

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

FELIPE GRISARD PENTEADO

AVALIAÇÃO DE ANTICONTAMINANTES DA DIETA ARTIFICIAL DE *Anticarsia
gemmatalis* HÜBNER, 1818 E SUA INTERAÇÃO COM BIOENSAIOS DE
QUANTIFICAÇÃO DE Cry1Ac EM FOLÍOLOS DE SOJA

PONTA GROSSA
2019

FELIPE GRISARD PENTEADO

AVALIAÇÃO DE ANTICONTAMINANTES DA DIETA ARTIFICIAL DE *Anticarsia
gemmatalis* HÜBNER, 1818 E SUA INTERAÇÃO COM BIOENSAIOS DE
QUANTIFICAÇÃO DE Cry1Ac EM FOLÍOLOS DE SOJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, com Área de Concentração em Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

PONTA GROSSA
2019

P419 Penteado, Felipe Grisard
Avaliação de anticontaminantes da dieta artificial de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 e sua interação com bioensaios de quantificação de Cry1Ac em folíolos de soja/ Felipe Grisard Penteado. Ponta Grossa, 2019.
96 f., il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração – Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

1. Extrato de folhas. 2. CL₅₀. 3. Formol. 4. Solução antifúngica. 5. Indicador biológico. I. Sosa-Gómez, Daniel Ricardo. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa - Mestrado em Agronomia. III. T.

CDD : 632.9

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia F. Bertholino dos Santos– CRB9/986



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: **"AVALIAÇÃO DE ANTICONTAMINANTES DA DIETA ARTIFICIAL DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) E SUA INTERAÇÃO COM BIOENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE Cry1Ac EM FOLÍOLOS DE SOJA".**

Nome: Felipe Grisard Penteado

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Profª Drª Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas Boas

Prof. Dr. Adalci Leite Torres

Data da Realização: 28 de Fevereiro de 2019.

A toda minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela companhia e proteção durante todos os momentos da minha vida, por ser a força que brota nos momentos de fraqueza e por ser a luz nos momentos de escuridão.

A toda minha família, em especial aos meus pais, minha namorada, meu irmão e minha cunhada, pelo amor e carinho sempre proporcionados, que foram e são o combustível para seguir em frente. Tudo isso só foi possível graças a vocês.

Ao Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, pela dedicação e empenho durante a orientação do meu mestrado, auxiliando-me em todas as atividades realizadas e no desenvolvimento desta dissertação.

À Dr.^a Ivani de Oliveira Negrão Lopes e à Dr.^a Maria Cristina Neves de Oliveira, pela contribuição com as análises estatísticas deste trabalho realizadas com excelência.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja - Embrapa Soja, pelo fornecimento da estrutura e material necessários para a realização dos meus estudos.

À Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de estudos durante o meu mestrado.

A todos os funcionários, pós-graduandos e estagiários da Embrapa Soja, pelo auxílio na condução dos meus projetos de pesquisa.

À Ivanilda Soldorio, também conhecida como “amigona”, pela motivação e amizade durante meu período de Embrapa e por todo o auxílio na criação de insetos.

À Dr.^a Tatiana de Almeida Hoffmann Lustosa Mendes, pela correção gramatical desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UEPG, pela oportunidade da realização deste mestrado e pelo crescimento proporcionado na minha formação profissional.

A todos que participaram da minha formação profissional, direta ou indiretamente, pelo esforço, dedicação, paciência e compreensão.

“Tu, que habitas sob a proteção do Altíssimo, que moras à sombra do Onipotente, dize ao Senhor: “Sois meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em que eu confio.” É Ele quem te livrará do laço do caçador e da peste perniciosa. Ele te cobrirá com as suas plumas; sob suas asas encontrarás refúgio. Sua fidelidade te será um escudo de proteção. Tu não temerás os terrores noturnos, nem a flecha que voa a luz do dia, nem a peste que se propaga nas trevas, nem o mal que grassa ao meio-dia. Caiam mil homens à tua esquerda e dez mil à tua direita: tu não serás atingido...”

(SALMO 90)

RESUMO

Os estudos entomológicos atuais demandam de uma grande quantidade de insetos para serem executados. O fornecimento desse material é realizado através de criações massais em laboratório, que permitem a obtenção de insetos constantemente, não dependendo da sazonalidade, além de possuírem alta qualidade. A alimentação desses artrópodes em criação normalmente é realizada com dieta artificial, cujas características devem permitir um desenvolvimento normal do inseto, livre de patógenos, e para que isso ocorra, anticontaminantes em concentrações adequadas são adicionados à dieta. Além de serem utilizadas em criação massal, as dietas também servem como veículos de substâncias em bioensaios e, com isso, seus componentes não devem impactar nos seus resultados. A partir do exposto, no primeiro capítulo deste trabalho serão estudadas concentrações de anticontaminantes para criação de *Anticarsia gemmatilis* e seus impactos em bioensaios de mortalidade do mesmo inseto. A partir dos resultados do primeiro capítulo, uma dieta foi selecionada para a realização de bioensaios com objetivo de quantificar a proteína Cry1Ac em folíolos de soja Bt, tema do segundo capítulo. Tais estudos são importantes para o manejo correto da resistência, que atualmente se baseia na adoção de alta dose/ refúgio, ou seja, alta expressão de proteínas inseticidas pelas plantas associada ao uso de refúgio, e por isso conhecer a capacidade de expressão de cada cultivar é importante.

Palavras-chave: extratos de folhas; CL₅₀; formol; solução antifúngica; indicador biológico.

ABSTRACT

Current entomological studies require a large number of insects to be executed. The supply of this material is carried out through mass creations in the laboratory, which allow the obtaining of insects constantly, not depending on the seasonality, and with high quality. Feeding of these arthropods is usually done with an artificial diet, whose characteristics should allow a normal development of the insect, free of pathogens, and to this happening, anticontaminants in suitable concentrations are added to the diet. In addition to being used in mass production, diets also serve as substances carriers in bioassays and, therefore, their components should not impact their results. From the above, in the first chapter of this work will be studied concentrations of anticontaminants to rear *Anticarsia gemmatalis* and their impacts on bioassays of mortality of the same insect. From the results of the first chapter, a diet was selected to perform bioassays, whose objective was quantifying the Cry1Ac protein in Bt soybean leaflets, the theme of the second chapter. Such studies are important for the correct management of resistance, which is currently based on the adoption of high dose / refuge, that is high expression of insecticidal proteins by plants associated with refuge, and therefore know the expression capacity of each cultivar is important.

Key words: leaf extract; LC₅₀; formalin; antifungal solution; biological indicator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Copos plásticos de 50 ml contendo dieta artificial, inoculada com uma lagarta neonata de <i>Anticarsia gemmatalis</i> e vedada com tampa de papelão associada a um pedaço de papel higiênico	27
Figura 1.2 -	Esquema de montagem das gaiolas de PVC utilizadas para manutenção de adultos de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	29
Figura 1.3 -	Bandejas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ) utilizadas para realização dos bioensaios com extratos de folha e proteína Cry1Ac	31
Figura 1.4 -	Comparação das médias obtidas para período larval ($\pm$ EPM) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de formol e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	36
Figura 1.5 -	Peso médio de pupa ($\pm$ EPM) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de formol e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	40
Figura 1.6 -	Comparação das médias obtidas para período pupal ($\pm$ EPM) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de formol e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	42
Figura 1.7 -	Viabilidade larval ao longo tempo de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dieta contendo $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol e $2,78 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de SAF. Eventos: • - morte da lagarta, o – inseto atingiu fase de pupa.....	48
Figura 1.8 -	Viabilidade larval ao longo tempo de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas contendo (a) $1,1 \mu\text{l.ml}^{-1}$ e (b) $2,18 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol, ambas contendo $2,78 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de SAF. Eventos: • - morte da lagarta, o – inseto atingiu fase de pupa	49
Figura 1.9 -	Curvas de mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> inferidas pelo modelo Log- Logistic através da mortalidade obtida em bioensaios conduzidos com extratos de folha Bt em diferentes diluições e realizados em dietas artificiais contendo diferentes quantidade de anticontaminantes	51
Figura 1.10-	Curvas de mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> inferidas pelo modelo Log- Logistic através da mortalidade obtida em bioensaios conduzidos com proteína Cry1Ac em diferentes concentrações e realizados em dietas artificiais contendo diferentes quantidade de anticontaminantes	52

Figura 2.1 -	Curvas de mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> para proteínas Cry1Ac espalhada em superfície de dieta artificial	78
Figura 2.2 -	Curvas de mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em função da concentração de tecido foliar de soja Bt coletado em diferentes períodos do ciclo da cultura e aplicados na forma de extrato em superfície de dieta artificial. (a) 32 DAP; (b) 43 DAP; (c) 62 DAP; (d) 81 DAP; (e) 102 DAP; (f) 123 DAP	80
Figura 2.3 -	CL ₅₀ de <i>Anticarsia gemmatalis</i> para extratos de folhas BT coletadas em diferentes períodos da cultura, espalhados em superfície de dieta artificial, e Intervalos de Confiança (IC, P = 95%) superiores e inferiores para os valores obtidos	81
Figura 2.4 -	Concentração de proteínas Cry1Ac (IC 95%) em folhas de soja BRS 1010 IPRO em diferentes períodos de desenvolvimento da cultura. Comparação entre resultados obtidos com a transformação de dados a partir dos dois bioensaios com padrão de Cry1Ac	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Comparação da quantidade de ingredientes entre a dieta artificial Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) e sua adaptação conforme criação da Embrapa Soja	26
Tabela 1.2 -	Concentrações de formol e solução antifúngica (SAF) empregados em dieta artificial para estudo da biologia de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	27
Tabela 1.3 -	Ingredientes (marca e teor mínimo) utilizados para o preparo de 10 ml de solução antifúngica (SAF), adaptado de Roeder et al. (2010).....	28
Tabela 1.4 -	Concentrações utilizadas para estudo de mortalidade e cálculo da CL ₅₀ para proteína Cry1Ac e folhas de soja Bt em <i>Anticarsia gemmatalis</i>	32
Tabela 1.5 -	Estatística descritiva e testes de pressuposições da análise de variância para os parâmetros biológicos estudados	34
Tabela 1.6 -	Análise de variância da variável período larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	35
Tabela 1.7 -	Comparação de médias de período larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	37
Tabela 1.8 -	Comparação entre médias de período larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> na interação entre concentrações de formol e SAF incorporados em dieta artificial e lagartas criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	37
Tabela 1.9 -	Análise de variância da variável peso de pupa de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	39
Tabela 1.10 -	Comparação de médias de peso pupal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	40
Tabela 1.11 -	Análise de variância da variável período pupal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes	

	concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	41
Tabela 1.12 -	Comparação de médias de período pupal de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	42
Tabela 1.13 -	Análise de variância da variável longevidade de adultos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	44
Tabela 1.14 -	Comparação de médias de longevidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	44
Tabela 1.15 -	Comparação das médias obtidas para período larval, período pupal e peso de pupa de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	46
Tabela 1.16 -	Comparação de médias do número de ovos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D)	47
Tabela 1.17 -	Efeito de dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes em bioensaios com extratos de folha. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL ₅₀ ; CL ₅₀ = concentração letal para 50% dos indivíduos; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL50}$ = erro padrão da estimativa da CL ₅₀ ; IC = intervalo de confiança para CL ₅₀	50
Tabela 1.18 -	Efeito de dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes em bioensaios com proteína Cry1Ac. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL ₅₀ ; CL ₅₀ = concentração letal para 50% dos indivíduos; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL50}$ = erro padrão da estimativa da CL ₅₀ ; IC = intervalo de confiança para CL ₅₀	51
Tabela 2.1 -	Suscetibilidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , proveniente de criação massal da Embrapa Soja, à proteína Cry1Ac proveniente do padrão MVP II com 11,2% de concentração. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL ₅₀ ; CL ₅₀ = concentração letal para 50% dos indivíduos; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da	

estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL50}$ = erro padrão da estimativa da CL_{50} ; IC = intervalo de confiança para CL_{50} 79

Tabela 2.2 - Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* a extratos de folíolos de soja Bt coletados em diferentes períodos do ciclo da soja. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL_{50} ; CL_{50} = concentração letal para 50% dos indivíduos expressa em μg de folha. $\mu\text{l}^{-1}.\text{cm}^{-2}$; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL50}$ = erro padrão da estimativa da CL_{50} ; IC = intervalo de confiança para CL_{50} 79

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Impacto de anticontaminantes na biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) e em resultados de bioensaios

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Importância, definição e uso de dietas artificiais na criação de insetos	20
3.2 Contaminação microbiana de dietas artificiais e seus efeitos	22
3.3 Anticontaminantes de dietas artificiais	23
3.4 Relação entre anticontaminantes e bioensaios	25
3.5 Criação e parâmetros biológicos de <i>A. gemmatalis</i>	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Biologia de <i>A. gemmatalis</i>	28
4.1.1 Metodologia estatística para parâmetros biológicos	32
4.2 Impacto de anticontaminantes em resultados e bioensaios	32
4.2.1 Ensaio com padrão de proteína Cry1Ac	33
4.2.2 Ensaio com extratos de folíolos de soja Bt	33
4.2.3 Metodologia estatística para comparação de bioensaios	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Análise exploratória para as variáveis estudadas	36
5.2 Período larval	36
5.3 Peso de pupa	41
5.4 Período pupal	43
5.5 Longevidade de adultos	45
5.6 Comparação de parâmetros biológicos entre dietas testadas.....	47
5.7 Fecundidade de fêmeas.....	48
5.8 Análise da viabilidade larval	49
5.9 Concentrações de anticontaminantes em resultados de bioensaios.....	52
6 CONCLUSÕES	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS.....	58

CAPÍTULO 2 - *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) como indicador biológico da expressão de proteína Cry1Ac em folíolos de soja

