 $\pm$ 1,80 a	95,28 $\pm$ 3,15 a
p-valor	0,6146	<0,0001	0,6435	<0,0001	0,0010
C.V. (%)	138,60	7,09	5,62	5,41	14,75
Folhas “in natura”					
BRS 283 RR	3,71 $\pm$ 2,14 b	0,28 $\pm$ 0,01 a	0,27 $\pm$ 0,01 a	100,00 $\pm$ 0,00 ^{ns}	86,54 $\pm$ 5,77 a
BRS 283 BtRR	21,79 $\pm$ 6,79 b	0,12 $\pm$ 0,01 c	0,19 $\pm$ 0,00 b	85,36 $\pm$ 5,42	73,14 $\pm$ 6,91 a
BRS 283 BtRR + VPN ³	20,24 $\pm$ 4,61 b	0,13 $\pm$ 0,01 c	0,19 $\pm$ 0,00 b	87,82 $\pm$ 4,07	73,41 $\pm$ 5,73 a
BRS 283 RR + VPN	13,00 $\pm$ 0,91 b	0,23 $\pm$ 0,00 b	0,26 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00	85,26 $\pm$ 6,74 a
BRS 283 BtRR + Nr10 ⁴	96,67 $\pm$ 1,92 a	0,02 $\pm$ 0,01 e	-	-	-
BRS 283 RR + Nr10	80,95 $\pm$ 5,58 a	0,06 $\pm$ 0,01 d	0,25 $\pm$ 0,01 a	86,67 $\pm$ 8,16	16,67 $\pm$ 16,67 b
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0942	0,0004
C.V. (%)	21,50	10,71	4,98	10,32	22,95

Médias seguidas de letras iguais na coluna e por ensaio não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado;

¹ Tecido incorporado na dieta + 5×10^3 CO.ml⁻¹ (SfMNPV).

² Tecido incorporado na dieta + *M. rileyi* (aplicação tópica).

³ Folha “in natura” + 1×10^4 CO.ml⁻¹ (SfMNPV).

⁴ Folha “in natura” + *M. rileyi* (aplicação tópica).

Tabela 9. Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual de *Spodoptera frugiperda* após exposição aos tecidos foliares, dos genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR, incorporados na dieta, e aos entomopatógenos, *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (SfMNPV).

Tratamentos	N. ovos/fêmea	Viab. ovos (%)	Long. fêmea (dias)	Long. macho (dias)	Razão Sexual
BRS 283 RR	2673,75 $\pm$ 159,45 ^{ns}	38,29 $\pm$ 8,28 a	12,75 $\pm$ 0,55 ab	15,67 $\pm$ 1,45 ^{ns}	0,59
BRS 283 BtRR	2345,17 $\pm$ 340,56	0,00 $\pm$ 0,00 a	17,00 $\pm$ 1,48 a	14,50 $\pm$ 3,06	0,55
BRS 283 BtRR + VPN ¹	1542,80 $\pm$ 399,32	8,12 $\pm$ 8,12 a	16,60 $\pm$ 2,69 a	13,40 $\pm$ 2,84	0,55
BRS 283 RR + VPN	2318,33 $\pm$ 190,66	11,97 $\pm$ 5,67 a	12,11 $\pm$ 1,05 ab	10,78 $\pm$ 1,39	0,32
BRS 283 BtRR + Nr10 ²	1747,71 $\pm$ 197,58	17,75 $\pm$ 9,00 a	15,29 $\pm$ 2,20 ab	14,14 $\pm$ 1,26	0,39
BRS 283 RR + Nr10	2118,42 $\pm$ 301,98	34,88 $\pm$ 8,00 a	9,75 $\pm$ 0,95 b	11,42 $\pm$ 1,26	0,67
p-valor	0,0642	0,0180	0,0019	0,2331	-
C.V. (%)	34,70	100,81	28,93	38,01	-

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado

¹ Tecido incorporado na dieta + 5×10^3 CO.ml⁻¹ (SfMNPV).

² Tecido incorporado na dieta + *M. rileyi* (aplicação tópica).

3.3.4 Efeito das interações

Nas aplicações simultâneas, a interação entre a bactéria HD-73 e os VPN provocaram em ambos lepidópteros, *S. eridania* e *S. frugiperda*, efeito negativo (mortalidade observada menor que a esperada), quando usadas as concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1 \times 10^5 \text{ CO.mL}^{-1}$. Entretanto, quando as concentrações foram $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5 \times 10^3 \text{ CO.mL}^{-1}$, observou-se interação positiva (mortalidade observada maior que a esperada). Na aplicação de HD-73 com *M. rileyi* o efeito foi positivo para as duas espécies, *S. eridania* e *S. frugiperda* (Tabela 10).

Por outro lado, a aplicação sequencial da bactéria HD-73 e o VPN provocaram efeitos positivo e negativo, nos ensaios com *S. cosmioides* e de *S. eridania* e *S. frugiperda*, respectivamente. Nos ensaios de interação entre HD-73 e *M. rileyi* foram observados casos de interação positiva em *S. cosmioides*, e negativo nas três espécies, *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*. Já a inoculação conjunta de VPN e *M. rileyi* resultou tanto em efeito positivo, para *S. cosmioides* e *S. frugiperda*, quanto efeito negativo em *S. cosmioides* e *S. eridania*. No controle de *S. frugiperda* fica evidente o efeito negativo das folhas de soja Bt na ação de VPN, e o efeito positivo na presença do fungo *M. rileyi*. Em geral, os casos de efeito negativo e positivo registrados para cada tipo de interação foram de 6 e 4 (Bt+VPN); 3 e 5 (Bt+Nr10); e 2 e 2 (VPN+Nr10), respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Tipos de interações [negativa (Neg.), positiva (Pos.) e aditividade (Add.)] entre bactéria HD-73 ou genótipos de soja, BRS 283 RR e BRS 283 BtRR (Cry1Ac), os vírus de poliedrose nuclear (*Spodoptera cosmioides* VPN, *Spodoptera eridania* VPN e SfMNPV) e o fungo *Metarhizium rileyi*, determinada através da relação entre a porcentagem de mortalidade observada (Mo) e a mortalidade esperada (Me) de *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* e *Spodoptera frugiperda*.

Tratamentos	HD-73+NPV			HD-73+Nr10			NPV+Nr10		
	Mo	Me	Int.	Mo	Me	Int.	Mo	Me	Int.
Exposição Simultânea									
<i>S. eridania</i> ¹									
Ensaio 01	52,50	69,94	Neg.	-	-	-	-	-	-
Ensaio 02	40,69	34,71	Pos.	11,90	11,19	Pos.	-	-	-
<i>S. frugiperda</i> ²									
Ensaio 01	92,50	92,88	Neg.	-	-	-	-	-	-
Ensaio 02	7,28	2,22	Pos.	1,67	0,00	Pos.	-	-	-
Exposição Sequencial									
<i>S. cosmioides</i> ³									
Ensaio 01	98,44	95,63	Pos.	23,61	15,64	Pos.	97,14	95,76	Pos.
Ensaio 02	98,44	93,75	Pos.	6,32	9,22	Neg.	90,30	93,54	Neg.
<i>S. eridania</i> ⁴	13,60	25,65	Neg.	17,93	38,03	Neg.	28,96	47,47	Neg.
<i>S. frugiperda</i> ⁵	7,97	32,44	Neg.	5,96	6,08	Neg.	41,42	28,06	Pos.
Folhas de soja									
<i>S. frugiperda</i> ⁶									
Tecido incorporado	4,69	4,74	Neg.	9,19	6,28	Pos.	-	-	-
Folha “in natura”	20,24	31,95	Neg.	96,67	85,10	Pos.	-	-	-

¹ Ensaio 01 (10 µg.ml⁻¹ e 1x10⁵ CO.ml⁻¹) e Ensaio 02 (50 µg.ml⁻¹; 5x10³ CO.ml⁻¹; 40 conídios.mm⁻²);

² Ensaio 01 (10 µg.ml⁻¹ e 1x10⁵ CO.ml⁻¹) e Ensaio 02 (50 µg.ml⁻¹; 5x10³ CO.ml⁻¹; 40 conídios.mm⁻²);

³ Ensaio 01 (50 µg.ml⁻¹ e 1,24x10⁴ CO.ml⁻¹) e Ensaio 02 (50 µg.ml⁻¹ e 5x10³ CO.ml⁻¹);

⁴ (67 µg.ml⁻¹ e 5x10³ CO.ml⁻¹);

⁵ (50 µg.ml⁻¹ e 5x10³ CO.ml⁻¹);

⁶ Tecido incorporado (5x10³ CO.ml⁻¹ e *M. rileyi*, tópica) e Folha “in natura” (1x10⁴ CO.ml⁻¹ e *M. rileyi*, tópica).

- = parâmetro não avaliado

3.4 DISCUSSÃO

Estudos direcionados à aplicação combinada de entomopatógenos para o controle de insetos-praga têm se expandido nos últimos anos, na tentativa de entender os possíveis resultados destas interações. Uma vez que a inoculação combinada pode permitir a interação entre os entomopatógenos e aumentar a virulência, quando comparada ao efeito isolado de cada organismo. Assim, pode contribuir com informações para o manejo integrado de pragas.