RESUMO	64
ABSTRACT	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 OBJETIVOS	68
2.1 Objetivo geral	68
2.2 Objetivos específicos	68
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	69
3.1 Organismos geneticamente modificados	69
3.2 Plantas “Bt”	69
3.3 Bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i>	70
3.3.1 Proteínas produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	71
3.3.2 Proteínas Cry.....	71
3.4 Soja Bt no controle de lepidópteros	72
3.5 Alta dose/ refúgio para manejo de resistência	73
3.6 Quantificação de proteínas Cry em tecido vegetal	74
3.7 Estresses abióticos na expressão de proteínas Cry em plantas Bt.....	75
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.1 Bioensaios.....	77
4.2 Metodologia estatística.....	78
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 Bioensaios com Cry1Ac	80
5.2 Bioensaios com extratos de folhas de soja Bt.....	81
5.3 Quantificação de proteína Cry1Ac	84
5.4 Discussão.....	85
6 CONCLUSÕES	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO 1

Impacto de anticontaminantes na biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) e em resultados de bioensaios

RESUMO

A adoção de dietas artificiais para a criação de insetos em laboratório e em bioensaios é uma prática comum. Determinados ingredientes, classificados como anticontaminantes, são adicionados à dieta com o intuito de impedir o desenvolvimento de agentes microbianos, como fungos e bactérias, os quais podem prejudicar o desenvolvimento normal do inseto e a qualidade de bioensaios. Contudo, existe um limite adequado para o acréscimo de anticontaminantes em dieta artificial, o qual deve promover controle adequado de microrganismos patogênicos, não prejudicar o desenvolvimento normal do inseto e não influenciar os resultados de bioensaios. Para garantir que esses requisitos sejam preenchidos, estudos devem ser realizados para se conhecer o limite ideal de cada anticontaminante para cada espécie de inseto. Por isso, o objetivo deste trabalho foi verificar o impacto de formol e de solução antifúngica (SAF) na biologia de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações desses anticontaminantes, e também verificar o impacto dessas diferentes concentrações em resultados de bioensaios. O delineamento adotado para estudo da biologia foi fatorial com tratamento adicional (dieta modificada sem SAF). Os insetos foram mantidos em condições controladas e foram avaliados, o período larval, peso de pupa, período pupal, longevidade de adulto, fecundidade de fêmeas e porcentagem de dietas contaminadas. Além disso foi realizada análise da viabilidade larval. Realizaram-se análises de variância, para comparação de médias em todas as variáveis. A partir dos resultados encontrados para biologia de *A. gemmatalis*, duas dietas foram selecionadas para verificação do impacto da concentração de anticontaminantes em bioensaios. Bioensaios de mortalidade de *A. gemmatalis* foram realizados em ambas as dietas, utilizando-se proteína Cry1Ac e extratos de folha de soja Bt. Para observar a diferença entre as dietas, as curvas de mortalidade e as CL₅₀, obtidas pelo modelo Log-Logistic em ambiente R, foram comparadas. O uso de concentração 4,38 µl.ml⁻¹ de formol em dieta artificial provocou retardamento dos períodos larval e pupal e redução no peso de pupa e redução das CL₅₀ nos bioensaios. A longevidade de adultos e o número de ovos não foram afetados pelas concentrações de anticontaminantes estudadas. Concluiu-se que é recomendável o uso de concentrações 1,1 µl.ml⁻¹ de formol e 1,4 µl.ml⁻¹ de SAF para criação de *A. gemmatalis* e para realização de bioensaios com toxinas.

Palavras-chave: formol, solução antifúngica, extrato de folha, proteína Cry1Ac, CL₅₀.

CHAPTER 1

Impact of anti-contaminants on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) and on bioassay results

ABSTRACT

The adoption of artificial diets for insect rearing in laboratory and bioassays is a common practice. Certain ingredients classified as anti-contaminants are added to the diet in order to prevent the development of microbial agents, such as fungi and bacteria, which may impair the normal development of the insect and the quality of bioassays. However, there is an adequate limit for the increase of anti-contaminants in artificial diet, which should: promote adequate control of pathogenic microorganisms, not impair the normal development of the insect and not influence the results of bioassays. To assure that these requirements are met, studies must be carried out to determine the ideal limit of each anti-contaminant for each species of insect. Therefore, the objective of this work is to verify the impact of formalin and antifungal solution (AS) on the biology of *Anticarsia gemmatalis* fed with artificial diets containing different concentrations of these anti-contaminants, as well as to verify the impact of these different concentrations on bioassays results. The design of biology study was factorial with additional treatment (modified diet without AS). The insects were kept under controlled conditions and were evaluated, larval period, pupal weight, pupal period, adult longevity, female fecundity and percentage of contaminated diets. In addition, larval viability analysis was performed. Analysis of variance was performed to compare means in all variables. Based on biology of *A. gemmatalis* studies, two diets were selected to verify the impact of the concentration of anti-contaminants in bioassays. Mortality bioassays of *A. gemmatalis* were carried out in both diets, using Cry1Ac protein and Bt soybean leaf extracts. In order to observe the difference between the diets, the mortality curves and LC₅₀, obtained by Log-Logistic model in environment R, were compared. The use of a formalin concentration of 4.38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ in artificial diets resulted in delayed larval and pupal periods, reduction in pupal weight and in LC₅₀ of bioassays. Adults longevity and egg numbers were not affected by the concentrations of anti-contaminants studied. It is recommended the concentrations 1.1 and 1.4 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ of formalin and AS, respectively, on artificial diet to perform bioassays with toxins and *A. gemmatalis* rearing.

Key words: formalin, antifungal solution, leaf extract, Cry1Ac protein, LC₅₀.

1 INTRODUÇÃO

Durante todo o seu ciclo, a soja está sujeita a ataques de insetos e ácaros (HOFFMANN-CAMPO; CORRÊA-FERREIRA; MOSCARDI, 2012). A fase vegetativa e reprodutiva da cultura é principalmente afetada por insetos desfolhadores, e dentre eles destaca-se o grupo das lagartas (principalmente Noctuídeos). A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), por sua abundância e vasta abrangência, atingindo todas as regiões do país onde se cultiva a soja, é considerada uma importante praga da cultura (MOSCARDI et al., 2012).

Grande parte dos estudos entomológicos envolvendo *A. gemmatalis* são realizados com material proveniente de criação massal em laboratório. Esse erebídeo normalmente é criado em dieta artificial, como a proposta por Greene; Leppla e Dickerson (1976). As dietas artificiais contêm ingredientes com intuito de nutrir o inseto e proporcionar consistência adequada, além daqueles com ação antimicrobiana, cujo objetivo é garantir a sua qualidade impedindo o desenvolvimento de patógenos. Porém, mesmo com a administração de diversos agentes antimicrobianos, nem sempre é possível mantê-la livre de microrganismos. Os casos mais comuns de contaminação são a presença de fungos e bactérias, os quais diminuem sua qualidade e afetam a biologia do inseto criado. A presença desses antimicrobianos pode auxiliar na manutenção da qualidade do alimento contudo, deve-se levar em consideração o impacto no desenvolvimento do inseto.

Exemplo comum de agente antimicrobiano, encontrado na dieta citada acima, é o formaldeído (metanal), ou também conhecido na sua forma diluída por formol, um germicida eficaz e, portanto, muito utilizado na desinfecção em laboratórios. Devido a sua reduzida seletividade, esse produto é extremamente tóxico para o ser humano (ROMANO; QUELHAS, 2019), podendo ser tóxico também para insetos (ROEDER et al., 2010). Por esse motivo, Roeder et al. (2010) estudaram um novo agente antimicrobiano à base de ácidos que eles denominaram de “*Diet Antimicrobial Agent (DAA)*”. Este produto demonstrou-se eficiente na redução fúngica e apresentou bom potencial no aumento da qualidade de dietas artificiais e do inseto criado [*Chloridea virescens* (F.)]. Porém, os anticontaminantes devem ser cuidadosamente avaliados em cada espécie, de modo a possibilitar a compreensão do seu impacto na biologia e qualidade do inseto, já que ele deve não apenas ser efetivo na supressão do fungo,

mas também deve ser seguro para o inseto criado (ALVERSON; COHEN, 2002). Com essa finalidade foram estudados o impacto do DAA e sua interação com formaldeído sobre parâmetros biológicos de *A. gemmatalis*, com o intuito de reduzir o uso do formaldeído na dieta, devido a sua toxicidade. Verificaram-se também, os efeitos que tais anticontaminantes causam nos resultados de bioensaios realizados com *A. gemmatalis*, uma vez que sua interação com os produtos testados pode interferir no desenvolvimento do inseto o que prejudicaria os resultados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das interações dos anticontaminantes em parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* e em resultados de bioensaios, quando incorporados em dieta artificial.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar período larval, período pupal, peso de pupa, mortalidade até fase de pupa e fecundidade de lagartas alimentadas com concentrações variáveis de anticontaminantes.
- Avaliar os níveis de contaminação fúngica na dieta artificial.
- Avaliar alterações de resultados de bioensaios com Cry1Ac provocados por mudanças nos anticontaminantes de dieta artificial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância, definição e uso de dietas artificiais na criação de insetos

A criação de insetos em laboratório é de fundamental importância para a solução de problemas na área entomológica, cujos estudos dependem da disponibilidade contínua de insetos, evitando-se a dependência de sua ocorrência natural, como de pragas agrícolas, por exemplo (PARRA, 2012).

Colônias de insetos herbívoros são comumente criadas em dieta artificial com objetivo de reduzir o trabalho, tempo, espaço e custo associado ao crescimento de suas plantas hospedeiras. Essas dietas também simplificam a sincronia entre inseto e disponibilidade de alimento, além da possibilidade de aumentar a aptidão do artrópode quando comparado ao alimento natural (HERVET; LAIRD; FLOATE, 2016; MCMORRAN, 1965). A criação de insetos em dietas artificiais tem diversas finalidades, como por exemplo, agentes de controle (KNIPLING, 1979), biorreatores para produção de produtos farmacêuticos, como proteínas, bioinseticidas à base de vírus (TARGOVNIK et al., 2016), e alimento para as pessoas (DEFOLIART, 1999; EILENBERG et al., 2015). Um dos usos mais importantes consiste na pesquisa entomológica e áreas das ciências biológicas (COHEN, 2015).

Tudo o que o inseto ingere para satisfazer suas necessidades fisiológicas é definido por “dieta”. Adota-se o conceito de “natural” para o grupo de hospedeiros cujo inseto está normalmente associado, ou seja, hospedeiros que o inseto se alimenta quando presente na natureza (PARRA, 2012). O termo “artificial” é dado para qualquer dieta que não é o alimento natural, fornecido pelo homem na tentativa de substituí-lo por aqueles mais acessíveis ou mais convenientes do ponto de vista técnico e econômico (PARRA, 2012; VANDERZANT, 1966). Por tanto, o nome “dieta artificial” abrange os vários termos adotados na literatura para dietas de insetos sintetizada pelo homem, tais como: sintético, quimicamente definido, purificado, entre outros (VANDERZANT, 1974).

Estudos relacionados à nutrição de insetos e seus hábitos alimentares ocorrem desde o início do século passado, mas o grande avanço iniciou com os estudos de G. Fraenkel, da Universidade de Illinois, em sua pesquisa com pragas de produtos armazenados após a década de 40, e esse avanço persistiu nas décadas de 60, 70 e 80, principalmente em países desenvolvidos, (PARRA, 2012). É evidente que

a alta qualidade do inseto produzido é essencial para a garantia de estudos confiáveis, e a qualidade das dietas é, por sua vez, essencial para a disponibilização de insetos saudáveis (COHEN, 2015).

Uma dieta artificial, corretamente formulada, tem propriedades físicas e contém produtos químicos que estimulam e mantêm a alimentação do inseto, além de conter os nutrientes (essenciais e não essenciais) em proporções equilibradas para promover ótimo crescimento e desenvolvimento, sempre na ausência de microrganismos contaminantes (PARRA, 2012). Atributos físicos, por exemplo, dureza, pilosidade superficial e forma, influenciam a capacidade do inseto de consumir e digerir a dieta, bem como a presença de compostos aleloquímicos e nutricionais (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012).

Uma dieta artificial, para que seja considerada adequada à criação de insetos, deve resultar alta viabilidade larval, com a qual esse período juvenil seja similar ao encontrado na natureza. Além disso, deve permitir a obtenção de adultos com alta capacidade reprodutiva, ter uma viabilidade total superior a 75%, manter a qualidade por várias gerações, possuir componentes de custo reduzido e permitir a criação de mais de uma espécie e se possível de ordens diferentes (PARRA, 2012; RIBEIRO, 2017).

O conteúdo de água em dietas artificiais pode classificá-las em classes, além de ser indicativo para problemas com contaminação. Dietas em pó ou fragmentos são de fácil confecção e dificilmente apresentam contaminantes, diferentemente de dietas semilíquidas e líquidas que apresentam maiores dificuldades na sua obtenção, as quais são destinadas para insetos fitófagos mastigadores e sugadores, em que medidas adequadas devem ser tomadas para evitar a contaminação imediata. Enfim, quanto maior o conteúdo de água, maiores os problemas com contaminação (PARRA, 2012).

Embora diversos casos atestem o valor da tecnologia da dieta artificial, muitos problemas persistem nos programas existentes. A maioria das barreiras ao sucesso necessário deve-se à falta de um conhecimento profundo sobre as complexidades das dietas, tanto por parte daqueles que as desenvolvem, como daqueles que as utilizam (COHEN, 2015).

3.2 Contaminação microbiana de dietas artificiais e seus efeitos

As condições de criação massal de insetos também proveem condições ideais para o desenvolvimento de fungos; por esse motivo aditivos antifúngicos são adicionados à dieta para reduzir sua proliferação (ALVERSON; COHEN, 2002; SINGH; HOUSE, 1970). Os efeitos no inseto causados pela contaminação microbiana da dieta podem ser influenciados pela espécie do patógeno, o estágio e idade do inseto no momento da contaminação, o teor de água, a temperatura, o pH do meio, entre outros fatores (PARRA, 2012; SIKOROWSKI; LAWRENCE, 1994). As espécies de contaminantes e sua habilidade de colonizar a dieta promovem mudanças bioquímicas que alteram o valor nutricional das dietas, e consequentemente, o vigor do inseto criado, principalmente em estádios imaturos do seu desenvolvimento. Além disso, bactérias e fungos podem produzir toxinas prejudiciais ao inseto ou podem desempenhar um papel como estressor alimentar (SIKOROWSKI; LAWRENCE, 1994).