Na presente investigação, a exposição simultânea de neonatas de *S. eridania* e *S. frugiperda* à HD-73 e aos respectivos vírus indica ser o melhor método para obter efeitos positivos no controle destas espécies, mas não sendo viável essa combinação em lagartas de terceiro instar. De acordo com Knaak e Fiuza (2005), a inoculação simultânea dos entomopatógenos, HD-1 e AgMNPV, proporcionou maior mortalidade de *A. gemmatilis*, comparada à infecção pelo vírus isoladamente. Além disso, os mesmos autores destacam que a

associação dos patógenos provocam mudanças no intestino larval 6 horas após o tratamento, enquanto que as primeiras alterações celulares nas inoculações de cada patógeno, isoladamente, iniciam-se somente 12 h após o tratamento. Reação similar pode ter ocorrido em ambas as espécies de *Spodoptera*, devido à degradação da microvilosidade no intestino médio de *S. frugiperda*, também iniciada 12 h após o tratamento com HD-73 (KNAAK et al., 2010).

Ao alimentar *S. frugiperda* com tecidos de soja Bt, fica evidente o efeito negativo na doença ocasionada pelo baculovírus, indicando que não seria promissora a aplicação do agente microbiano para o controle deste lepidóptero, quando já exposto à proteína Cry1Ac. Os principais efeitos ocasionados por Bt em insetos suscetíveis são de alterações citológicas, histológicas e mudanças fisiológicas, como mudança na absorção de nutrientes, transformação degenerativa, perda de apetite, paralisia do intestino e desordens fisiológicas, assim levando-o à morte (SCHÜNEMANN; KNAAK; FIUZA, 2014). Portanto, nos casos de infecção sequencial de Bt e VPN, o efeito negativo pode estar ligado ao consumo alimentar da lagarta, que é reduzido na presença de Bt e, conseqüentemente, ocorre a menor ingestão de corpos de oclusão (FARRAR; SHAPIRO; SHEPARD, 2004) ou, dependendo do momento de infecção, a penetração dos vírions pode ser dificultada nas células do intestino médio danificadas por Bt (KALANTARI et al., 2013).

Embora não avaliada a aplicação simultânea dos patógenos em *S. cosmioides*, HD-73 não interferiu negativamente sobre a atividade do vírus inoculado em sucessão, sugerindo que esta espécie sofre menor impacto dos efeitos causados pelas concentrações subletais de Cry1Ac, comparada à *S. eridania* e *S. frugiperda*. A exposição simultânea de *S. eridania* e *S. frugiperda* à HD-73 e *M. rileyi* também apresenta melhor eficiência no controle destas pragas, em relação à aplicação sequencial dos patógenos. Por outro lado, diferente da interação observada entre soja Bt e vírus, lagartas de *S. frugiperda*, expostas inicialmente a tecidos de soja Bt, apresentaram maior suscetibilidade à subsequente inoculação com *M. rileyi*, resultado considerado um ótimo indicativo no controle biológico, uma vez que há grandes possibilidades desse fungo causar epizootias, naturais ou induzidas, em diferentes espécies de lepidópteros-praga da soja (CORRÊA; SMITH, 1975; LIMA et al., 2015; MARUYA; PINTO; GRAVENA, 2001; MORAES; LOECK; BELARMINO, 1991).

A aplicação sequencial de HD-73 e *M. rileyi* resultou tanto em efeito negativo como positivo na mortalidade de *S. cosmioides*, confirmando a maior variabilidade na resposta das interações desta espécie com os entomopatógenos, em relação às obtidas com *S. frugiperda* e *S. eridania*. Algumas pressuposições são descritas sobre o efeito destes patógenos. De acordo com Mantzoukas et al. (2013), médias e baixas doses de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* são responsáveis por afetarem as funções vitais da lagarta, aumentando a suscetibilidade à

penetração do fungo, assim favorecendo ao efeito aditivo quando usado de média a altas concentrações do fungo. Já para a interação negativa, Polanczyk e Alves (2005) relataram que pode ocorrer competição durante a colonização do hospedeiro pelo fungo, ao encontrar-se com os esporos de Bt. Em geral, ainda são desconhecidos os possíveis mecanismos de ação e reação quando ocorre a interação entre Bt e *M. rileyi* no mesmo hospedeiro.

A tolerância à Cry1Ac é uma característica do gênero *Spodoptera*, previamente, relatada na literatura (LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; ADAMCZYK JR.; SUMERFORD, 2001; GREENBERG; LI; LIU, 2010; SILVA, 2016; BERNARDI et al., 2014). Contudo, efeitos subletais desta proteína já foram observados em *S. frugiperda*, tais como peso larval, prolongação no tempo para pupação e emergência dos adultos (ADAMCZYK JR. et al., 1998), e menor fecundidade (BERNARDI et al., 2014), enquanto para *S. cosmioides* e *S. eridania*, apenas afeta o peso larval (BERNARDI et al., 2014). Sabendo desses impactos ocasionados por Cry1Ac em *Spodoptera* spp., espera-se que a combinação com um segundo patógeno possa intensificar os efeitos negativos sobre os componentes biológicos destes lepidópteros. Porém, no presente estudo, estes resultados nas interações foram em geral nulos e, quando presenciado, geralmente não diferia da ação dos patógenos isoladamente.

A maioria dos estudos visam lepidópteros-praga que apresentam maior suscetibilidade a diferentes cepas ou produtos comercialmente formulados de *B. thuringiensis*, para elucidarem as interações com vírus, e com menor frequência, com fungos entomopatogênicos. Por isso, existe uma proeminente necessidade de investigar como os patógenos interagem em organismos não-alvo utilizando uma única toxina, como o caso de lagartas de *Spodoptera* spp. e a proteína Cry1Ac. No presente estudo foi possível estimar as possíveis consequências da soja Bt, que expressa Cry1Ac, em combinação com entomopatógenos sobre *Spodoptera* spp. Os resultados demonstraram que o principal parâmetro para avaliar as interações é a mortalidade, sendo insignificantes as respostas dos componentes biológicos nas combinações entre os agentes microbianos. A utilização desta tecnologia pode propiciar interação positiva entre Cry1Ac e *M. rileyi* no controle de *S. eridania* e *S. frugiperda*, e com o vírus, em *S. cosmioides*. A inoculação simultânea configura a melhor alternativa para usar baculovírus no controle biológico de *S. eridania* e *S. frugiperda*. Trabalhos devem ser realizados em nível de campo, para avaliar se o mesmo comportamento das interações será expresso sob condições naturais. Estudos adicionais sobre o mecanismo de toxicidade são necessários para entender a ação-reação dos organismos em interação.

CAPÍTULO 4 - EFEITO SUBLETAL DE HD-73 (Cry1Ac) NAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE PLUSIINAE E NA ATIVIDADE DE SEUS ENTOMOPATÓGENOS

4.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (CTNBio, 2005) e o milho (*Zea mays* L.) (CTNBio, 2007) foram as primeiras culturas Bt adotadas como estratégias para o manejo integrado dos principais lepidópteros-chave. Da mesma forma, e por ser a cultura de maior importância econômica do país, desde 2013 foi liberado comercialmente a soja Bt [*Glycine max* (Merrill) L.], que expressa a proteína Cry1Ac, para o controle das pragas lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Erebididae), e das lagartas-falsas-medideiras, *Rachiplusia nu* (Gueneé, 1852) e *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) (CTNBio, 2010).

Devido ao fato de *C. includens* ser amplamente distribuída nas regiões produtoras do país, causar danos econômicos (MOSCARDI et al., 2012) e apresentar suscetibilidade à Cry1Ac (BERNARDI, 2012; YANO, 2012), a soja Bt tem sido rapidamente adotada pelos produtores, como opção para o controle desta praga e a supressão de outros noctuídeos, como *Chloridea virescens* (Fabricius, 1781), *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) e *H. zea* (Boddie, 1850) (MONSANTO, 2015). Como reflexo, em um período de dois anos, este evento já foi semeado em aproximadamente 6,3 milhões de hectares, o que representa cerca de 20% de toda a área cultivada com a oleaginosa (GALVÃO, 2015).

Por outro lado, as lagartas-falsas-medideiras podem ser naturalmente controladas pela “doença-branca”, ocasionada pelo fungo *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S.A. Rehner & Humber (MORAES; LOECK; BELARMINO, 1991; MARUYA; PINTO; GRAVENA, 2001), que eventualmente causa epizootias em períodos de temperatura e umidade relativa elevada (ALVES et al., 2008). Em menor frequência, são encontrados os vírus de poliedrose nuclear (VPN) que, além de proporcionarem eficiente controle das Plusiinae, também apresentam potencial para utilização em programas de controle biológico (MOSCARDI; SOSA-GÓMEZ, 1992; ALEXANDRE et al., 2010). Possíveis efeitos, negativos ou positivos, das relações entre entomopatógenos e as culturas Bt podem ser cruciais para adoção de táticas no MIP (LUNDGREN et al., 2009).

Diversos estudos elucidaram os efeitos das proteínas Bt na interação com entomopatógenos, principalmente com baculovirus, em diferentes espécies de noctuídeos, tais como *H. armigera* (Hübner) (LIU et al., 2006; MARZBAN et al., 2009; KALANTARI et al., 2013), *Spodoptera* spp. (LOPEZ LASTRA; BOUCIAS; SOARES JR., 1995; HATEM; AMER; VARGAS-OSUNA,

2012); *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (MANTZOUKAS et al., 2013) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (McVAY; GUDAUSKAS; HARPER, 1977; SARFRAZ; CERVANTES; MYERS, 2010). No entanto, os resultados destas relações foram variáveis, tanto com efeito negativo quanto positivo ou aditivo. De fato, as interações dependem da suscetibilidade, das concentrações aplicadas e ingeridas pelo hospedeiro e que os organismos diferem no modo de ação e reação.

Neste contexto, o conhecimento da interação dos organismos-alvo e não-alvo da tecnologia expressa pela soja Bt é de grande importância teórica e prática. É importante salientar que as lagartas falsas-medideiras apresentam uma ampla gama de plantas hospedeiras (SILVA et al., 1968 apud SPECHT et al., 2006; SPECHT; PAULA-MORAES; SOSA-GÓMEZ, 2015). Como consequência, essas pragas poderiam ingerir uma quantidade não letal de Cry1Ac expressa na soja Bt, ou seja, ficando expostas apenas a uma concentração subletal da toxina. Em paralelo, estas lagartas migrariam para outras espécies hospedeiras, sendo então, simultaneamente ou sequencialmente, infectadas por agentes microbianos. Com base nessas possibilidades, as possíveis hipóteses são: i) a exposição de espécies-alvo a concentrações subletais de HD-73 (Cry1Ac) afetará a expressão das doenças causadas por entomopatógenos; e ii) a interação entre os agentes microbianos afetará os componentes biológicos das pragas-alvo.

Neste estudo foi avaliado a interação entre concentrações subletais de HD-73, que expressa Cry1Ac, e os entomopatógenos, baculovírus e *M. rileyi*, em duas espécies-alvo, *C. includens* e *R. nu*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção de noctuídeos e entomopatógenos

As espécies *C. includens* e *R. nu* foram criadas em dieta artificial conforme o protocolo de Hoffmann-Campo, Oliveira e Moscardi (1985), a $26\pm1^{\circ}\text{C}$, $60\pm10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo, no laboratório de Entomologia da Embrapa Soja. Cultura liofilizada esporulada de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, estirpe HD-73 produtora da toxina Cry1Ac, foi produzida e fornecida pela Dra. Gislayne T. Vilas-Boas (Universidade Estadual de Londrina, PR). Os vírus de poliedrose nuclear (VPN), de *C. includens* (PsinSNPV) e *R. nu* (RanuMNPV), e o fungo *M. rileyi*, isolado CNPSo - Nr10, encontram-se disponíveis na coleção de entomopatógenos da Embrapa Soja.

Antes de realizar os ensaios, cada VPN foi multiplicado em lagartas de terceiro instar, de sua respectiva espécie, e os indivíduos mortos pelo patógeno foram coletados e armazenados em tubos de microcentrífuga a -20°C . Os vírus foram diluídos em água destilada autoclavada

(H₂O_d autoclavada) e filtrados através de um algodão hidrófilo, para remoção dos detritos. O fungo *M. rileyi* foi cultivado “in vitro”, em meio de cultura SMAY (caseína, 10g; extrato de levedura, 10g; maltose, 40g; ágar, 15g; e água destilada, 1 L), com hemolinfa das espécies em estudo diluída a 2% v/v. O meio foi vertido em placas de Petri estéreis (50 mm x 10 mm) e mantido a 26±1°C, 60±10% UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo.

4.2.2 Características gerais dos bioensaios

4.2.2.1 Inoculações dos entomopatógenos na fase larval

Primeiramente, para obter as concentrações desejadas, a bactéria HD-73 liofilizada foi pesada e diluída em H₂O_d autoclavada, e os vírus quantificados e diluídos em H₂O_d autoclavada. A incorporação de ambos os entomopatógenos, HD-73 e VPN, na dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) foi de acordo com o protocolo sugerido por Morales et al. (1995). Uma concentração específica do patógeno foi adicionada quando a temperatura da dieta, sem formaldeído e antibiótico (estreptomicina), atingiu aproximadamente 50°C. Posteriormente, a dieta com patógenos foi misturada com o auxílio de um agitador do tipo Vortex (Agitador de Tubos Phoenix, Modelo AP 56) e então vertida (10 ml) em copos plásticos de 50 ml (Copaza, Içara, SC). Após a solidificação da dieta e a adição de uma lagarta individualizada, os copos foram cobertos e selados com papel dupla face.

A inoculação de *M. rileyi* foi realizada via aplicação tópica, com auxílio de uma alça de platina de 1 µl, esporos secos da colônia do fungo foram transferidos sobre o dorso das lagartas ($\pm 2,5 \times 10^5$ conídios.larva⁻¹). Na inoculação foram usadas colônias entre 11 a 15 dias de cultivo e previamente avaliada a germinação dos conídios. Para determinar a viabilidade, uma suspensão de conídios em 0,1% de Tween 80 ($\pm 1 \times 10^6$ conídios.ml⁻¹) foi pulverizada, com auxílio de um inalador compressor (NEC 801 – OMRON, São Paulo), sobre meio de cultura SMAY, disposta em lâminas de microscopia. Após 48 horas de incubação, a 26±1°C, 60±10% UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo, quantificaram-se os conídios germinados e não germinados. Cem conídios foram contados em três campos microscópicos de observação. Em geral, a germinação dos conídios foi superior a 90%.

Na dieta sem patógenos foi adicionada H₂O_d autoclavada na mesma proporção das suspensões dos patógenos inoculados. Todos os ensaios foram mantidos a 26±1°C, 60±10% UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo.

4.2.2.2 Condução dos ensaios na fase adulta

Os tubos foram vedados com tampa de gerbox, juntamente com papel filtro, e com filme plástico, na extremidade inferior e superior, respectivamente. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% e mantidos em câmara climatizada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo. Papel sulfite branco, fixado na parede interna do tubo, foi utilizado como substrato para oviposição. Diariamente foram coletados e quantificados os ovos/fêmeas, de todos os casais de cada tratamento, até a mortalidade das fêmeas. Além disso, uma postura ou pelo menos 100 ovos, exceto para os últimos dias de oviposição, nos quais se coletou um menor número de ovos, devido ao definhamento, foram separados, acondicionados em copos plásticos (50 ml) e vedados com tampa de papel de dupla face. Os ovos foram incubados a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e 14:10 h (L:E) de fotoperíodo, e avaliada a porcentagem de eclosão larval no quarto dia após a data de postura.

4.2.3 Exposição de Plusiinae aos entomopatógenos

Em geral, os ensaios diferiram entre as espécies em estudo, as concentrações dos patógenos e o momento de inoculação, simultânea ou sequencial, e na fonte de alimentação.

4.2.3.1 Exposição simultânea de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos

Para avaliar os efeitos da bactéria HD-73, quando fornecida simultaneamente com VPN em *C. includens* e *R. nu*, um ensaio para cada espécie foi realizado. Lagartas de quarto instar foram inoculadas com HD-73 e VPN nas concentrações de 2 μg de HD-73 por ml de dieta ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e 3×10^3 corpos de oclusão por ml de dieta ($\text{CO}.\text{ml}^{-1}$). As lagartas foram mantidas em dietas com os patógenos por 96 horas e posteriormente foi fornecida a dieta livre destes organismos. Em ambas as espécies, os parâmetros registrados foram: mortalidade larval diária, peso larval 7 dias após a exposição (DAE) aos patógenos, viabilidade larval e pupal. Os tratamentos consistiram em: controle, inoculação com a cepa HD-73, VPN e HD-73+VPN, totalizando 32 lagartas/tratamento. Os ensaios foram conduzidos até a obtenção dos adultos.

4.2.3.2 Exposição sequencial de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos

A fim de observar a interação dos entomopatógenos aplicados sequencialmente em Plusiinae, conduziram-se dois ensaios para cada espécie, *C. includens* e *R. nu*. Em todos os

ensaios, neonatas foram mantidas em contato, por 48 horas, com dieta inoculada ou não com a bactéria HD-73. Na sequência, as lagartas foram transferidas para dieta contendo VPN ou em dieta livre de patógenos, para inoculação tópica com *M. rileyi*. As lagartas permaneceram por 96 horas até a substituição por dieta sem patógenos. Em cada ensaio e espécie foram adotadas as seguintes concentrações de HD-73 e VPN: *C. includens*, 6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml⁻¹, para primeiro e segundo ensaio, e para *R. nu*, 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml⁻¹, no primeiro ensaio, e 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml⁻¹, respectivamente, no segundo ensaio. As variáveis observadas nas duas espécies foram: mortalidade larval diária e peso larval – 9 DAE à HD-73, exceto no primeiro ensaio, peso pupal - 24 h após sua completa formação (>24 h), viabilidade larval e pupal. Somente o segundo ensaio de ambos os lepidópteros foram conduzidos até a fase adulta, quando foram avaliados a razão sexual, número de ovos/fêmea, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas. Cada tratamento foi composto por 60 lagartas e os tratamentos consistiram em inoculação com HD-73, VPN, Nr10, HD-73+VPN, HD-73+Nr10, VPN+Nr10 e controle, sem inoculação de patógenos.