Importantes fontes de contaminação, o ser humano e o ar contribuem para contaminação de dietas artificiais. O homem age como veículo transmissor de patógenos, enquanto que o ar contaminado pode ser considerado um aerossol microbiano, com partículas suspensas que contêm microrganismos (SIKOROWSKI; LAWRENCE, 1994).

Os gêneros de fungos contaminantes mais comuns de culturas de insetos são *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* sp. e leveduras (LUDEMANN; FUNKE; GOODPASTURE, 1979; SHAPIRO, 1984; SIKOROWSKI; LAWRENCE, 1994). Microrganismos oportunistas são saprófitos capazes de se multiplicar rapidamente na dieta ou infectar o inseto estressado e causar doenças frequentemente severas ou fatais (SIKOROWSKI; LAWRENCE, 1994). Casos na literatura demonstram que a presença de microrganismos na dieta interfere no desenvolvimento larval, podendo levar à morte da larva ou impedi-la de atingir a fase de pupa (HENSLEY; HAMMOND, 1968; KISHABA et al., 1968; OUYE, 1962; SINGH; BUCHER, 1971).

Sikorowski e Thompson (1984) demonstraram que dieta de *C. virescens* pode fornecer um meio de crescimento favorável para diferentes microrganismos, e esses podem ter efeito variado no desenvolvimento larval, peso de pupas, na emergência de adultos e na eclosão de ovos. Quando *C. virescens* foi alimentada com dieta contendo *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* houve

diminuição no número de pupas, no peso de pupa e menor fecundidade de fêmeas. A contaminação por *Bacillus subtilis* também diminuiu a emergência de adultos em mais de 50%. Em outro exemplo, *A. niger* ocorreu principalmente no final do período larval de *Cydia pomonella* (Linnaeus), em que as larvas evitavam a parte contaminada da dieta e morriam de fome, ou então, caminhavam sobre a superfície esporulada e ficavam cobertas por esporos, o que também causou mortalidade (HOWELL, 1971), fato também observado por Singh e Bucher (1971). A contaminação fúngica aumentou de um ano para o outro e reduziu em quase 50% o rendimento da colônia (HOWELL, 1971).

A prevenção da ocorrência de contaminantes e toxicidade de antimicrobianos é considerada vital nos programas de criação de insetos, porque ambos os fatores podem impedir o desenvolvimento normal de insetos (LUDEMANN; FUNKE; GOODPASTURE, 1979).

3.3 Anticontaminantes de dietas artificiais

O uso de agentes antimicrobianos em dietas artificiais para criação massiva de insetos é comumente empregado para prevenir a proliferação de microrganismos, impedindo a contaminação do alimento e do espaço de criação do inseto (ALVERSON; COHEN, 2002; BACCA; BENAVIDES, 2014). A adição desses químicos é realizada para controlar leveduras, fungos, bactéria, vírus e protozoários. Se esses microrganismos não forem eliminados pode ocorrer perda de populações laboratoriais, porque sua dispersão é facilitada nas instalações de criação massal (PARRA, 2012).

Ao usar químicos para controlar a degradação da dieta, existe uma linha dividindo a toxicidade aos microrganismos alvos e aos insetos que são protegidos. Muitas vezes esses químicos são adicionados às dietas baseados mais frequentemente em receitas tradicionais do que na avaliação do efeito aditivo sobre a saúde do inseto ou eficácia no controle microbiano (ALVERSON; COHEN, 2002).

Levantamento realizado por Singh e House (1970) reportou que o controle microbiano de dietas artificiais para mais de 50 espécies de insetos é realizado com ácido sórbico e seus sais em 42 casos, com metil-parahidroxibenzoato em 58 casos, formaldeído em 18 casos, clortetraciclina em 19 e benzoato de sódio em 6 casos.

Dunkel e Read (1991) apontam que dos anticontaminantes citados anteriormente, a maior parte das pesquisas relacionadas à toxicidade está vinculada ao ácido sórbico, e que, em muitos deles, nenhuma medida dos efeitos prejudiciais foi feita.

Singh e House (1970) testaram 21 compostos antimicrobianos na espécie *Agri affinis* (Diptera: Sarcophagidae) com intuito de detectar níveis seguros de suas concentrações, e observaram que cada composto exerce efeitos prejudiciais de acordo com a concentração utilizada, como prolongamento do período larval, aumento da mortalidade nas fases larval e pupal e inibição do desenvolvimento.

Atualmente, uma série de anticontaminantes é utilizada na confecção de dietas artificiais, como: o formaldeído, metil-parahidroxibenzoato (Nipagin), butil e propil-parahidroxibenzoato, hipoclorito de sódio, ácido propiônico, benzoato de sódio, ácido benzóico, sorbato de potássio, ácido sórbico, estreptomicina, penicilina e aureomicina (PARRA, 2012; BACCA; BENAVIDES, 2014).

Bacca e Benavides (2014) observaram redução da contaminação fúngica de 46,66% para 3,33% quando adicionado formol à dieta artificial. O formol está entre os antimicrobianos mais utilizados, porém, essa substância pode ocasionar diversos problemas à saúde humana, como irritações no trato respiratório, queimaduras de mucosas, tosse, ulcerações, irritações na pele, além de ser um produto cancerígeno (EDUARDO et al., 2015; QUÍMICA CREDIE, 2012). Por isso, é importante a substituição do formol por outros componentes com mesma finalidade, todavia menos tóxicos para o ser humano (EDUARDO et al., 2015).

Ácidos orgânicos têm sido utilizados durante décadas na conservação de alimentos, protegendo-os da ação microbiana e fúngica, além de serem usados como aditivo antimicrobiano para alimentação animal por longos períodos. Como exemplo, o ácido propanoico já apresenta estudos com relação ao seu efeito antimicrobiano na produção de alimento animal, além de suas características como promotor de crescimento e saúde. O ácido propanoico inibe o crescimento de fungos e algumas bactérias; com isso, seu maior uso é na conservação de alimento animal. Em alguns países, ele apresenta registro para o controle de fungos e bactérias em grãos armazenados (HAQUE et al., 2009).

O ácido benzoico é um ácido aromático monobásico, moderadamente forte, pó cristalino branco, muito solúvel em álcool, éter e benzeno, mas pouco solúvel em

água. A qualidade desse ácido está no retardamento da multiplicação de vários grupos de microrganismos que, no entanto, não são mortos por esse produto (JORGE, 2003). Esse ácido carboxílico aromático é encontrado na natureza na forma pura ou combinada com outras substâncias (OLIVEIRA; REIS, 2017). Um dos seus principais usos como anticontaminante está na indústria alimentícia como conservante de alimentos (DING, 2017).

O ácido fosfórico, caracterizado como composto inorgânico, foi preparado pela primeira vez, por Boyle em 1964, logo após a descoberta do fósforo elementar (SCHRODTER et al., 2008). Sua aplicação na elaboração de dietas está na acidificação do meio e sua ação antifúngica (LIN; CHEN, 1995). Na odontologia o ácido fosfórico já é utilizado como agente antimicrobiano (PRADO et al., 2015). Na agricultura é utilizado como fungicida no controle de míldio na cultura da uva, além de ser utilizado em formulações de produtos, como, por exemplo, Alude™, Magellan 800WG e Vital® (GUEST; GRANT, 1991; MAGAREY, 2010; THAO; YAMAKAWA, 2009).

Parâmetros biológicos como período larval e mortalidade podem ser importantes na avaliação de dietas artificiais e suas concentrações de anticontaminantes, uma vez que elas devem promover alta viabilidade larval e período juvenil similar ao natural. A capacidade reprodutiva é outro parâmetro que pode ser utilizado na avaliação de dietas, uma vez que ela não deve ser alterada em insetos criados com dietas artificiais (PARRA, 2012; RIBEIRO, 2017). O peso de pupa também pode ser parâmetro para avaliar dietas artificiais, o qual sofre variações conforme combinações de anticontaminantes, como relatado por Bell; king e Hamelee (1980).

3.4 Relação entre anticontaminantes e bioensaios

A dieta artificial é utilizada, muitas vezes, como veículo ou substrato para testar compostos com atividade biológica (inseticidas, modificadores comportamentais, antinutrientes e toxinas) e, para que haja confiabilidade nos resultados obtidos, algumas características são necessárias, tais como: a substância a ser testada, seja ela um aleloquímico, uma toxina ou um vírus, não deve ser quimicamente afetada ou alterada pela dieta; a substância não deve afetar a

palatabilidade e/ ou atratividade da dieta; os ingredientes da formulação básica da dieta não podem mascarar ou alterar o efeito da substância testada; e a dieta deve ser totalmente adequada para oferecer e manter características saudáveis (sem microrganismos) durante o período do bioensaio (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012).

3.5 Criação e parâmetros biológicos de *A. gemmatalis*

Também conhecida por lagarta-da-soja, *A. gemmatalis* apresenta normalmente 6 ínstaes durante seu período larval, podendo ter de 5 a 7 estádios (MOSCARDI et al., 2012; REID, 1975; WATSON, 1916).

A criação de insetos em sua dieta natural apresenta numerosas dificuldades, por exemplo, *A. gemmatalis* alimentada com folíolos de soja podem sofrer infecções por *Metarhizium rileyi*, vírus de poliedrose nuclear e desuniformidade em função da qualidade alimentar das folhas coletadas em diferentes períodos. A adoção de dieta artificial padroniza a criação e permite suprir a demanda necessária para pesquisa e multiplicação de entomopatógenos (HOFFMANN-CAMPO; OLIVEIRA; MOSCARDI, 1985). Esses autores propuseram alterações na dieta de Greene; Leppla e Dickerson (1976), de acordo com a disponibilidade de ingredientes no Brasil.

Com o uso da dieta Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), os períodos médios larval e pupal de *A. gemmatalis* estão nas faixas entre 13 e 14 dias e entre 8 e 9 dias, respectivamente. O peso médio pupal apresenta maior variação entre os trabalhos encontrados estando na faixa 230 a 270 mg (BORTOLI et al., 2005; SOSA-GÓMEZ; MIRANDA, 2012). A adoção de temperaturas maiores ou iguais a 28 °C na criação de *A. gemmatalis* pode encurtar o período larval e o período pupal, além de reduzir o peso de pupa (SILVA et al., 2012). Nos estudos de tabela de vida realizado com uso da dieta de Greene; Leppla e Dickerson (1976), o inseto sofreu alterações semelhantes com aumento de temperatura, com encurtamento de período larval e pupal (MAGRINI, 1993).

A densidade populacional na criação de *A. gemmatalis* pode influenciar parâmetros biológicos da espécie. Nos estudos comparativos entre densidades populacionais para criação, foi observada redução no peso de pupa e maior

mortalidade quando confinados em maiores densidades (ANAZONWU; JOHNSON, 1986; CASTIGLIONI; VENDRAMIM, 1996). Portanto, a criação individualizada apresentou-se a melhor opção (CASTIGLIONI; VENDRAMIM, 1996).

A alimentação de *A. gemmatilis*, com diferentes cultivares de soja, que apresentam diferentes níveis de resistência à espécie, pode ocasionar variabilidade no desenvolvimento do inseto, como alterações no período larval, no período pupal, no peso de pupa e na longevidade de adultos, tanto em condições de campo como em condições de laboratório (FASCEMYER; HAMMOND, 1986; FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005; MACHADO et al., 1999; MAGRINI; BOTELHO; NETO, 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos da biologia de *A. gemmatalis* e impacto de anticontaminantes nos resultados de bioensaios foram realizados na Embrapa Soja, Londrina, PR. Os insetos utilizados nos estudos encontravam-se entre a 275^a e 280^a geração de laboratório, a qual foi inicialmente coletada em Sertãoópolis, PR.

Esses insetos foram criados segundo a metodologia proposta por Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), com alterações na dieta artificial fornecida para lagartas conforme Tabela 1.1 e na maneira de preparo que se deu da mesma forma que as dietas testadas.

Tabela 1.1 – Comparação da quantidade de ingredientes entre a dieta artificial Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) e sua adaptação conforme criação da Embrapa Soja.

	Ingredientes	Quantidade	
		Dieta Hoffman-Campo modificada	Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985)
1	Água destilada (L)	8	8
2	Feijão carioca (g)	500	500
3	Gérmen de trigo (g)	400	400
4	Proteína de soja (g)	200	400
5	Caseína (g)	200	200
6	Levedura (g)	250	250
7	Ágar (g)	160	150
8	Ácido ascórbico (g)	28	24
9	Ácido sórbico (g)	14	12
10	Metilparabeno (Nipagin) (g)	26,8	20
11	Tetraciclina (g)	2,9	1
12	Solução vitamínica (ml)	60	60
13	Formol (38%) (ml)	35 (4,38 µl.ml ⁻¹)	24 (3 µl.ml ⁻¹)

4.1 Biologia de *A. gemmatalis*

O estudo contou com sete tratamentos, que consistiram em combinações de diferentes concentrações de formol e de uma solução antifúngica (SAF) adaptada da solução *Diet Antimicrobial Agent (DAA)* de Roeder et al. (2010), testada em duas

concentrações (Tabela 1.2). A adaptação do DAA consistiu na retirada do ácido sórbico e do antibiótico, uma vez que eles já estavam presentes na composição da dieta. Os ingredientes utilizados na confecção da solução antifúngica e suas respectivas doses encontram-se detalhados na Tabela 1.3.

A confecção da dieta artificial utilizou os ingredientes citados na Tabela 1.1 em quantidade conforme adaptação da dieta Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) e deu-se início com o cozimento do feijão em pressão por 25 minutos. Em seguida, drenou-se o feijão e esse foi triturado com um pouco de água destilada em liquidificador. Adicionaram-se os ingredientes 3 a 7 e o restante da água destilada juntamente com o feijão e se mixou até formar uma pasta homogênea. O conteúdo formado foi então cozido por período de 5 a 15 minutos após levantar fervura, variando conforme a quantidade de dieta preparada (15 minutos correspondendo a uma dieta de 8 litros). Com o cozimento concluído, esperou-se o resfriamento até 70°C e foram adicionados os ingredientes 8 a 12, com agitação constante até garantir a mistura completa dos ingredientes. Antes de serem acrescentados à dieta artificial, os ácidos e o antibiótico devem ser diluídos em fração pequena da água destilada, e o metilparabeno (Nipagin) deve ser diluído em etanol suficiente para formação de solução transparente. O metilparabeno (Êxodo Científica, Sumaré, SP), o ácido ascórbico (Synth, Diadema, SP) e o ácido sórbico (Êxodo Científica) apresentam pureza mínima de 99%.

Tabela 1.2 – Concentrações de formol e solução antifúngica (SAF) empregados em dieta artificial para estudo da biologia de *Anticarsia gemmatilis*.

Concentrações ($\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ de dieta artificial)		
Tratamento	Formol	SAF
1	4,38	-
2	4,38	1,4
3	2,18	1,4
4	1,1	1,4
5	4,38	2,78
6	2,18	2,78
7	1,1	2,78

Tabela 1.3 – Ingredientes (marca e teor mínimo) utilizados para o preparo de 10 ml de solução antifúngica (SAF), adaptado de Roeder et al. (2010).

Solução antifúngica (10 ml)					
Ingredientes	Quantidade	Unidade	%	Marca	Teor mínimo (%)
Água destilada	5,4	ml	0,538	-	-
Ácido propiônico	4,18	ml	0,416	Dinâmica	99,5
Ácido fosfórico	0,42	ml	0,042	Synth	85
Ácido benzóico	0,04	g	0,004	Synth	99,5

A dieta formada foi fracionada em quantidades de 500 ml para adição do formol (38%, Synth, Diadema, SP) e do SAF nas concentrações mencionadas da Tabela 1.2. Após a adição, agitou-se constantemente, por um minuto, cada dieta formada com as diferentes combinações de anticontaminantes, e estas foram despejadas em copos plásticos de 50 ml (Figura 1.1). Os copos, contendo a dieta, foram submetidos à luz ultravioleta (254 nm, Ecolume, São Paulo, SP) por uma hora e, posteriormente armazenados em refrigerador a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ até o dia seguinte quando se montou o ensaio.

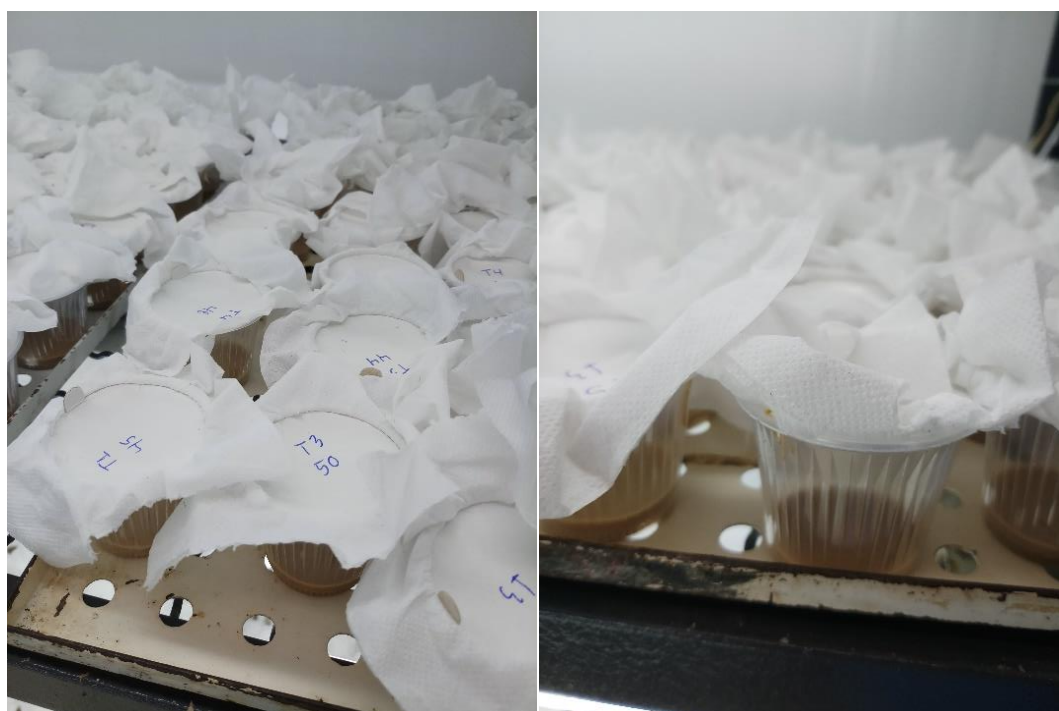


Figura 1.1 – Copos plásticos de 50 ml contendo dieta artificial, inoculada com uma lagarta neonata de *Anticarsia gemmatilis* e vedada com tampa de papelão associada a um pedaço de papel higiênico.

Em cada copo foi acondicionada uma lagarta neonata e vedado com uma tampa de papelão e um pedaço de papel higiênico para impedir a fuga de lagartas (Figura 1.1). Cada lagarta foi considerada uma repetição e cada tratamento iniciou com 64 insetos, porém, devido à mortalidade de indivíduos, o número de repetições variou para os diversos fatores estudados. As lagartas passaram todo o seu desenvolvimento nesses recipientes, com acréscimo de dieta artificial para insetos cujo período larval se estendeu, devido ao ressecamento da dieta. As pupas foram pesadas e sexadas após 72h da sua formação.

Após a coleta desses dados, as pupas foram transferidas para gaiolas PVC circulares com 10 cm de altura e 10 cm de diâmetro, nas quais se aguardou a emergência dos adultos. As gaiolas eram apoiadas a uma tampa de poliestireno com dimensões de 11 x 11 cm coberta por papel toalha, e na extremidade superior do tubo havia uma tira de tecido voil presa com elástico (Figura 1.2).

Parte dos adultos emergidos foi destinada a estudo de longevidade e permaneceu na mesma gaiola, e outra parte foi destinada à formação de 7 casais para estudos de reprodução. Os casais foram acondicionados nas mesmas gaiolas que as pupas, revestindo-se o seu interior com papel sulfite para oviposição. Todos os adultos foram alimentados com um algodão embebido em água e outro em solução alimentícia, que continha 53,95% de água destilada, 40% de cerveja (Antartica Subzero), 5,39% de açúcar cristal, 0,54% de mel, 0,054% de ácido e 0,054% de metilparabeno. Esse alimento foi substituído às segundas, quartas e sextas-feiras juntamente com a coleta de ovos.



Figura 1.2 – Esquema de montagem das gaiolas de PVC utilizadas para manutenção de adultos de *Anticarsia gemmatalis*.

A biologia foi estudada em condições controladas, com temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. Foram avaliados período larval, peso de pupa, período pupal, longevidade de adultos, fecundidade de fêmeas, além da mortalidade de insetos e contaminação fúngica de dieta artificial durante o estudo.

4.1.1 Metodologia estatística para parâmetros biológicos

O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso com as combinações dos tratamentos dispostas em um esquema fatorial com um tratamento adicional (STEEL; TORRIE, 1960). As variáveis respostas período larval, período pupal, peso de pupa, longevidade de adultos, fecundidade, além da mortalidade de insetos e contaminação fúngica de dieta artificial durante o estudo foram submetidos à análise exploratória, objetivando observar os pressupostos da análise de variância (ANOVA) quanto à normalidade e independência dos erros (PARENTE, 1984; SHAPIRO; WILK, 1965), não-aditividade do modelo do delineamento (TUKEY, 1949) e a homogeneidade de variâncias dos tratamentos (BURR; FOSTER, 1972), através do programa SAS 9.4 (SAS, 2012). Após esse diagnóstico exploratório foram realizadas as análises de variâncias (ANOVA) e os testes de comparação de médias pelos testes de Tukey e Dunnett (STEEL; TORRIE, 1960). As médias dos tratamentos após o desdobramento da interação foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer (KRAMER, 1956). Em todos os testes aplicados foi adotado nível de 5% de probabilidade.

4.2 Impacto de anticontaminantes em resultados e bioensaios

As informações obtidas no estudo da biologia de *A. gemmatilis* foram utilizadas para verificar o impacto das concentrações de formol e da solução antifúngica (SAF) nos resultados de bioensaios. Para tanto, nas diferentes dietas, compararam-se as curvas de suscetibilidade obtidas em bioensaios de mortalidade utilizando-se um padrão de proteína Cry1Ac MVP II, o qual é uma formulação comercial contendo 11,2% de toxina Cry1Ac encapsulada em células de

Pseudomonas fluorescens (GILROY; WILCOX, 1992) e extratos de folhas de soja Bt diluídos. As dietas selecionadas corresponderam aos tratamentos 1 (4,38 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ de formol, sem SAF) e 4 (1,1 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ de formol e 1,4 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ de SAF) (Tabela 1.2), e essas foram preparadas (conforme descrito anteriormente) e despejadas em bandejas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ) (Figura 1.3), sendo adicionado 1 ml por célula.

4.2.1 Ensaio com padrão de proteína Cry1Ac

A partir do padrão MVP II, 7 soluções com diferentes concentrações foram preparadas e 20 μl dessas soluções foram inoculados na superfície da dieta artificial em cada célula. A quantidade de proteína presente nesses 20 μl , quando espalhada sobre a superfície da dieta, resultou as concentrações enunciadas na Tabela 4. Como testemunha, foi aplicada água destilada distribuída no mesmo volume. Cada concentração teve um total de 6 repetições (montadas uma por dia) com 16 células e, em cada célula, 1 lagarta neonata ($n = 96$) foi acondicionada após a secagem do volume aplicado.

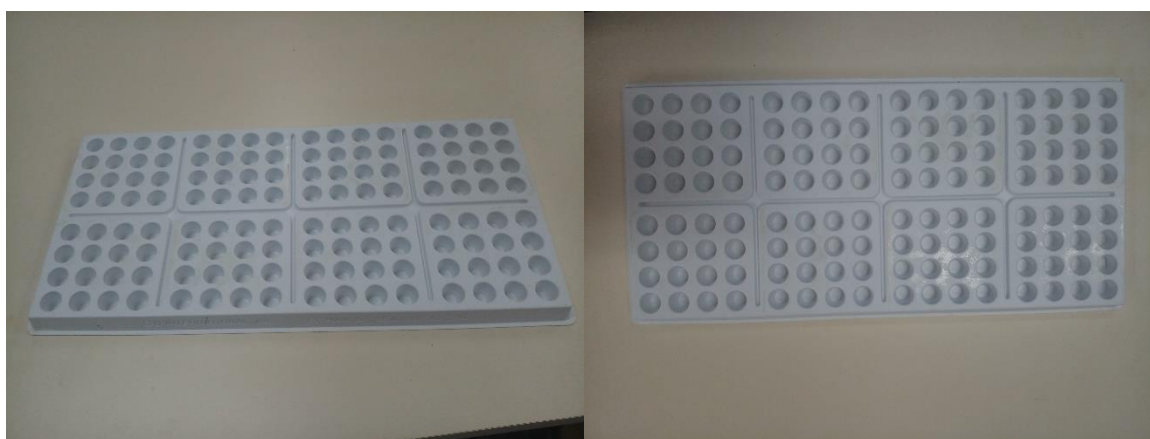


Figura 1.3 - Bandejas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ) utilizadas para realização dos bioensaios com extratos de folha e proteína Cry1Ac.

4.2.2 Ensaio com extratos de folíolos de soja Bt

Este estudo foi realizado com folíolos de soja BRS 1010 IPRO, em fase fenológica R4, coletados no dia 08/02/2018. O plantio da soja ocorreu no dia 19/10/2017 e seu manejo seguiu as recomendações da região.

O extrato inicial foi obtido pela maceração do tecido foliar de 4 subamostras de folíolos em água destilada (proporção de 1g de folíolos: 10 ml de água) com peso aproximado de 70 mg. A maceração dos tecidos foi realizada em microtubos de 1,5 ml (Eppendorf) com auxílio de pistilo plástico e um homogeneizador de tecidos, com acréscimo de abrasivo carborundum em pó (Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ). Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 4 minutos com valor de $g = 9.500$ e $rcf = 10621$ (Centrifuge 5804 Eppendorf – Hexis). Retirou-se, então, uma alíquota de mesmo volume de cada microtubo para obter o extrato inicial e, a partir deste, obtiveram-se as diluições seriadas, cujas concentrações foram ajustadas para obter mortalidades acima de 1% e menores de 99%.

Da mesma forma que no estudo com proteína, foram utilizadas sete diluições do extrato da folha (Tabela 1.4) e uma testemunha à base de água destilada, aplicadas em volume de 20 μ l em cada célula e espalhadas sobre a superfície da dieta com auxílio de um bastão de vidro de extremidade arredondada. Após a secagem, acrescentou-se uma lagarta neonata por célula. Grupos de 16 lagartas correspondiam a uma repetição, cada grupo foi replicado seis vezes ($n=6$), com montagem de uma repetição ao dia. As bandejas de bioensaios foram mantidas em câmaras B.O.D. reguladas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. A mortalidade foi avaliada aos sete dias após a inoculação. Os indivíduos foram considerados mortos quando não apresentavam movimentação após estimulação com uma agulha.

Tabela 1.4 – Concentrações utilizadas para estudo de mortalidade e cálculo da CL_{50} para proteína Cry1Ac e folhas de soja Bt em *Anticarsia gemmatilis*.