4.2.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições, para os ensaios na fase larval, e 12 repetições para fase adulta, sendo cada casal uma repetição. Os dados foram submetidos a uma análise exploratória para verificar se atendem às pressuposições da análise de variância, incluindo o modelo de aditividade (TUKEY, 1949), distribuição normal (SHAPIRO; WILK, 1965), homogeneidade de variâncias (BURR; FOSTER, 1972; HARTLEY, 1940) e independência entre os resíduos. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975). O teste de comparação múltipla de médias utilizado foi de Tukey, ao nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), analisado pelo pacote científico SAS-Statistical Analysis System, versão 9.2 (2009).

A razão sexual foi determinada pela fórmula: $rs = \text{fêmea} / (\text{fêmea} + \text{macho})$ (SILVEIRA NETO et al., 1976). O tipo de interação foi determinado pela equação de Abbott (LEVY et al., 1986), a qual determina a razão entre a mortalidade observada ($M_{\text{obs}}\%$) na combinação dos patógenos e a respectiva mortalidade esperada ($M_{\text{esp}}\%$), $M_{\text{obs}}/M_{\text{esp}}$. A mortalidade esperada é obtida pela fórmula $M_{\text{esp}} = a + b - (ab/100)$, em que “a” é % de mortalidade ocasionada pelo patógeno 1 isolado e “b”, % de mortalidade pelo patógeno 2 isolado. Se a razão $M_{\text{obs}}/M_{\text{esp}}$ for igual a 1, indica aditividade na interação entre ambos patógenos, se a razão for <1 ou >1, a interação é negativa ou positiva, respectivamente (LEVY et al., 1986).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Exposição simultânea de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos

A mortalidade de *C. includens* provocada pela inoculação do vírus isoladamente (82,14%) e pela aplicação simultânea de HD-73+VPN (73,02) foi estatisticamente superior à HD-73 isoladamente (29,76%) e ao controle (13,49%). A presença de entomopatógenos afetou consideravelmente o peso larval, exceto no tratamento com VPN isolado, que não diferiu do controle. Lagartas de *C. includens* expostas ao vírus isoladamente apresentaram menor viabilidade larval (75,00%) e pupal (75,00%), porém a diferença não foi significativa entre os tratamentos (Tabela 11).

A aplicação simultânea em *R. nu* com HD-73+VPN (79,46%) proporcionou maior mortalidade do que cada patógeno isoladamente, HD-73 (17,41%) e VPN (30,56%) e ao controle (34,82%). Não foram observadas diferenças significativas nas comparações entre o peso larval, viabilidade larval e pupal (Tabela 11).

Tabela 11. Mortalidade larval, peso larval (7 DAE aos patógenos), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) após a exposição simultânea de lagartas de quarto instar de *Chrysodeixis includens* e *Rachiplusia nu* aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73) e aos respectivos vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV e RanuMNPV).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso larval (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
<i>C. includens</i> (2 μ g.ml ⁻¹ e 3x10 ³ CO.ml ⁻¹) ¹				
Controle	13,49 $\pm$ 5,89 b	0,07 $\pm$ 0,00 a	95,83 $\pm$ 4,17 ^{ns}	100,00 $\pm$ 0,00 ^{ns}
HD-73	29,76 $\pm$ 5,95 b	0,04 $\pm$ 0,00 b	88,75 $\pm$ 6,58	95,83 $\pm$ 4,17
HD-73+VPN	73,02 $\pm$ 6,04 a	0,04 $\pm$ 0,01 b	100,00 $\pm$ 0,00	87,50 $\pm$ 12,50
VPN	82,14 $\pm$ 8,99 a	0,06 $\pm$ 0,01 ab	75,00 $\pm$ 25,00	75,00 $\pm$ 25,00
p-valor	<0,0001	0,0126	0,5692	0,6220
C.V. (%)	27,59	19,50	29,13	31,55
<i>R. nu</i> (2 μ g.ml ⁻¹ e 3x10 ³ CO.ml ⁻¹)				
Controle	34,82 $\pm$ 9,49 b	0,07 $\pm$ 0,02 ^{ns}	100,00 $\pm$ 0,00	93,75 $\pm$ 6,25 ^{ns}
HD-73	17,41 $\pm$ 13,57 b	0,06 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	92,86 $\pm$ 4,12
HD-73+VPN	79,46 $\pm$ 3,68 a	0,08 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
VPN	30,56 $\pm$ 9,33 b	0,12 $\pm$ 0,02	96,43 $\pm$ 3,57	79,52 $\pm$ 7,36
p-valor	0,0038	0,0891	-	0,0932
C.V. (%)	47,73	37,73	-	11,47

Médias seguidas de letras iguais na coluna e por espécie não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 (μ g.ml⁻¹) e corpos de oclusão VPN (CO.ml⁻¹).

4.3.2 Exposição sequencial de lagartas de Plusiinae a entomopatógenos

Variabilidade foi observada nas interações, quando exposta *C. includens* às mesmas concentrações dos patógenos, $6 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $3 \times 10^3 \text{ CO.ml}^{-1}$ e *M. rileyi* por aplicação tópica. No primeiro ensaio, a mortalidade de *C. includens* não diferiu entre os tratamentos. O peso larval foi estatisticamente afetado nos tratamentos com HD-73, tanto na aplicação isolada (0,05 g), quanto em combinação com *M. rileyi* (0,04 g) e VPN (0,10 g) (Tabela 12).

Em contraste, diferenças significativas foram observadas na mortalidade de *C. includens* entre os tratamentos no segundo ensaio, com maior proporção nas associações de HD-73+Nr10 (59,52%) e HD-73+VPN (52,35%), em relação à inoculação de cada patógeno isoladamente, HD-73 (28,53%), Nr10 (13,02%) e VPN (8,89%). Similar ao resultado do primeiro ensaio, as lagartas expostas à HD-73 estatisticamente apresentaram menor peso larval. As exposições sequenciais de lagartas de *C. includens* aos entomopatógenos não proporcionaram efeitos negativos no peso de pupa, na viabilidade larval e pupal (Tabela 12).

A interação entre os entomopatógenos não afetou significativamente a fecundidade das fêmeas comparada ao controle, exceto para a combinação HD-73+Nr10 que teve fecundidade nula. Considerando os tratamentos com adultos férteis, somente a viabilidade de ovos resultantes da inoculação sequencial de HD-73+VPN (6,35%) foi significativamente inferior ao controle (51,14%). A aplicação sequencial ou isolada dos patógenos não afetou a longevidade de fêmea e macho em relação ao controle, no entanto maior proporção de fêmeas alcançou a fase adulta no tratamento com HD-73+Nr10 (Tabela 13).

Tabela 12. Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (> 24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) após a exposição sequencial de neonatas de *Chrysodeixis includens* aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso larval (g)	Peso pupal (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
(6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹					
Controle	14,01 $\pm$ 3,32 ab	0,15 $\pm$ 0,01 b	-	-	-
HD-73	18,25 $\pm$ 2,85 ab	0,05 $\pm$ 0,00 d	-	-	-
HD-73+VPN	9,39 $\pm$ 5,26 b	0,10 $\pm$ 0,01 c	-	-	-
VPN	15,87 $\pm$ 3,33 ab	0,18 $\pm$ 0,01 b	-	-	-
HD-73+Nr10	28,04 $\pm$ 5,38 ab	0,04 $\pm$ 0,00 d	-	-	-
Nr10	35,42 $\pm$ 5,91 a	0,14 $\pm$ 0,01 b	-	-	-
VPN+Nr10	28,96 $\pm$ 5,87 ab	0,24 $\pm$ 0,00 a	-	-	-
p-valor	0,0097	<0,0001	-	-	-
C.V. (%)	42,25	14,01	-	-	-
(6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$)					
Controle	0,00 $\pm$ 0,00 d	0,26 $\pm$ 0,02 a	0,27 $\pm$ 0,00 ^{ns}	100,00 $\pm$ 0,00 ^{ns}	95,56 $\pm$ 2,72 ^{ns}
HD-73	28,53 $\pm$ 7,89 bc	0,07 $\pm$ 0,01 b	0,25 $\pm$ 0,00	95,00 $\pm$ 2,89	97,22 $\pm$ 2,78
HD-73+VPN	52,35 $\pm$ 5,79 ab	0,08 $\pm$ 0,02 b	0,26 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
VPN	8,89 $\pm$ 5,44 cd	0,25 $\pm$ 0,02 a	0,27 $\pm$ 0,00	96,55 $\pm$ 2,00	98,21 $\pm$ 1,79
HD-73+Nr10	59,52 $\pm$ 9,78 a	0,05 $\pm$ 0,01 b	0,27 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
Nr10	13,02 $\pm$ 0,67 cd	0,25 $\pm$ 0,00 a	0,26 $\pm$ 0,00	98,44 $\pm$ 1,56	100,00 $\pm$ 0,00
VPN+Nr10	8,00 $\pm$ 3,77 cd	0,25 $\pm$ 0,00 a	0,26 $\pm$ 0,01	100,00 $\pm$ 0,00	98,61 $\pm$ 1,39
p-valor	<0,0001	<0,0001	0,1397	0,1727	0,5079
C.V. (%)	47,47	15,63	2,76	3,10	3,53

Médias seguidas de letras iguais na coluna e por ensaio não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

Tabela 13. Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual após a exposição sequencial de neonatas de *Chrysodeixis includens* aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV).

Tratamentos	N. ovos/fêmea	Viab. ovos (%)	Long. fêmea (dia)	Long. macho (dia)	Razão Sexual
(6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹					
Controle	1471,50 $\pm$ 204,72 a	51,14 $\pm$ 7,38 a	14,75 $\pm$ 1,29 ^{ns}	19,42 $\pm$ 2,25 ^{ns}	0,43
HD-73	971,09 $\pm$ 196,25 ab	19,91 $\pm$ 6,46 abc	15,00 $\pm$ 0,79	18,55 $\pm$ 1,83	0,48
HD-73+VPN	703,92 $\pm$ 240,71 ab	6,35 $\pm$ 2,59 bc	12,75 $\pm$ 1,12	17,75 $\pm$ 1,51	0,50
VPN	840,33 $\pm$ 216,17 ab	30,14 $\pm$ 9,45 abc	14,25 $\pm$ 1,12	18,00 $\pm$ 1,45	0,46
HD-73+Nr10	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 c	13,75 $\pm$ 1,44	13,25 $\pm$ 2,59	0,71
Nr10	629,83 $\pm$ 188,84 ab	25,42 $\pm$ 8,07 abc	15,67 $\pm$ 0,86	19,67 $\pm$ 1,30	0,57
VPN+Nr10	703,17 $\pm$ 192,00 ab	36,58 $\pm$ 8,41 ab	14,91 $\pm$ 1,40	16,25 $\pm$ 1,88	0,48
p-valor	0,0117	0,0007	0,6386	0,5035	-
C.V. (%)	83,31	92,95	26,09	32,90	-

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

Nos estudos com as concentrações 4 µg de HD-73.ml⁻¹, 3x10³ CO.ml⁻¹ e *M. rileyi* por aplicação tópica, a exposição sequencial de *R. nu* à cepa HD-73 seguida por *M. rileyi* (47,16%) proporcionou mortalidade superior à aplicação de HD-73 isoladamente (17,50%), no entanto ambos os tratamentos não diferiram do controle (20,00%). A mesma associação, HD-73+Nr10, afetou significativamente o peso larval comparado às inoculações de *M. rileyi*, isoladamente e em combinação com vírus, VPN+Nr10, e ao controle (Tabela 14).

Por outro lado, nas inoculações com 2 µg de HD-73.ml⁻¹, 3x10³ CO.ml⁻¹ e *M. rileyi* por aplicação tópica, as lagartas expostas às aplicações de vírus apresentaram significativamente maior mortalidade, VPN (72,29%), VPN+Nr10 (70,59%) e HD-73+VPN (66,67%). A inoculação sequencial de HD-73+VPN e a simultânea de VPN+Nr10 proporcionaram o menor peso larval e pupal, respectivamente, apesar de não diferirem do controle. Diferenças estatísticas não foram observadas na viabilidade larval e pupal (Tabela 14).

Embora os entomopatógenos tenham apresentado efeitos negativos sobre a mortalidade e peso larval de *R. nu*, as concentrações adotadas destes organismos não prejudicaram a fecundidade, a viabilidade larval e a longevidade de fêmeas e machos comparados ao controle. Entretanto, lagartas inoculadas com HD-73 isoladamente proporcionaram maior número de machos do que fêmeas, razão sexual de 0,37 (Tabela 15).

Tabela 14. Mortalidade larval, peso larval (9 DAE à HD-73), peso pupal (>24 h), viabilidade larval e pupal ($\pm$ EP) após a exposição sequencial de neonatas de *Rachiplusia nu* aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (RanuMNPV).

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso larval (g)	Peso pupal (g)	Viab. Larval (%)	Viab. Pupal (%)
(4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹					
Controle	20,00 $\pm$ 6,67 ab	0,16 $\pm$ 0,01 a	-	-	-
HD-73	17,50 $\pm$ 1,88 b	0,13 $\pm$ 0,01 abc	-	-	-
HD-73+VPN	30,72 $\pm$ 9,54 ab	0,11 $\pm$ 0,01 bc	-	-	-
VPN	24,31 $\pm$ 1,61 ab	0,12 $\pm$ 0,01 abc	-	-	-
HD-73+Nr10	47,16 $\pm$ 6,91 a	0,08 $\pm$ 0,01 c	-	-	-
Nr10	36,00 $\pm$ 3,07 ab	0,15 $\pm$ 0,01 ab	-	-	-
VPN+Nr10	42,66 $\pm$ 7,82 ab	0,16 $\pm$ 0,01 a	-	-	-
p-valor	0,0156	0,0002	-	-	-
C.V. (%)	39,07	16,05	-	-	-
(2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$)					
Controle	4,90 $\pm$ 3,17 b	0,20 $\pm$ 0,01 ab	0,17 $\pm$ 0,00 ab	98,08 $\pm$ 1,92	89,76 $\pm$ 4,37 ^{ns}
HD-73	20,94 $\pm$ 1,39 b	0,15 $\pm$ 0,01 ab	0,18 $\pm$ 0,00 a	96,00 $\pm$ 2,32	93,75 $\pm$ 6,25
HD-73+VPN	66,67 $\pm$ 0,00 a	0,14 $\pm$ 0,01 b	0,18 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
VPN	72,29 $\pm$ 2,50 a	0,19 $\pm$ 0,01 ab	0,17 $\pm$ 0,00 ab	90,00 $\pm$ 5,77	100,00 $\pm$ 0,00
HD-73+Nr10	22,75 $\pm$ 3,57 b	0,21 $\pm$ 0,00 a	0,19 $\pm$ 0,00 a	91,96 $\pm$ 3,41	100,00 $\pm$ 0,00
Nr10	15,83 $\pm$ 1,69 b	0,21 $\pm$ 0,01 a	0,18 $\pm$ 0,00 a	100,00 $\pm$ 0,00	92,58 $\pm$ 2,92
VPN+Nr10	70,59 $\pm$ 7,16 a	0,19 $\pm$ 0,02 ab	0,15 $\pm$ 0,01 b	100,00 $\pm$ 0,00	94,44 $\pm$ 5,56
p-valor	<0,0001	0,0085	0,0013	-	0,5062
C.V. (%)	19,81	14,02	3,83	-	8,25

Médias seguidas de letras iguais na coluna e por ensaio não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo.

- = parâmetro não avaliado.

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

Tabela 15. Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, longevidade de adulto fêmea e macho ($\pm$ EP) e razão sexual após a exposição sequencial de neonatas de *Rachiplusia nu* aos entomopatógenos, *Bacillus thuringiensis* (HD-73), *Metarhizium rileyi* (CNPSO-Nr10) e vírus de poliedrose nuclear (RanuMNPV).

Tratamentos	N. ovos/fêmea	Viab. ovos (%)	Long. fêmea (dias)	Long. macho (dias)	Razão Sexual
(2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹					
Control	732,00 $\pm$ 137,12 ^{ns}	24,93 $\pm$ 7,28 ^{ns}	17,00 $\pm$ 1,98 ^{ns}	19,00 $\pm$ 1,11 ^{ns}	0,52
HD-73	992,10 $\pm$ 167,95	11,08 $\pm$ 5,27	15,60 $\pm$ 1,15	18,56 $\pm$ 1,62	0,30
HD-73+VPN	1021,20 $\pm$ 205,02	40,18 $\pm$ 12,51	13,60 $\pm$ 1,78	17,00 $\pm$ 1,22	0,54
VPN	782,00 $\pm$ 210,99	39,98 $\pm$ 11,88	15,00 $\pm$ 0,84	15,80 $\pm$ 1,24	0,47
HD-73+Nr10	967,91 $\pm$ 139,30	17,62 $\pm$ 5,48	17,36 $\pm$ 0,94	16,64 $\pm$ 0,74	0,48
Nr10	935,00 $\pm$ 121,17	32,73 $\pm$ 6,85	12,92 $\pm$ 1,48	17,33 $\pm$ 1,18	0,53
VPN+Nr10	677,67 $\pm$ 385,60	15,11 $\pm$ 15,11	14,33 $\pm$ 3,18	13,33 $\pm$ 2,91	0,58
p-valor	0,7585	0,1301	0,2834	0,2638	-
C.V. (%)	53,85	89,71	30,22	21,65	-

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

ns= não significativo

- = parâmetro não avaliado

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e *M. rileyi* (aplicação tópica).

4.3.3 Efeito das interações

Quando lagartas de quarto instar de *Plusiinae* foram expostas simultaneamente à HD-73+VPN, nas concentrações 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$, respectivamente, observou-se efeito negativo e positivo para *C. includens* e *R. nu*, respectivamente (Tabela 16).

Do mesmo modo, a inoculação de lagartas neonatas de *C. includens* com HD-73, por 48 h, seguida por VPN, nas concentrações 6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$, respectivamente, resultou em efeito negativo e positivo, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente (Tabela 16).

Em contraste, a exposição sequencial de *R. nu* à HD-73 e VPN resultou na interação negativa em ambas as combinações dos patógenos, 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$ e 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$, respectivamente (Tabela 16).

A inoculação sequencial de *C. includens* com HD-73+Nr10 também resultou em efeito negativo e positivo, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente (Tabela 16).

Em *R. nu*, efeito aditivo e negativo foi observado na aplicação sequencial de HD-73+Nr10, quando usado HD-73 nas concentrações de 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente (Tabela 16).

Interação negativa foi predominante sobre ambas as *Plusiinae*, *C. includens* e *R. nu*, quando inoculadas simultaneamente com VPN e *M. rileyi* (Tabela 16).