Concentrações (por cm^2 de dieta artificial)	
Proteína (ng de ativo)	Folha ($\mu\text{g. } \mu\text{l}^{-1}$)
0,044	0,22
0,066	0,33
0,099	0,5
0,148	0,74
0,222	1,11
0,333	1,67
0,5	2,5

4.2.3 Metodologia estatística para comparação de bioensaios

A análise de dados foi realizada adotando-se o modelo Log-Logístico representado na Equação 1 com quatro parâmetros (RITZ, 2010) em ambiente R, com utilização do pacote drc para ajuste dos modelos e estimações das concentrações letais (RITZ et al., 2015). Esse pacote foi empregado para se obterem as estimativas dos parâmetros das equações, e os pacotes lmtest (ZEILEIS, HOTHORN, 2002) e Sandwich (ZEILEIS, 2004) foram utilizados para se ajustarem os erros padrões das estimativas quanto à presença de valores extremos (outliers).

$$f(x; b, c, d, e) = c + \frac{d-c}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b} \quad (1)$$

Os parâmetros da Equação 1 possuem interpretação biológica direta. Esses parâmetros representam as assíntotas inferiores e superiores, respectivamente. O valor de e é igual a CL_{50} , b é proporcional ao incremento de mortalidade por unidade de princípio ativo na proximidade da CL_{50} . O valor de x são as concentrações de princípio ativo e os valores de f representam as mortalidades. Assumiram-se restrições para os parâmetros c e d , em que os valores de c seriam sempre ≥ 0 e valores de d seriam sempre ≤ 1 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise exploratória para as variáveis estudadas

Anterior a análise de variância (ANOVA) foram realizadas as análises exploratórias para as variáveis período larval (dias), peso de pupa (mg), período pupal (dias), longevidade (dias) e fecundidade (Tabela 1.5). Neste diagnóstico foram verificados que o período larval e o pupal não atenderam a suposição da normalidade dos dados. Foram retirados os valores discrepantes encontrados, mas não houve resposta positiva para esta estatística. Conforme a Tabela 1.5, com exceção do período larval todas as variáveis estudadas apresentaram homogeneidades de variâncias dos tratamentos. Nesse estudo os coeficientes de assimetria e curtose ocorreram bem próximos de zero. Embora a normalidade seja um dos requisitos para realizar a ANOVA, na literatura é afirmado que esta suposição, em geral, não ocorre para as populações e que a mesma só é importante na justificativa de uso de alguns testes de significância. A ausência de normalidade não leva a erros sérios de interpretação de médias simples (PINO, 2014).

Tabela 1.5 – Estatística descritiva e testes de pressuposições da análise de variância para os parâmetros biológicos estudados.

Teste	Período larval	Peso de pupa	Período pupal	Longevidade	Fecundidade
Coeficiente de variação (%)	5,34	9,7	6,72	29,68	36,44
Coeficiente de assimetria	0,32	0,2	-0,1	0,11	-0,4
Coeficiente de curtose	0,47	0,16	-0,36	0,9	-0,56
Shapiro-Wilk (W)	0,96	0,99	0,92	0,99	0,96
Pr. (W)	0,0001	0,15	0,0001	0,05	0,11
Não-aditividade (F)	26,82	5,3	0,04	0,63	0,13
Pr. (F)	< 0,0001	0,02	0,85	0,43	0,72
Burr-Foster (calculado)	0,2	0,16	0,16	0,15	0,16
Burr-Foster (valor crítico)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,26

5.2 Período larval

A fonte de variação dietas artificiais demonstrou influenciar de forma altamente significativa o período larval, em que há diferença entre, pelo menos, duas

dietas artificiais. No desdobramento das comparações entre as dietas artificiais, observou-se significância para o período larval das lagartas alimentadas com diferentes concentrações de formol e também na comparação entre as dietas contendo formol e SAF e a dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) (tratamento adicional no delineamento fatorial). Não houve diferenças significativas entre os períodos larvais para as concentrações de SAF, e também na interação entre as concentrações de formol e SAF (Tabela 1.6).

Tabela 1.6 – Análise de variância da variável período larval de *Anticarsia gemmatilis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F _{Calc.}	P
Formol	2	775,463	387,731	557,2	<.0001
SAF	1	0,299	0,299	0,43	0,5125
Formol*SAF	2	1,406	0,703	1,01	0,3653
Fatorial* Trat. Adicional	1	170,682	170,682	245,28	<.0001
Dietas artificiais	6	998,333	166,389	239,11	<.0001
Resíduo	333	231,723	0,696	-	-
Total	339	1230,056	-	-	-

CV – 5,34%.

Comparando-se as médias obtidas de período larval pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) para as diferentes concentrações de formol, notou-se que elas diferem significativamente entre si. Porém, o período larval não diferiu entre a concentração $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ e a dieta adaptada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) (Figura 4). As lagartas que se desenvolveram na dieta com a concentração de formol $1,1 \mu\text{l.ml}^{-1}$ apresentaram a menor média do período larval, com 14,11 dias. A concentração de formol de $2,18 \mu\text{l.ml}^{-1}$ prolongou a média do período larval em 0,6 dias, comparada a concentração de $1,1 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de dieta. O período larval para a concentração $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ foi a que apresentou maior variação comparada às demais, prolongando o período larval em mais de três dias (Tabela 1.7 e Figura 1.4).

O erro padrão encontrado para período larval nas diferentes concentrações de formol (Figura 1.4) demonstra maior homogeneidade de dados quando em doses baixas, ou seja, os insetos atingem a fase de pupa simultaneamente em maior número

quando comparados aos insetos que se desenvolveram em concentrações maiores de formol. A homogeneidade de desenvolvimento é benéfica para qualquer criação de inseto, pois garante que este atinja as diferentes fases de desenvolvimento simultaneamente e que o controle das atividades da criação seja facilitado.

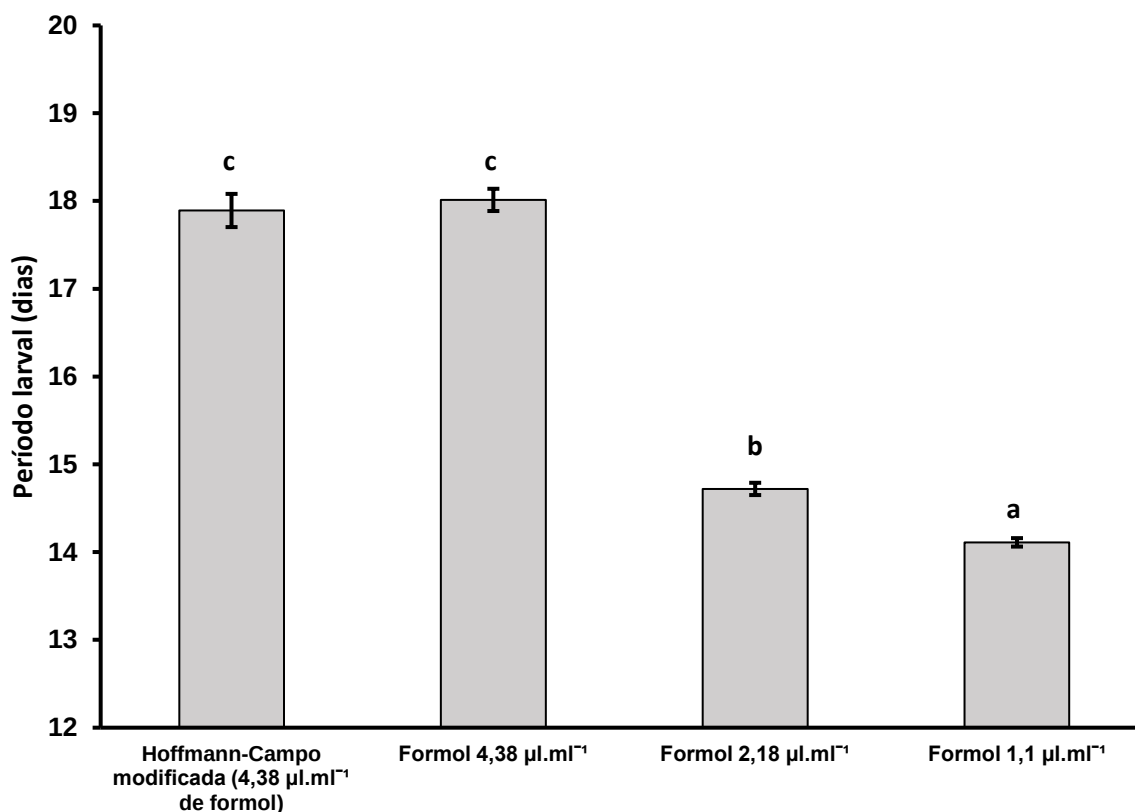


Figura 1.4 – Comparação das médias obtidas para período larval ($\pm$ EPM) de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de formol e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

As lagartas alimentadas com diferentes concentrações de SAF não diferiram significativamente quanto ao período larval, conforme dados apresentados na Tabela 1.7, mostrando que a SAF nas concentrações estudadas não altera o período larval.

Os dados apresentados na Tabela 1.8 demonstram que a interação entre as concentrações de formol e SAF não foi significativa, e que o período larval para as concentrações de formol apresentou diferença significativa entre as três concentrações igualmente dentro das duas concentrações de SAF.

Tabela 1.7 – Comparação de médias de período larval de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Tratamento	*Média $\pm$ EPM (dias)		Tratamento	Média $\pm$ EPM (dias)	
Formol 1,1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	14,11 $\pm$ 0,05	a	SAF 1,4 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	15,36 $\pm$ 0,15	a
Formol 2,18 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	14,72 $\pm$ 0,07	b	SAF 2,78 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	15,33 $\pm$ 0,14	a
Formol 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	18,01 $\pm$ 0,13	c	-	-	

*Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra nas colunas diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 1.8 – Comparação entre médias de período larval de *Anticarsia gemmatalis* na interação entre concentrações de formol e SAF incorporados em dieta artificial e lagartas criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Concentrações SAF e formol		*Médias (dias) $\pm$ EPM	
SAF 1,4 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	Formol 1,1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	14,00 $\pm$ 0,07	a
	Formol 2,18 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	14,67 $\pm$ 0,09	b
	Formol 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	18,07 $\pm$ 0,17	c
SAF 2,78 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	Formol 1,1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	14,22 $\pm$ 0,06	a
	Formol 2,18 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	14,77 $\pm$ 0,10	b
	Formol 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	17,94 $\pm$ 0,19	c

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey-Kramer ($P \leq 0,05$).

As médias observadas de período larval demonstram que o formol pode retardar o desenvolvimento do inseto nessa fase. Já o SAF, não alterou o desenvolvimento larval nas concentrações estudadas e também não interagiu com formol. Singh e House (1970) também demonstraram o retardamento no desenvolvimento larval ocasionado por formaldeído em *Agri affinis* (Diptera: Sarcophagidae). Vail et al. (1968) verificaram o mesmo efeito em *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae).

Adotando a dieta de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), cuja concentração de formol é de 3 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de dieta artificial, Sosa-Gómez e Miranda (2012) e Bortoli et al. (2005) obtiveram médias de 13,88 e 13,35 dias para período larval de *A. gemmatalis*. Silva et al. (2012), utilizando a mesma dieta, obtiveram médias que variam de 13,58 a 14,05 dias para temperatura de 25°C. As médias obtidas no

presente trabalho corroboram as médias encontradas para concentrações de formol de 1,1 e 2,18 $\mu\text{l.ml}^{-1}$, com leves variações que podem ocorrer por pequenas oscilações de temperatura (SILVA et al., 2012) ou alteração nas concentrações de outros anticontaminantes da dieta, como por exemplo o metil-parabeno e o ácido sórbico, que estão pouco acima das utilizadas na dieta Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985). Tais resultados demonstram que a concentração de 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol causa prolongamento do período larval.

Sob criação na dieta proposta por Greene; Leppla e Dickerson (1979), em temperaturas de 24 e 27°C, Magrini (1993) obteve períodos larvais de 17,1 e 12,9 dias, respectivamente, corroborando os resultados obtidos por Silva et al (2012) com dieta de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), demonstrando não haver diferença entre as duas dietas para período larval.

Quando alimentadas com folhas de soja de diferentes cultivares e em condições de laboratório a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, *A. gemmatilis* teve seus resultados médios de período larval variando entre 11,9 e 13,6 dias (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005), a demonstrar que a dieta artificial provoca retardamento de até 2 dias comparado ao alimento natural sob condições controladas. Em condições de campo, o inseto tem maior variação no período larval, quando alimentado com diferentes cultivares. O período larval das fêmeas variou entre 8,95 e 16,75 dias, já, o dos machos entre, 10,15 dias e 16,8 dias (MAGRINI; BOTELHO; NETO, 1999). Para que a dieta artificial seja considerada adequada, uma de suas características é manter o período larval como o natural (PARRA, 2012; RIBEIRO, 2017). Essa característica foi alcançada pelas dietas artificiais encontradas na literatura, bem como para as duas menores concentrações de formol estudadas neste trabalho.

Roeder et al. (2010) observaram redução no período larval de *C. virescens* quando adicionado o DAA (solução contendo os ácidos fosfórico, propiônico, benzóico, sórbico e antibiótico), o que não foi observado para *A. gemmatilis* neste trabalho, demonstrando a importância de se estudar o impacto de anticontaminantes nas diferentes espécies de insetos criados (ALVERSON; COHEN, 2002).

5.3 Peso de pupa

A variável peso de pupa apresentou diferença significativa pelo menos entre duas dietas artificiais. Essa diferença se deve principalmente às diferentes concentrações de formol, fonte de variação que ocasionou diferenças altamente significativa nesta variável. O peso de pupa não apresentou diferenças significativas para a fonte de variação SAF a $P \leq 0,05$, nem na interação entre concentrações de formol e SAF e na comparação entre as dietas estudadas com a dieta modificada Hoffmann-Campo (1985) (Tabela 1.9).

Tabela 1.9 – Análise de variância da variável peso de pupa de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	P
Formol	2	0,01039	0,0052	7,75	0,005
SAF	1	0,0021	0,0021	3,14	0,0775
Formol*SAF	2	0,0002	0,0001	0,16	0,8557
Fatorial* trat. Adicional	1	0,0007	0,0007	1,11	0,2937
Dietas artificiais	6	0,0142	0,0023	3,53	0,0021
Resíduo	333	0,2234	0,0006	-	-
Total	339	0,2376	-	-	-

CV – 9,7%.

A concentração mais elevada de formol ($4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$) ocasionou redução significativa do peso médio de pupas de *A. gemmatalis*. Entretanto, as demais concentrações não diferenciaram os pesos de pupa entre si. Não houve resposta significativa para peso de pupa de lagartas alimentadas com diferentes concentrações de SAF (Tabela 1.10).

O peso de pupa não se distinguiu entre a concentração $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol comparada à dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985). Os pesos de pupa para as concentrações 1,1 e $2,18 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol não diferenciaram entre si, mas foram significativamente maiores que a dieta adaptada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) (Figura 1.5). O erro padrão indica que houve menor variação dos pesos amostrados para concentrações menores de formol,

proporcionando maior homogeneidade na criação com essas concentrações de formol.

Tabela 1.10 – Comparação de médias de peso pupal de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Tratamento	*Média $\pm$ EPM (mg)		Tratamento	*Média $\pm$ EPM (mg)	
Formol 1,10 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	269,20 $\pm$ 2,00	a	SAF 1,40 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	264,67 $\pm$ 2,24	a
Formol 2,18 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	272,87 $\pm$ 2,02	a	SAF 2,78 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	270,65 $\pm$ 2,04	a
Formol 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	257,99 $\pm$ 3,44	b	-	-	

*Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer ($P \leq 0,05$).

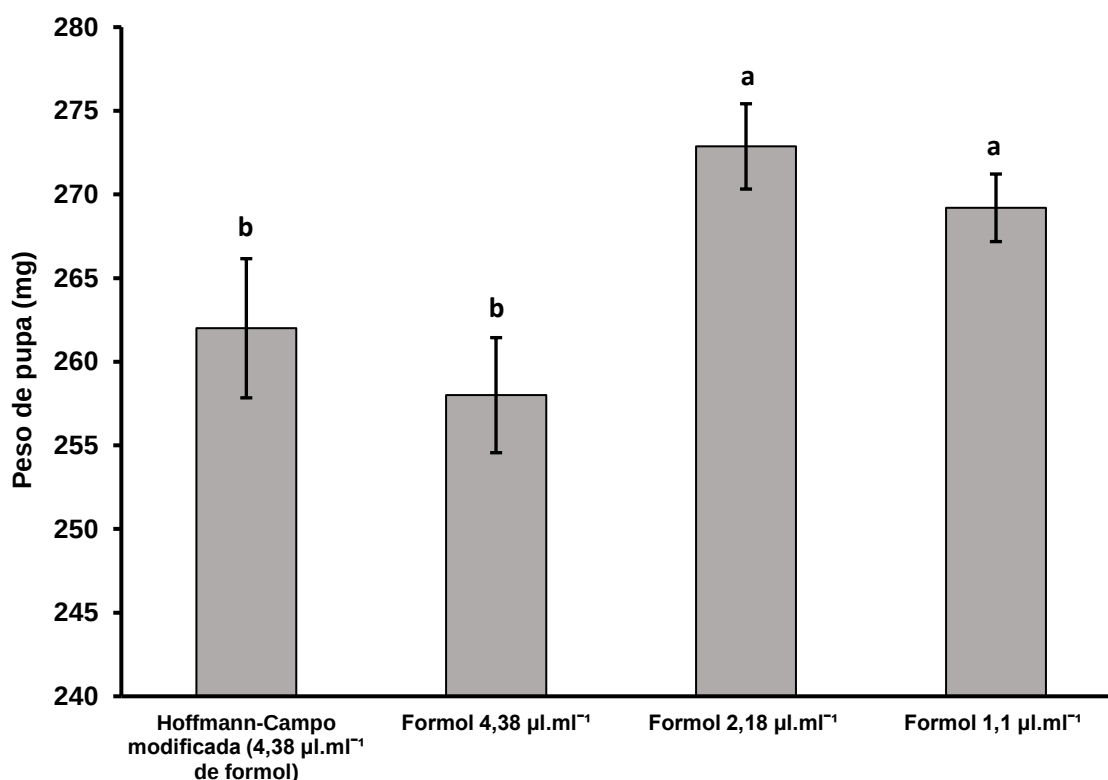


Figura 1.5 - Peso médio de pupa ($\pm$ EPM) de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de formol e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Lagartas-da-soja criadas em dieta Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), com concentração de formol de $3 \mu\text{l.ml}^{-1}$, apresentaram 234 mg (BORTOLI et al., 2005) e 266 mg (SOSA-GÓMEZ; MIRANDA, 2012). As médias obtidas neste

trabalho são semelhantes as observadas por Sosa-Gómez e Miranda (2012), e são superiores às encontradas por Bortoli et al. (2005).

Em estudos de biologia com folhas de soja, *A. gemmatalis* apresentou peso médio de pupas macho entre 223 e 235 mg e para fêmeas entre 178 e 206 mg conforme as cultivares utilizadas (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005), corroborando os resultados obtidos por Bortoli et al. (2005) quando criada em dieta artificial. Entretanto, o presente trabalho indica que o uso de dieta artificial pode aumentar o peso de pupa e que as concentrações de formol e SAF podem influenciar o peso pupal. No caso, a adoção de uma das concentrações menores de formol e a mais alta de SAF podem contribuir para aumento do peso de pupas de *A. gemmatalis*.

5.4 Período pupal

A adoção de dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes provocou diferença significativa no período pupal de *A. gemmatalis*. As médias de período pupal para as diferentes concentrações de SAF não diferiram significativamente entre si e também não interagiram com as diferentes concentrações de formol para a variável em questão. A dieta adaptada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) não apresentou diferença significativa quando comparada às demais dietas artificiais (Tabela 1.11).

Tabela 1.11 - Análise de variância da variável período pupal de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	P
Formol	2	6,7135	3,3567	8,49	0,0003
SAF	1	0,1727	0,1727	0,44	0,5089
Formol*SAF	2	0,1507	0,0753	0,19	0,8265
Fatorial* trat. Adicional	1	0,5419	0,5419	1,37	0,2424
Dietas artificiais	6	7,7628	1,2938	3,27	0,0038
Resíduo	333	131,5872	0,3951	-	-
Total	339	139,35	-	-	-

CV – 6,72%.

As concentrações de formol foram a única fonte de variação altamente significativa (Tabela 1.11) que influenciaram o período pupal. O maior período pupal pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) foi observado em lagartas alimentadas com dietas contendo formol $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ prolongado em 0,3 dias (Tabela 1.12). A variável em questão não diferiu significativamente entre as menores concentrações de formol (Figura 1.6).

Tabela 1.12 - Comparação de médias de período pupal de *Anticarsia gemmatilis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, UR $60 \pm 10 \%$ e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Tratamento	*Média $\pm$ EPM (dias)		Tratamento	*Média $\pm$ EPM (dias)	
Formol $1,1 \mu\text{l.ml}^{-1}$	$9,2564 \pm 0,06$	a	SAF $1,4 \mu\text{l.ml}^{-1}$	$9,3141 \pm 0,05$	a
Formol $2,18 \mu\text{l.ml}^{-1}$	$9,2336 \pm 0,05$	a	SAF $2,78 \mu\text{l.ml}^{-1}$	$9,3537 \pm 0,06$	a
Formol $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$	$9,5822 \pm 0,07$	b	-	-	

*Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

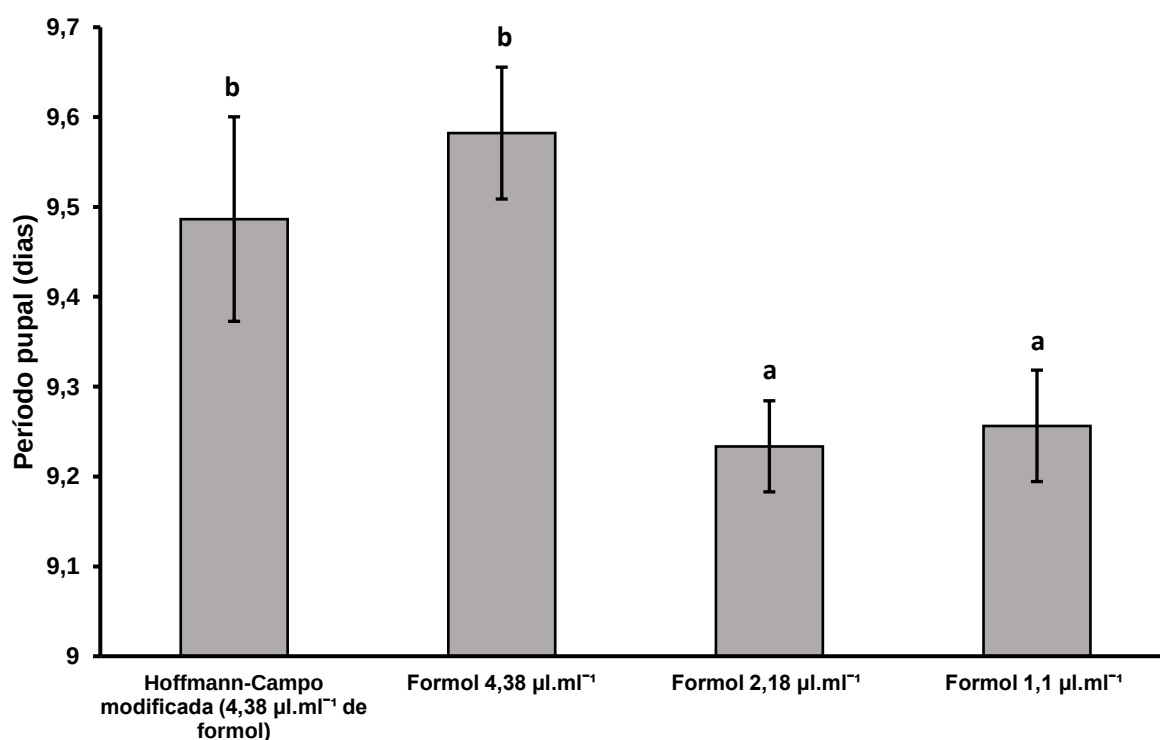


Figura 1.6 - Comparação das médias obtidas para período pupal ($\pm$ EPM) de *Anticarsia gemmatilis* alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações de formol e criadas em temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, UR $60 \pm 10 \%$ e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Nos estudos realizados com dieta Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), Sosa-Gómez e Miranda (2012) observaram valor médio de período pupal de 8,5 dias e Bortoli et al. (2005) de 8,35 dias. Já Silva et al. (2012) em diferentes temperaturas encontrou valores médios de 10,34 a 11,34 dias em 25°C. As médias apuradas no presente trabalho foram superiores às de Sosa-Gómez e Miranda (2012) e Bortoli et al. (2005) e inferiores às de Silva et al. (2012). Em dieta proposta por Greene; Leppla e Dickerson (1976), Magrini (1993) em 24°C observou período pupal médio de 12,04 para fêmeas e 12,68 dias para machos e em 28°C valores abaixo de 9 dias.

Os valores para médias de período pupal detectados no presente trabalho são coincidentes com os resultados obtidos na literatura, o que mostra que a dieta artificial pode causar alterações no período pupal, como as apresentadas neste trabalho, devido às variações na concentração de anticonstaminantes. Entretanto tais variações são pequenas quando comparadas àquelas provocadas por oscilações na temperatura (MAGRINI, 1993; SILVA et al., 2012).

Em ambiente controlado e alimentada com folhas de soja, *A. gemmatilis* apresentou período pupal médio entre 8,2 e 8,6 dias para diferentes cultivares (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005). Em condições de campo, o período pupal médio observado foi de 8,33 a 10,58 dias para fêmeas e de 8,92 a 11,72 dias para machos (MAGRINI; BOTELHO; NETO, 1999). Os períodos pupais observados neste trabalho foram superiores quando comparados à alimentação em folhas de soja em condições controladas, e foi próximo dos resultados obtidos a campo. As dietas testadas neste trabalho, ou as condições de criação, podem ter causado leve retardamento no período pupal, como também observado anteriormente no período larval.

5.5 Longevidade de adultos

Entre os tratamentos estudados, a longevidade de adultos não apresentou significância estatística na interação entre formol e SAF e com relação ao tratamento adicional. A análise variância e o teste de Tukey apontados nas Tabelas 1.13 e 1.14, respectivamente, indicam a não significância dos resultados. Os valores médios para longevidade observados variam de 22,58 a 26,55 dias para as sete dietas testadas, e

o teste de Dunnett a 5% de probabilidade também não apresentou diferença entre as dietas contendo diferentes concentrações de formol e SAF com a dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985).

Tabela 1.13 - Análise de variância da variável longevidade de adultos de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F calc.	P
Formol	2	95,444	47,722	0,87	0,4192
SAF	1	60,8134	60,8134	1,11	0,2927
Formol*SAF	2	270,1415	135,0707	2,47	0,0867
Fatorial* trat. Adicional	1	32,636	32,636	0,6	0,4406
Dietas artificiais	6	433,8416	72,3069	1,32	0,2577
Resíduo	333	13679,44	54,6937	-	-
Total	339	14107,28	-	-	-

CV – 29,68%.

A longevidade de adultos está pouco relacionada as diferentes concentrações de anticontaminantes adicionados ao alimento na fase larval. Entretanto, os valores médios apresentados neste trabalho estão muito acima dos demais trabalhos da literatura. Um dos fatores que podem influenciar a longevidade de adultos está na composição do alimento fornecido durante essa fase do inseto, como demonstrado por Silva; Carvalho e Matioli (1991), Parra et al. (1999) e Fonseca et al. (2005).

Tabela 1.14 - Comparação de médias de longevidade de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Tratamento	Média ± EPM (dias)		Tratamento	Média ± EPM (dias)	
Formol 1,1 µl.ml ⁻¹	25,93 ± 0,75	a	SAF 1,4 µl.ml ⁻¹	24,70 ± 0,07	a
Formol 2,18 µl.ml ⁻¹	24,62 ± 0,75	a	SAF 2,78 µl.ml ⁻¹	25,43 ± 0,69	a
Formol 4,38 µl.ml ⁻¹	24,43 ± 1,15	a	-	-	

Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Sosa-Gómez e Miranda (2012), adotando a mesma dieta utilizado no presente trabalho, obtiveram média de longevidade de adultos de 13,7 dias, contrastando com os dados alcançados neste estudo. Magrini (1993) alimentou os adultos com solução proposta por Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), que se assemelha à solução utilizada neste trabalho, e, para as temperaturas 24 e 27 °C, a longevidade de adultos que acasalaram foi de 14,43 e 14,89 dias e para os não acasalados foi de 14,14 e 11,88 dias, respectivamente.

Silva et al. (2012) determinaram que a longevidade média variou entre 11,11 a 15,83 dias para machos mantidos a 25 °C e 12,28 e 15,89 dias para fêmeas, quando forneceram solução de água e mel 10%, conforme a geração. A 28°C, os valores médios variam entre 10,55 e 16,5 dias e 8,44 e 15 dias para machos e fêmeas, respectivamente. O número de gerações de criação do inseto pode ter influenciado a longevidade, e, pela alta adaptação da criação dos insetos da Embrapa Soja, os valores médios de longevidade ultrapassaram facilmente os 20 dias.