Tabela 16. Tipos de interações [negativa (Neg.), positiva (Pos.) e aditividade (Add.)] entre bactéria HD-73 (Cry1Ac), os vírus de poliedrose nuclear (PsinSNPV e RanuMNPV) e o fungo *Metarhizium rileyi*, determinada através da relação entre a porcentagem de mortalidade observada (Mo) e a mortalidade esperada (Me) de *Chrysodeixis includens* e *Rachiplusia nu*.

Data Ensaio	HD-73+VPN			HD-73+Nr10			VPN+Nr10		
	Mo	Me	Int.*	Mo	Me	Int.	Mo	Me	Int.
Exposição Simultânea (2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$) ¹									
<i>C. includens</i>	73,02	87,46	Neg.	-	-	-	-	-	-
<i>R. nu</i>	79,46	42,65	Pos.	-	-	-	-	-	-
Exposição Sequencial (6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$)									
<i>C. includens</i>									
Ensaio 01	9,39	31,22	Neg.	28,04	47,20	Neg.	28,96	45,67	Neg.
Ensaio 02	52,35	34,88	Pos.	59,52	37,83	Pos.	8,00	20,75	Neg.
<i>R. nu</i>									
Ensaio 01	30,72	37,55	Neg.	47,16	47,20	Add.	42,66	51,55	Neg.
(2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 3×10^3 CO.ml $^{-1}$)									
Ensaio 02	66,67	78,09	Neg.	22,74	33,46	Neg.	70,59	76,68	Neg.

- = parâmetro não avaliado

¹ Concentrações de HD-73 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), corpos de oclusão VPN (CO.ml $^{-1}$) e, quando inoculado, *M. rileyi* (aplicação tópica).

4.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os componentes biológicos das Plusiinae são pouco afetados pela exposição das lagartas a concentrações subletais de HD-73 (Cry1Ac), e na interação com agentes entomopatogênicos, *M. rileyi* e os vírus de poliedrose nuclear. Sabe-se que ambas as espécies, *C. includens* e *R. nu*, têm como natural característica a suscetibilidade à Cry1Ac, o que reflete em altas taxas de mortalidade quando infectadas com esta toxina (BERNARDI et al., 2012; YANO, 2012). Contudo, quando expostas a uma concentração subletal de Cry1Ac e por um curto período, geralmente as lagartas sobreviventes apresentam prolongado período larval e redução no peso (ASHFAQ; YOUNG; McNEW, 2001), o que aumentaria a oportunidade para ação de outros patógenos (KALANTARI et al., 2013). Embora não observado o período larval, fica evidente que a exposição à HD-73 (Cry1Ac) afetou negativamente o peso das lagartas e não houve efeito da coinfeção de *M. rileyi* com o vírus.

Variabilidade nas interações entre HD-73 e vírus foram observadas entre as espécies, *C. includens* e *R. nu*, e os métodos de inoculação. Sendo que a aplicação simultânea dos patógenos ofereceu melhor controle de *R. nu*, enquanto que a exposição sequencial, proporcionou ambos os efeitos, positivo e negativo, sobre a mortalidade de *C. includens*. Contudo, ao analisar as interações destes patógenos em ambas as espécies, observou-se maior número de casos em que HD-73 afetou negativamente a mortalidade causada por vírus. Nos experimentos realizados com outros lepidópteros-alvo de Bt, fica evidente a prevalência de efeito negativo ou aditivo, e raramente efeito positivo sobre a mortalidade causada por vírus (KALANTARI et al., 2013; LIU et al., 2006; MARZBAN et al., 2009), resultados que corroboram com a presente pesquisa.

A interação entre HD-73 e *M. rileyi* confere tanto efeito positivo como negativo no controle de *C. includens*, e efeito aditivo e negativo, para *R. nu*. Estes resultados indicam menor eficiência da interação desses patógenos na mortalidade de *R. nu* e a variável probabilidade de sucesso contra *C. includens*. Este último caso é de maior transcendência, devido ao fato dessa praga estar distribuída em todas as regiões produtoras de soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000), e frequente alvo das epizootias ocasionadas por *M. rileyi*. Embora não avaliado neste trabalho, existe a possibilidade de obter favoráveis respostas de interação com a inoculação simultânea de HD-73 e *M. rileyi*, como observado para *S. eridania* e *S. frugiperda* (Capítulo 3, p. 61).

Os estudos das interações entre os agentes microbianos são importantes, tanto na teoria como na prática, o que auxilia nas tomadas de decisões para controle biológico. Apesar de não pesquisada a interação mais complexa, HD-73 + *M. rileyi* + VPN, a aplicação simultânea de *M.*

rileyi e vírus, em ambas as Plusiinae, mostrou-se predominantemente negativa, sendo a maior mortalidade provocada pelo vírus nesta associação (dados não mostrados). Nos estudos com *Trichoplusia ni* (Hübner, [1803]) (Lepidoptera: Noctuidae), em que lagartas de terceiro instar foram expostas ao TnSNPV, seguido por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, a mortalidade por vírus foi negativamente afetada pela coinfeção com fungo, em contrapartida, a interação provocou um aumento de 10% na mortalidade total comparada ao vírus isoladamente (SCHOLEFIELD, 2015). Com base nas observações deste estudo e das encontradas na literatura, há evidências de que o vírus de poliedrose nuclear não responda favoravelmente às interações com outros patógenos.

Conclui-se que as concentrações subletais de HD-73 (Cry1Ac) ingeridas por Plusiinae não potencializam a mortalidade causada por vírus, sendo imprecisos os efeitos nas interações com aplicações sequenciais de *M. rileyi* contra *C. includens*. A utilização de um segundo patógeno não se tornaria uma alternativa viável para o controle biológico de Plusiinae em áreas com soja Bt, exceto em áreas de refúgio. Estudos adicionais devem ser direcionados para as interações em progênes de Plusiinae, devido à elevada capacidade de reprodução, alta suscetibilidade e frequente exposição à Cry1Ac. Em consequência, poderia conduzir a alterações no sistema imunológico e favorecer à “memória adquirida ou efeitos transgeracionais”, o que pode refletir na suscetibilidade aos entomopatógenos, como observado por Shikano et al. (2015) em *T. ni*.

CONCLUSÃO GERAL

Entre os aspectos mais relevantes observados, é possível ressaltar que a exposição à bactéria HD-73 (Cry1Ac) não proporcionou alterações evidentes no sistema imunológico de *S. frugiperda*, assim como não induziu memória adquirida na progênie. As exposições subletais da bactéria afetaram negativamente os parâmetros biológicos de *S. frugiperda*, reduzindo o peso larval, de pupas, a fecundidade das fêmeas e fertilidade dos ovos. Uma vez que a mesma toxina é expressa pela soja Bt, é esperada a ocorrência de alterações semelhantes.

Implicações do ponto de vista epizootológico foram observadas na interação de HD-73 sobre a produção de corpos de oclusão do vírus entomopatogênico SfMNPV, causando impacto negativo significativo. Há evidências do efeito negativo sobre a virulência, porém, aparentemente, esse resultado foi dependente da dose. Em soma, esses efeitos poderiam afetar a ocorrência de epizootias ou aplicações do vírus como agente de controle. Os tecidos de soja que expressam a toxina Cry1Ac também afetaram a mortalidade ocasionada pelo vírus em *S. frugiperda*. Entretanto, esta interação com *M. rileyi* pode ser promissora no controle natural desta espécie.

De maneira geral, os parâmetros biológicos das espécies-alvo, da subfamília Plusiinae (*C. includens* e *R. nu*), e não-alvo, pertencentes ao gênero *Spodoptera* (*S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*), não foram afetados pelas interações entre HD-73, vírus e *M. rileyi*.

Em conclusão, as interações de HD-73/Cry1Ac e vírus não parecem ser promissoras no manejo destas espécies, mas propício à interação resultante com o fungo *M. rileyi* sobre *S. eridania* e *S. frugiperda*, na aplicação simultânea.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK JR., J.J.; HOLLOWAY, J.W.; CHURCH, G.E.; LEONARD, B.R.; GRAVES, J. B. Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ -endotoxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 539-545, 1998.
- ADAMCZYK JR., J.J.; SUMERFORD, D. V. Increased tolerance of fall armyworms (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac δ -endotoxin when fed transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton: impact on the development of subsequent generations. **Florida Entomologist**, v. 84, n. 1, p. 1-6, 2001.
- AGOSTINI, L.T. **Suscetibilidade de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a entomopatógenos**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.
- ALEXANDRE, T.M.; RIBEIRO, Z.M.; CRAVEIRO, S.R.; CUNHA, F.; FONSECA, I.C.; MOSCARDI, F.; CASTRO, M.E. Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 1, p. 98-104, 2010.
- ALVES, S. B.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A.; TAMAI, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R.B. **Controle Microbiano de pragas na américa latina: avanços e desafios**. Piracicaba, São Paulo: FEALQ, 2008. p. 69- 110.
- ANDOW, D.A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for non-target effects of transgenic crops. **BioScience**, v. 54, p. 637-649, 2004.
- ANDOW, D.A.; LÖVEI, G.L.; ARPAIA, S. Ecological risk assessment for Bt crops. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 749–751, 2006.
- ASHFAQ, M.; YOUNG, S.Y.; McNEW, W. Larval mortality and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on a transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton cultivar expressing Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 5, p. 1053-1058, 2001.
- BARBOSA, F.R.; FERNANDES, P.M.; MOREIRA, W.A.; SANTOS, G. Efeito de inseticidas na infecção natural da lagarta-da-soja por *Nomuraea rileyi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 133-136, 1997.
- BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R.; OLIVEIRA, M.D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 137, n. 3, p. 237-245, 2010.