Em condições de campo, a longevidade de adultos variou de 9,1 a 12,9 dias para fêmeas e de 8,92 a 11,72 dias para machos, demonstrando que as condições de laboratório aumentam a longevidade de adultos de *A. gemmatilis* (MAGRINI; BOTELHO; NETO, 1999). Em condições de laboratório, mas alimentando com folhas de soja de diferentes cultivares, a longevidade média de machos variou entre 17,3 e 20,2 dias e as fêmeas entre 15,2 e 17,6 dias (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005). Os dados aparentemente indicam que a alimentação com folhas de soja pode contribuir para maior longevidade que as dietas artificiais, com exceção do presente trabalho que foi superior.

5.6 Comparação de parâmetros biológicos entre dietas testadas

O teste de Dunnett foi realizado para comparação entre parâmetros biológicos obtidos de lagartas de *A. gemmatilis*, alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de formol e SAF com a dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), com objetivo de avaliar individualmente o desempenho de cada dieta comparada àquela já adotada na criação da espécie. O teste indicou diferença significativa apenas para o período larval (Tabela 1.15). Os períodos larvais das

lagartas alimentadas com dietas contendo concentração de 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol associada com concentrações de 1,4 e 2,78 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de SAF não apresentaram resposta estatística comparada a dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) que apresenta a mesma concentração do produto.

Tabela 1.15 – Comparação das médias obtidas para período larval, período pupal e peso de pupa de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Tratamento ($\mu\text{l.ml}^{-1}$)	Período larval (dias)	Período Pupal (dias)	Peso de pupa (g)
Hoffmann-Campo et al. modificada	17,8919	9,4865	0,262
Formol 1,1 + SAF 1,4	14,0000*	9,2069	0,265
Formol 1,1 + SAF 2,78	14,2203*	9,3050	0,272
Formol 2,18 + SAF 1,4	14,6727*	9,2363	0,270
Formol 2,18 + SAF 2,78	14,7692*	9,2307	0,276
Formol 4,38 + SAF 1,4	18,0697	9,5581	0,256
Formol 4,38 + SAF 2,78	17,9444	9,6111	0,259

Médias seguidas de * diferem significativamente da dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) pelo teste de Dunnett ($P \leq 0,05$).

Os períodos larvais das lagartas alimentadas com dietas contendo concentração de 1,1 ou 2,18 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol diferiram significativamente da dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985), cujas médias de período larval foram, pelo menos, três dias menores. Período pupal e peso de pupa não apresentaram diferença entre a dieta modificada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985) e as demais dietas.

5.7 Fecundidade de fêmeas

A fecundidade de fêmeas foi inferida através do número total de ovos ovipositados pela mariposa ao longo de sua vida. A variável número de ovos não apresentou diferença significativa em nenhuma fonte de variação na análise fatorial com tratamento adicional, ou seja, as lagartas fêmeas alimentadas com diferentes concentrações de anticontaminantes quando na fase adulta não apresentaram variação significativa no número de ovos ovipositados ao longo de sua vida (Tabela

1.16). Os resultados obtidos para número de ovos demonstram que as concentrações de anticontaminantes não impactam no número de ovos totais ovipositados por fêmeas de *A. gemmatalis*.

Tabela 1.16 - Comparação de médias do número de ovos de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes e criadas em temperatura de 26 ± 2 °C, UR 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14:10 (L/D).

Tratamento	Média $\pm$ EPM (dias)		Tratamento	Média $\pm$ EPM (dias)	
Formol 1,1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	775,8 $\pm$ 98,34	a	SAF 1,4 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	932,1 $\pm$ 67,86	a
Formol 2,18 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	987,9 $\pm$ 80,08	a	SAF 2,78 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	733,8 $\pm$ 84,62	a
Formol 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$	743,4 $\pm$ 101,31	a	-	-	

Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

O presente trabalho apresentou valor médio entre 733 e 988 ovos (Tabela 1.16), que corrobora com a variação encontrada na literatura. Por exemplo, Fugii; Lourenção e Parra (2005) alimentaram lagartas-da-soja com folhas de diferentes cultivares de soja e obtiveram valores médios de ovos por fêmea entre 726 e 1265. Moscardi; Barfield e Allen (1981) encontraram entre 310 e 842 ovos por fêmea alimentadas com dieta artificial. Sosa-Gómez e Miranda (2012) obtiveram média de 755 ovos por fêmea utilizando dieta Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985). Magrini (1993) obteve valores de até 975 ovos por fêmea em dieta Greene; Leppla e Dickerson (1976). O número de ovos de *A. gemmatalis* sofre pouca influência do alimento disponibilizado nesses trabalhos.

5.8 Análise da viabilidade larval

A viabilidade larval está representada nas Figuras 1.7 e 1.8. Não houve diferença entre as concentrações de SAF, por isso estão representadas apenas as viabilidades de 2,78 SAF $\mu\text{l.ml}^{-1}$. Ocorreu disparidade na viabilidade entre as diferentes concentrações de formol. A maior concentração (4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$) provocou maior mortalidade (aproximadamente 30%) de lagartas e maior heterogeneidade no período larval, como discutido anteriormente. A concentração 1,1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol

provocou mortalidade similar à concentração $2,18 \mu\text{l.ml}^{-1}$, 7,8 e 10,9% respectivamente, mas proporcionou período larval mais uniforme.

Uma dieta para ser considerada apropriada deve promover viabilidade total superior a 75% (PARRA, 2012; RIBEIRO, 2017), o que não foi observado com a adição de $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol, que, além de retardar o período larval, provoca mortalidade elevada de lagartas.

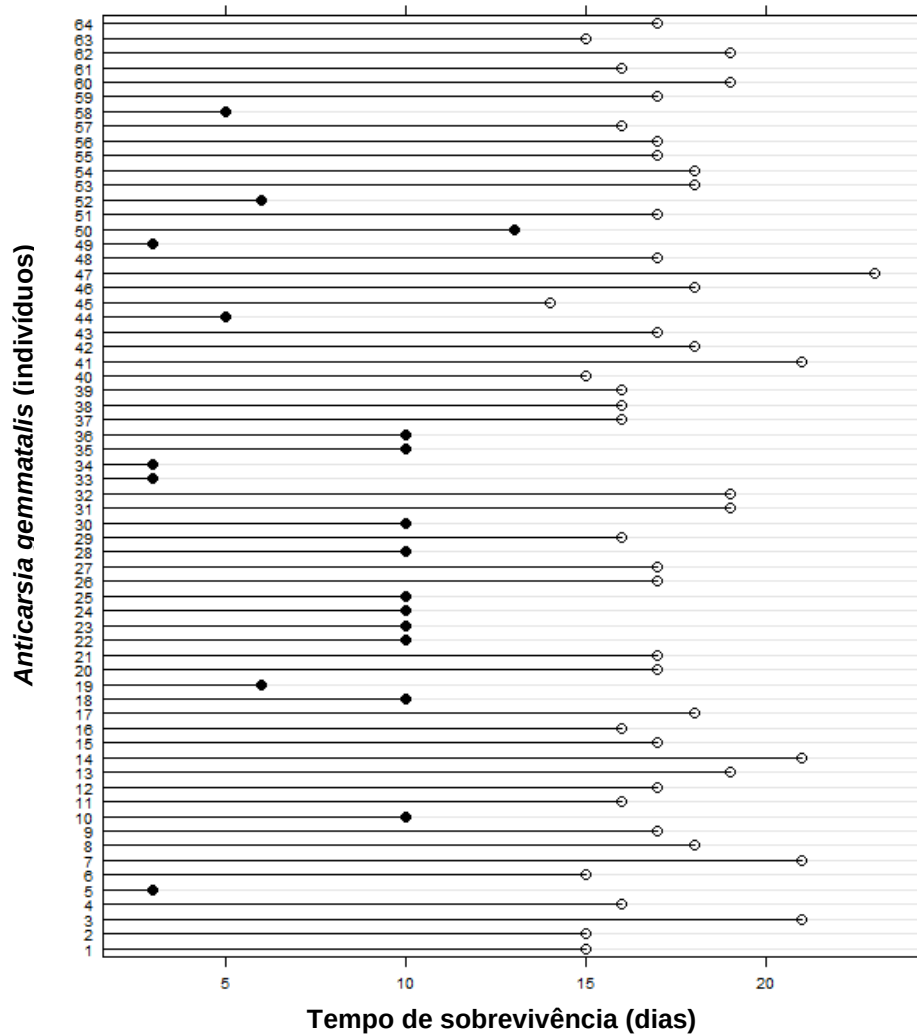


Figura 1.7 – Viabilidade larval ao longo tempo de *Anticarsia gemmatalis* alimentada com dieta contendo $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol e $2,78 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de SAF. Eventos: • - morte da lagarta, o – inseto atingiu fase de pupa.

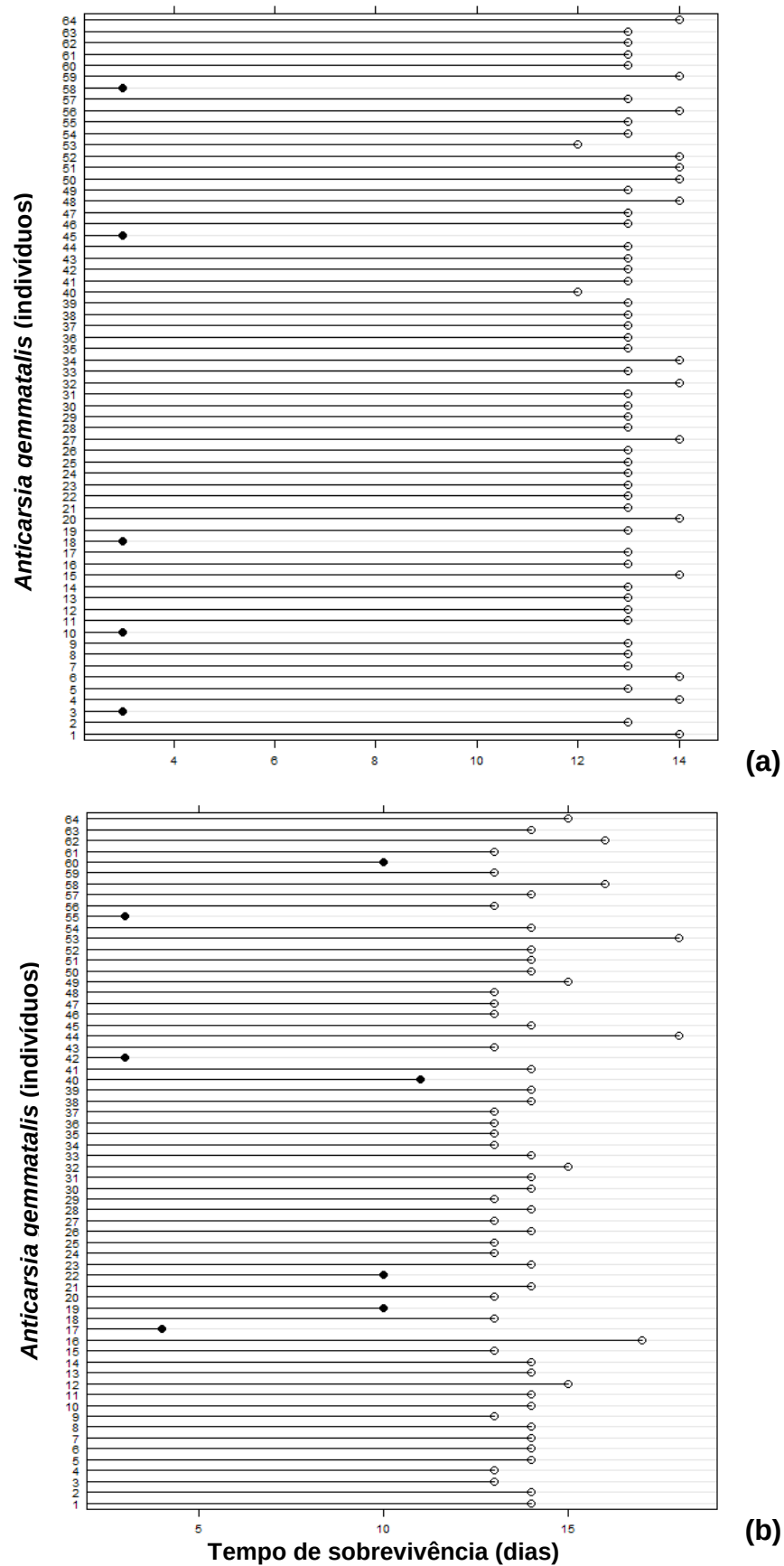


Figura 1.8 – Viabilidade larval ao longo tempo de *Anticarsia gemmatilis* alimentada com dietas contendo (a) 1,1 µl.ml⁻¹ e (b) 2,18 µl.ml⁻¹ de formol, ambas contendo 2,78 µl.ml⁻¹ de SAF. Eventos: • - morte da lagarta, o – inseto atingiu fase de pupa.

5.9 Concentrações de anticontaminantes em resultados de bioensaios

Os dados apresentados na Tabela 1.17 demonstram que dietas contendo concentrações maiores de anticontaminantes podem afetar os resultados dos bioensaios de mortalidade com extrato de folha. Nesse caso, a dieta que continha maior concentração de formol apresentou CL_{50} de *A. gemmatalis* aproximadamente 1,6 vezes menor, ou seja, a quantidade de folha em extrato necessária para matar 50% dos indivíduos é 1,6 vezes menor que a dieta contendo menor concentração de formol mais o SAF. Isso demonstra que a concentração $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol contribui para a mortalidade e diminui a quantidade de tecidos necessária para matar o inseto.

A Figura 1.9 apresenta as curvas de mortalidade encontradas para as duas dietas testadas, bem como os seus intervalos de confiança. Nota-se diferença significativa entre as curvas no intervalo de 20 a 50% de mortalidade. Em concentrações mais altas de folhas não há diferença entre curvas, provavelmente devido à alta concentração da toxina contribuir para que ocorra uma elevada e rápida mortalidade, ocasionando, em consequência, paralisia da alimentação e menor ingestão de dieta.