BERNARDI, O.; MALVESTI, G.S.; DOURADO, P.M.; OLIVEIRA, W.S.; MARTINELLI, S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; 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 Management Science**, v. 68, n. 7, p. 1083-91, 2012.

BERNARDI, O.; SORGATTO, R.J.; BARBOSA, A.D.; DOMINGUES, F.A.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection**, v. 58, p. 33–40, 2014.

BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843-850, 2003.

BOTTRELL, D.G.; BARBOSA, P.; GOULD, F. Manipulating natural enemies by plant variety selection and modification: a realistic strategy? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 347-367, 1998.

BUENO, A.F.; BATISTELA, M.J.; MOSCARDI, F. Níveis de desfolha tolerados na cultura da soja sem a ocorrência de prejuízos à produtividade. Londrina: Embrapa Soja, 2010. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 79).

BUENO, A.F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F.; BUENO, R.C.O.F. Inimigos naturais das pragas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 493-630.

BURR, I.W.; FOSTER, L.A. **A test for equality of variances**. Mimeo series nº. 282. University of Purdue, West Lafayette, 1972. 26 p.

CAPINERA, J.L. **Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. University of Florida, IFAS Extension, EENY-098, 1999. 6 p.

CATARINO, R.; CEDDIA, G.; AREAL, F.J.; PARK, J. The impact of secondary pests on *Bacillus Thuringiensis* (Bt) crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, p. 601–12, 2015.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – CTNBio. **Parecer nº 513/2005**. Liberação comercial de algodão geneticamente modificado resistente a insetos evento 531. Processo 01200.002995/1999-54. 2005.

_. **Parecer Técnico nº 1.100/2007**. Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos evento MON810. Processo 01200.002995/1999-54. 2007.

_. **Parecer técnico nº 2542/2010.** Liberação comercial de soja geneticamente modificada resistente a insetos e tolerante a herbicida, soja MON 87701 x MON 89788. 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos, nono levantamento, junho 2016. Brasília: Conab, v. 3, n. 9, 2016. 174 p.

CORRÊA, B.S.; SMITH, J.H. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*, in Paraná. **Florida Entomologist**, v. 58, n. 4, p. 280, 1975.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v. 26, p. 407-410, 1997.

CORY, J.S.; ERICSSON, J.D. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. **Biocontrol**, v. 55, p. 75-88, 2010.

COSTA, V.H.D.da; SOARES, M.A.; RODRÍGUEZ, F.A.D.; ZANUNCIO, J.C.; SILVA, I.M.da; VALICENTE, F.H. *Nomuraea rileyi* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Brazil. **Florida Entomological Society**, n. 98, v. 2, p. 796-798, 2015.

CUNHA, F.M.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TORRES, J.B.; TEIXEIRA, A.A.C.; ALVES, T.J.S.; BRAYNER, F.A. Impact of Bt cotton on the immune system and histology of the midgut of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Animal Biology**, v. 63, p. 185-197, 2013.

CRUZ, I.; TURPIN, F.T. Efeitos da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, n.3, p. 355-359, 1982.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.110-113, 2013.

FARRAR, R.F.; SHAPIRO, M.; SHEPARD, B.M. Activity of the nucleopolyhedrovirus of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on foliage of transgenic sweet corn expressing a Cry1A(b) toxin. **Environmental Entomology**, n. 33, p. 982-989, 2004.

GALVÃO, A. (Ed). **Informativo biotecnologia: 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola, safra 2014/15.** Belo Horizonte: Céleres, jun. 2015. Disponível em: < http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501_150611.pdf >. Acesso em: 09 dez. 2015.

- GARCIA, M.A.; ALTIERI, M.A. Transgenic crops: implications for biodiversity and sustainable agriculture. **Bulletin of Science, Technology & Society**, v. 25, n. 4, 2005.
- GAZZONI, D.L.; YORINORI, J.T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 128 p. (Manuais de Pragas e Doenças, I).
- GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 611-643, 1997.
- GREENBERG, S.M.; LI, Y.X.; LIU, T.X.. Effect of age of transgenic cotton on mortality of lepidopteran larvae. **Southwestern Entomologist**, v. 35, n. 3, p. 261-268, 2010.
- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 488-497, 1976.
- GRINDSTAFF, J.L.; BRODIE, E.D. III; KETTERSON, E.D. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 2309–2319, 2003.
- GRIZANOVA, E.V.; DUBOVSKIY, I.M.; WHITTEN, M.M.A.; GLUPOV, V.V. Contributions of cellular and humoral immunity of *Galleria mellonella* larvae in defence against oral infection by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 40-46, 2014.
- HARE, J.D. Plant genetic variation in tritrophic interactions. In: TSCHARNTKE, T.; HAWKINS, B.A. (Ed.). **Multitrophic level interactions**. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2002. p. 8-43.
- HARTLEY, H.O. Testing the homogeneity of a set of variances. **Biometrika**, v. 31, p. 249-255, 1940.
- HATEM, A.E.; AMER, R.A.M.; VARGAS-OSUNA, E. Combination effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin and nucleopolyhedrovirus or granulovirus of *Spodoptera littoralis* on the cotton leafworm. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 22, n. 2, p. 115-120, 2012.
- HESKETH, H.; HAILS, R.S. *Bacillus thuringiensis* impacts on primary and secondary baculovirus transmission dynamics in Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 171-181, 2015.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, n. 30)

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1985. 23p. (Documentos, 10).

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, L.J.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; CORSO, I.C. Pragas que atacam plântulas, hastes e pecíolos da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 145-212.

IGNOFFO, C.M.; PUTTLER, B.; HOSTETTER, D.L.; DICKERSON, W.A. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, p. 259-262, 1976.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/gm crops: 2014**. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY, 2014. Disponível em: <<http://isaaa.org/resources/publications/briefs/49/executivesummary/pdf/B49-ExecSum-English.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

KALANTARI, M.; MARZBAN, R.; IMANI, S.; ASKARI, H. Effects of *Bacillus thuringiensis* isolates and single nuclear polyhedrosis virus in combination and alone on *Helicoverpa armigera*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 47, n. 1, p. 42-50, 2013.

KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 196-200, 2005.

KURTZ, J.; ARMITAGE, S.A. Alternative adaptive immunity in invertebrates. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 11, p. 493-506, 2006.

KNAAK, N.; FRANZ, A.R.; SANTOS, G.F.; FIUZA, L.M. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 677-684, 2010.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1295-1309, 2002.

LEVY, Y.; BENDERLEY, M.; COHEN, Y.; GISI, U.; BASSAND, D. The joint action of fungicides in mixtures: comparison of two methods for synergy calculation. **EPPO Bulletin**, v. 16, n. 4, p. 651-657, 1986.

LIMA, A.R.de; LOUREIRO, E. de S.; MUCHALAK, F.; TAIRA, T.L.; FERREIRA, F.N.; NOCCHI, M.J. Ocorrência de *Nomuraea rileyi* na *Spodoptera cosmioides* em Chapadão do Sul, MS. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 9, n. 2, p. 57-59, 2015.

LIU, X.; ZHANG, Q.; XU, B.; LI, J. Effects of Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on larval mortality and pupation. **Pest Management Science**, v. 62, p. 729-737, 2006.

LÖVEI, G.L.; ANDOW, D.A.; ARPAIA, S. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 293–306, 2009.

LOPEZ LASTRA, C.C.; BOUCIAS, D.G.; SOARES JR., GG. *Bacillus thuringiensis* endotoxin effects on *Spodoptera exigua* and *S. frugiperda* larva infected with baculoviruses. **Environmental Entomology**, v.24, n. 2, 1995.

LUNDGREN, J.G.; GASSMANN, A.J.; BERNAL, J.; DUAN, J.J.; RUBERSON, J. Ecological compatibility of GM crops and biological control. **Crop Protection**, v. 28, n. 12, p. 1017–1030, 2009.

LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 21–32, 1999.

MA, G.; ROBERTS, H.; SARJAN, M.; FEATHERSTONE, N.; LAHNSTEIN, J.; AKHURST, R.; SCHMIDT, O. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 729–739, 2005.

MA, X.M.; LIU, X.X.; NING, X.; ZHANG, B.; HAN, F.; GUAN, X.M.; TAN, Y.F.; ZHANG, Q.W. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 2, p. 123-128, 2008.

MANTZOUKAS, S.; MILONAS, P.; KONTODIMAS, D.; ANGELOPOULOS, K. Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and two entomopathogenic fungi in bio-control of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 1083-1091, 2013.

MARMARAS, V.J.; LAMPROPOULOU, M. Regulators and signaling in insect haemocyte immunity. **Cellular Signal**, v. 21, p. 186-195, 2009.

MARTINS, J.F.S.; CUNHA, U.S.; OLIVEIRA, J.V.; PRANDO, H.F. Controle de insetos na cultura do arroz irrigado. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. p. 137-154.

MARUYA, W.I.; PINTO, A. de S.; GRAVENA, S. Parasitoides e *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em lagartas desfolhadoras (Lepidoptera) na cultura da soja. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 27, p. 561-567, 2001.

MARZBAN, R.; HE, Q.; LIU, X.; ZHANG, Q. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p. 71–76, 2009.

McVAY, J.R.; GUDAUSKAS, R.T.; HARPER, J.D. Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 29, p. 367-372, 1977.

MONSANTO. **Intacta RR2 PRO®**. Copyright © Monsanto, 2015. Disponível em: <<http://www.intactarr2pro.com.br/>>. Acesso em: 04 julho 2016.

MORAES, R.R.de; LOECK, A.E.; BELARMINO, L.C. Inimigos naturais de *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) e de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 26, n. 1, p. 57-64, 1991.

MORALES, L.C.; MOSCARDI, F.; KASTELIC, J.G.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PARO, F.E.; SOLDORIO, I.L. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, n. 3, p. 593-598, 1995.

MOREAU, J.; MARTINAUD, G.; TROUSSARD, J.P.; ZANCHI, C.; MORET, Y. Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. **Oikos**, v. 121, p. 1828-1832, 2012.

MORET, Y. ‘Trans-generational immune priming’: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 273, p. 1399-1405, 2006.

MORET, Y.; SCHMID-HEMPEL, P. Entomology: immune defence in bumble-bee offspring. **Nature**, v. 414, p. 506-506, 2001.

MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M.T. Adaptive innate immunity? Responsive mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 2475–2480, 2003.

MOSCARDI, F.; BUENO, A.F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; POMARI, A.F.; CORSO, I.C.; YANO, S.A.C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 213-334.

MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ D.R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, L.G.; GREEN, M.B.; REES R.T. (Ed.). **Pest management in soybean**. Springer; Heidelberg, Germany: 1992. p. 98–109.

PANIZZI, A.R.; BUENO, A.F.; SILVA, F.A.C.da. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 335-420.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: Esalq, 2001. 134 p.

PINHEIRO, D.H. **Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMVs) do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* e a avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina em isolados de *Bacillus thuringiensis***. 2013. 134 f. Dissertação (Mestre em Biologia Molecular), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S.B. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Plagas Y Agroecología**, n. 74, p. 24-33, 2005.

PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; MCPHERON, B.A.; THOMPSON, J.N.; WEIS, A.E. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, p. 41-65, 1980.

QUINTELA, E.D.; TEIXEIRA, S.M.; FERREIRA, S.B.; GUIMARÃES, W.F.F.; OLIVEIRA, L.F.C.; CZEPAK, C. Desafios do manejo integrado de pragas da soja em grandes propriedades no Brasil Central. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2007. 65p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 149).

RAHMAN, M.M.; ROBERTS, H.L.S.; SARJAN, M.; ASGARI, S.; SCHMIDT, O. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. **PNAS**, v. 101, n. 9, p. 2696-2699, 2004.

ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; LI, M.S.; JIN, B.R.; JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 547-559, 2007.

ROTH, O.; JOOP, G.; EGGERT, H.; HILBERT, J.; DANIEL, J.; SCHMID-HEMPEL, P.; KURTZ, J. Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of Animal Ecology**, v. 79, p. 403-413, 2010.

SALVADORI, J.R. Pragas do trigo no Brasil. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E (Ed.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. p. 155-168.

SANTOS, W.J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E.C (Ed.). **Algodão – no cerrado do Brasil**. 2 ed. Aparecida de Goiânia: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2011. p. 459-566.

SARFRAZ, R.M.; CERVANTES, V.; MYERS, J.H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) increases susceptibility to a nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 204-206, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's Guide. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869p.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 62, v. 3, p. 775-806, 1998.

SCHMID-HEMPEL, P. Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. **BioEssays**, v. 27, p. 1026–1034, 2005.

SCHMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K.; THEOPOLD, U.; FAYE, I. Role of adhesion in arthropod immune recognition. **Annuals Review of Entomology**, v. 55, p. 485-504, 2010.

SCHMIDT, O.; THEOPOLD, U.; BECKAGE, N. E. Insect and vertebrate immunity: key similarities versus differences. In: BECKAGE, N.E. (Ed.). **Insect immunology**. Academic Press, San Diego, 2008. p. 1-23

SCHOLEFIELD, J.A. **Baculovirus infection, host immunity and pathogen competition in the cabbage looper, *Trichoplusia ni***. 2015. 121 f. Thesis (Master of Pest Management) – Simon Fraser University, Burnaby, Canada, 2015.

SCHULENBURG, H.; KURTZ, J.; MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. Introduction. Ecological immunology. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 3-14, 2009.

SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology**, v. 2014, 12 p., 2014.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p.591-611. 1965.

SHIKANO, I.; ERICSSON, J.D.; CORY, J.S.; MYERS, J.H. Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. **Basic and Applied Ecology**, v. 11, p. 15–22, 2010.

SHIKANO, I.; OAK, M.C.; HALPERT-SCANDERBEG, O.; CORY, J.S. Trade-offs between transgenerational transfer of nutritional stress tolerance and immune priming. **Functional Ecology**, v. 29, p. 1156-1164, 2015.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica**. São Paulo: Mc-GrawHill. 1975. 350p.

SILVA, G.V.; BUENO, A.F.; BORTOLOTTI, O.C.; SANTOS, A.C.dos; POMARI-FERNANDES, A. Biological characteristics of black armyworm *Spodoptera cosmioides* on genetically modified soybean and corn crops that express insecticide *Cry* proteins. **Revista Brasileira de Entomologia**, xxx, 2016. 5 p.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA-NOVA, N.A. **Manual de ecologia dos insetos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1976. 419 p.

SMILANICH, A.M.; DYER, L.A.; GENTRY, G.L. The insect immune response and other putative defenses as effective predictors of parasitism. **Ecology**, v. 90, n. 6, p. 1434-1440, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D.R. **Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. Disponível em:
<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/444633>>. Acesso em: 06 jan. 2016.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M. de H. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, 2003.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORSO, I.C.; OLIVEIRA, L.J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A.R.; BUENO, A.F.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n. 269).

SOSA-GÓMEZ, D.R.; LÓPEZ LASTRA, C.; HUMBER, R.A. An overview of arthropod-associated fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**, v. 170, p. 61-76, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; GAZZONI, D.L.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. Pragas da soja e seu controle. In: ARANTES, N.P.; SOUZA, P.I.M. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 299-331.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F.; SANTOS, B.; ALVES, L.F.A.; ALVES, S.B. Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. São Paulo: FAELQ, 2008. p.49-68.

SPECHT, A.; GUEDES, J.V.C.; SULZBACH, F.; VOGT, T.G. Ocorrência de *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, n. 35, v. 5, p. 705-706, 2006.

SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S.V.de; SOSA-GÓMEZ, D.R. Host plants of *Chrysodeixis includes* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 343-345, 2015.

SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PAULA-MORAES, S.V. de; YANO, S.A.G. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 689-692, 2013.

STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. In: BECKAGE, N.E. (Ed.). **Insect immunology**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 25-47.

TRAUER, U.; HILKER, M. Parental legacy in insects: variation of transgenerational immune priming during offspring development. **Plos One**, v. 8, n. 5, 2013.

TUKEY, J.W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, v. 5, p. 232-242, 1949.

United States Environmental Protection Agency - U.S. EPA. **Biopesticide registration action document: *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein and the genetic material (Vector PV-GMIR9) necessary for its production in MON 87701 (OECD Unique Identifier: MON 87701-2) soybean (PC Code 006532)**. U.S. Environmental Protection Agency: Office of Pesticide Programs, . 2010. Disponível em: <http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt-cry1ac-protien.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2015

VALICENTE, F.H. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 18, n. 1, 1989.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavél, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 2, 1999.

VALICENTE, F.H.; CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 1991. 23 p. (Embrapa/CNPMS. Circular Técnica, 15).

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.deS. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovirus. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 114).

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the brush-border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1378-1385, 1990.

VÁSQUEZ, J.; ZEDDAM, J.L.; TRESIERRA, A.A. Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera; Noctuidae) con el baculovirus SfMNPV, en Iquitos-Peru. **Folia Amazónica**, v. 13, p. 1-2, 2002.

VIANA, P.A.; COSTA, Ê.F. Controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho com inseticidas aplicados via irrigação por aspersão. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 3, 1998.

VILMOS, P; KURUCZ E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology Letters**, v. 62, p. 59-66, 1998.

WILSON, K.; THOMAS, M.B.; BLANFORD, S.; DOGGETT, M.; SIMPSON, S.J.; MOORE, S.L. Coping with crowds: density-dependent disease resistance in desert locusts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 5471–5475, 2002.

WISEMAN, B.R. Cumulative effects of antibiosis on five biological parameters of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, v. 82, n. 2, p. 277-283, 1999.

WISEMAN, B.R.; DAVIS, F.M.; WILLIAMS, W.P.; WIDSTROM, N.W. Resistance of a maize population, FAWCC(C5), to fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 79, n.3, p. 329-336, 1996.

YANO, S.A.C. **Análise de risco para manejo da resistência a toxina Cry1Ac e inseticidas convencionais e estudos de diversidade genética de *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**. 2012. 84 f. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ZANCHI, C.; TROUSSARD, J.P.; MOREAU, J.; MORET, Y. Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 279, p. 3223–3230, 2012.