Tabela 1.17 – Efeito de dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes em bioensaios com extratos de folha. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL_{50} ; CL_{50} = concentração letal para 50% dos indivíduos; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL_{50}}$ = erro padrão da estimativa da CL_{50} ; IC = intervalo de confiança para CL_{50} .

Dieta	N	$b \pm \hat{\sigma}_b$	$CL_{50} (\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}.\text{cm}^{-2})$	$\hat{\sigma}_{CL_{50}}$	95% - IC
Formol ($4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ dieta)	672	$-1,89 \pm 0,68$	0,93	0,28	0,37 – 1,49
Formol ($1,1 \mu\text{l.ml}^{-1}$ dieta) + SAF ($1,4 \mu\text{l.ml}^{-1}$ dieta)	672	$-1,94 \pm 0,36$	1,47	0,4	0,65 – 2,29

* b é diretamente proporcional ao incremento de mortalidade nas proximidades da CL_{50} .

Nos bioensaios de mortalidade realizados com a proteína Cry1Ac, a CL_{50} de *A. gemmatalis* foi aproximadamente 1,3 vezes maior em dieta contendo menor concentração de formol e SAF comparada à dieta contendo $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol (Tabela 18), da mesma maneira que encontrado para extratos de folha. Assim, a quantidade necessária de proteína para matar 50% dos indivíduos é menor quando utilizada concentração de $4,38 \mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol.

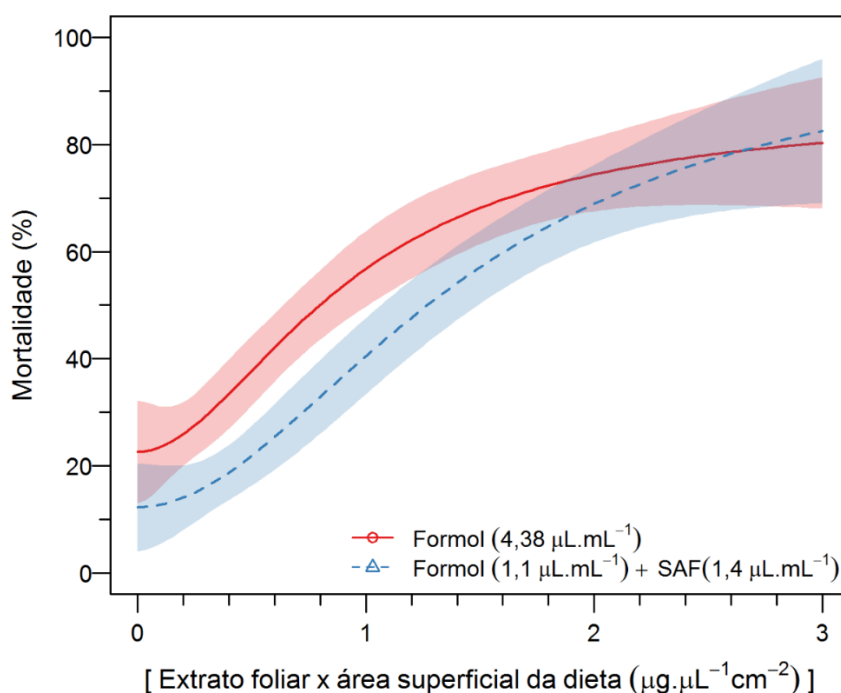


Figura 1.9 – Curvas de mortalidade de *Anticarsia gemmatilis* inferidas pelo modelo Log- Logistic através da mortalidade obtida em bioensaios conduzidos com extratos de folha Bt em diferentes diluições e realizados em dietas artificiais contendo diferentes quantidade de anticontaminantes.

Tabela 1.18 – Efeito de dietas artificiais contendo diferentes concentrações de anticontaminantes em bioensaios com proteína Cry1Ac. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL_{50} ; CL_{50} = concentração letal para 50% dos indivíduos; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL_{50}}$ = erro padrão da estimativa da CL_{50} ; IC = intervalo de confiança para CL_{50} .

Dieta	N	$b^* \pm \hat{\sigma}_b$	CL_{50} (ng.cm ⁻²)	$\hat{\sigma}_{CL_{50}}$	95% - IC
Formol (4,38 μl.ml ⁻¹ dieta)	640	-2,21 ± 0,59	0,104	0,027	0,05 – 0,158
Formol (1,1 μl.ml ⁻¹ dieta) + SAF (1,4 μl.ml ⁻¹ dieta)	640	-2,21 ± 0,54	0,135	0,02	0,093 – 0,176

* b é diretamente proporcional ao incremento de mortalidade nas proximidades da CL_{50} .

Na comparação das curvas de mortalidade obtidas nas duas dietas em bioensaios com proteína, notou-se um intervalo maior de diferença significativa, de aproximadamente 20 a 80% de mortalidade, em que ela foi superior na maior concentração de formol (Figura 1.10). Novamente, em concentrações mais altas de princípio ativo, as curvas não diferem significativamente entre si.

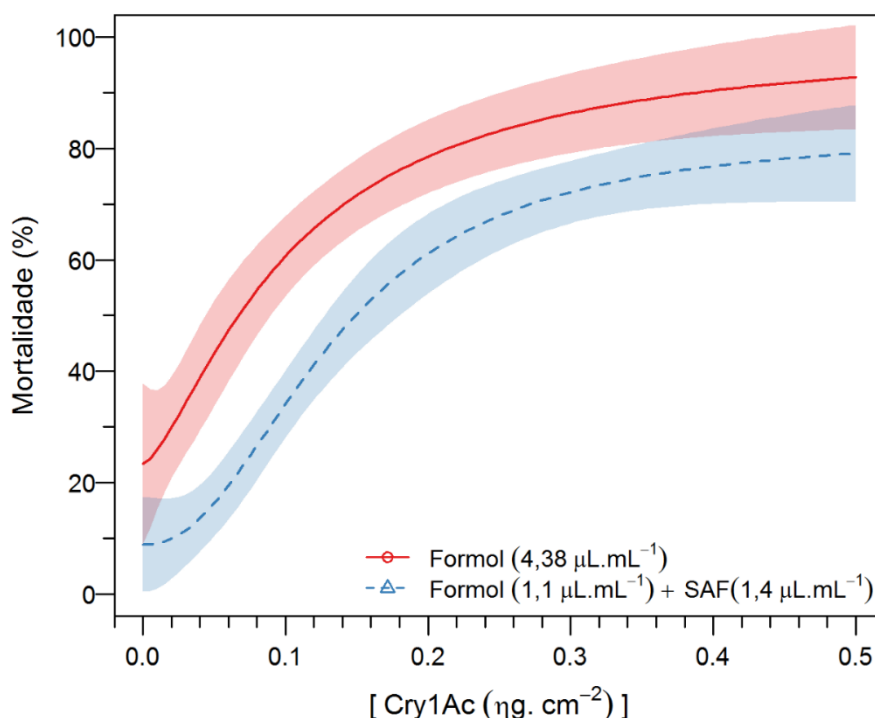


Figura 1.10 – Curvas de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* inferidas pelo modelo Log- Logistic através da mortalidade obtida em bioensaios conduzidos com proteína Cry1Ac em diferentes concentrações e realizados em dietas artificiais contendo diferentes quantidade de anticontaminantes.

Tanto nos ensaios com extratos de folhas como nos ensaios com proteína, as mortalidades das testemunhas foram superiores na presença da maior concentração de formol, resultado similar ao encontrado no estudo da biologia em que as dietas contendo a concentração $4,38 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de formol apresentaram maior mortalidade de lagartas.

A redução no uso de anticontaminantes em dieta artificial pode beneficiar os resultados obtidos em bioensaios de mortalidade, uma vez que os resultados expressos sofrerão menor influência de agentes não desejados, como no caso do formol, cujo efeito pode mascarar os resultados fazendo com que a dieta não tenha as características necessárias para condução de bioensaios (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012). A exclusão total de formol em ensaios de longa duração representa elevado risco de contaminação por microrganismos, os quais encontram condições ideais de desenvolvimento nessas circunstâncias e em criação (ALVERSON; COHEN, 2002; SINGH; HOUSE, 1970) e podem prejudicar a qualidade do desenvolvimento larval e consequentemente dos ensaios (LUDEMANN; FUNKE; GOODPASTURE,

1979). A alteração nas concentrações de anticontaminantes e mais estudos sobre o efeito desses componentes em resultados de bioensaios podem contribuir para execução de ensaios mais precisos e de maior qualidade.

6 CONCLUSÕES

- A concentração de formol 4,38 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ causou retardamento dos períodos larval e pupal, e redução do peso de pupa de *A. gemmatalis*;
- A concentração de formol 1,1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ apresentou menor tempo de período larval;
- A longevidade de adultos não sofreu influência das concentrações de anticontaminantes estudados presentes em dieta artificial;
- O número de ovos por fêmea não foi afetado pelas concentrações de anticontaminantes;
- A concentração de formol em dietas artificiais pode interferir nos resultados de bioensaios de Cry1Ac em estágios imaturos de *A. gemmatalis*.
- Recomenda-se o uso de concentrações 1,1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de formol e 1,4 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ de SAF para realizar a criação e bioensaios com *A. gemmatalis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho atingiu seus objetivos na verificação de limites aceitáveis de formol e solução antifúngica acrescentados à dieta artificial, bem como no estudo dos parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* alimentadas com essas dietas. Demonstrou-se claramente que o uso de anticontaminantes em concentrações elevadas pode prejudicar o desenvolvimento dos insetos. A interação entre formol e SAF com outros anticontaminantes presentes na dieta estudada deve ser foco de estudos futuros através de várias gerações para se conhecer as possíveis relações entre esses componentes, em que provavelmente não haverá contraste com os dados apresentados neste trabalho devido à alta adaptabilidade da espécie em criação de laboratório. Além disso, a verificação da atividade anticontaminante destes dois componentes ainda deve ser realizada, uma vez que neste estudo isso não foi possível devido à baixa contaminação durante o experimento. A inoculação da dieta com fungos pode auxiliar na verificação dessa atividade. Antes da utilização de dietas contendo SAF para outras espécies deve-se primeiro estudar o efeito deste anticontaminante no inseto. Estudar a dieta artificial, bem como seus componentes, é de extrema importância para o futuro da pesquisa e do desenvolvimento entomológico, visto que há interação entre a dieta artificial com a qualidade dos insetos e dos bioensaios.

REFERÊNCIAS

- ALVERSON, J.; COHEN, A. C. Effect of antifungal agents on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). **Journal of Economic Entomology**, Mississippi, v. 95, n. 2, p. 256-260, abr. 2002.
- ANAZONWU, D. L.; JOHNSON, S. J. Effects of host and density on larval color, size, and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 15, n. 4, p. 779-783, ago. 1986.
- BACCA, T.; BENAVIDES, P. Effect of different antimicrobials on the artificial diet for coffee Berry Borer rearing. **Temas Agrarios**, v. 19, n. 2, p. 206-213, jun/dez. 2014.
- BELL, J. V.; KING, E. G.; HAMALLE, R. J. Some microbial contaminants and control agents in a diet and larvae of *Heliothis spp.* **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, n. 3, p. 243-248, mai. 1981.
- BORTOLI, S. A. de; DÓRIA, H. O. S.; ALBERGARIA, N. M. M. S.; MURATA, A. T.; VESCOVE, H. V. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, amendoim e dieta artificial. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v. 31, n. 2, p. 171-178, 2005.
- BURR, I. W.; FOSTER, L. A. A test for equality of variances. West Lafayette: University of Purdue, 1972. 26 p. (*Mimeo Series*, n.282).
- CASTIGLIONI, E. A.; VENDRAMIM, J. D. Desenvolvimento da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner) em cultivares de soja com diferentes densidades larvais de criação. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 1-8, jan./abr. 1996.
- COHEN, A. C. Scope of inset diet science and technology. In ____: **Insect diets: science and technology**. 2. ed. Boca Raton, CRC Press, 2015. p. 1-20.
- DEFOLIART, G. R. Insects as food: why the western attitude is important. **Annual Review of Entomology**, Wisconsin, v. 44, p. 22-51, 1999.
- DING, O. **The antimicrobial effect of benzoic acid or propyl paraben treatment combined with UV-A light on *Escherichia coli* O157:H7**. 2017, 129 f. Dissertation (Science master) – Faculty of the Graduate school of the University of Maryland, College Park, 2017.
- DUNKEL, F. V.; READ, N. R. Review of the effect of sorbic acid on insect survival in rearing diets with reference to other antimicrobials. **American Entomologist**, v. 37, n. 3, p. 172-178, fall. 1991.
- EDUARDO, W. I.; ALMEIDA, L. F. V.; MORAES, R. F. O. de; SANTOS, J. A. dos; MARTIN, C. C.; BORTOLI, S. A. de. Alternativa ao uso de formaldeído em dieta artificial para *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). In: Congresso Brasileiro de Fitossanidade, 3.ed , 2015., Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de lindóia: Conbraf, 2015, p. 255-259.

EILENBERG, J.; VLAK, J. M.; NIELSEN-LEROUX, C.; CAPPELLOZZA, S.; JENSEN, A. B. Diseases in insects produced for food and feed. **Journal of Insect as Food and Feed**, v. 1, n. 2, p. 87-102, 2015.

FASCEMYER, H. W.; HAMMOND, A. M. Effect of density and plant age on color phase variation and development of larval velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 15, n. 4, p. 784-789, ago. 1986.

FONSECA, F. L. da; MANFREDI-COIMBRA, S.; FORESTI, J.; KOVALESKI, A. Efeito de dietas artificiais para a alimentação de adultos de *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae), em laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1229-1233, nov./dez. 2005.

FUGI, C. G. Q.; LOURENÇÃO, A. L.; PARRA, J. R. P. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 31-35, jan/fev. 2005.

GILROY, T. E., WILCOX, E. R., 1992. **Hybrid *Bacillus thuringiensis* gene plasmid, and transformed *Pseudomonas fluorescens***. US Patent, 5,128–130.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, [S.I.], v. 69, n. 4, p. 487-488, ago. 1976.

GUEST, D.; GRANT, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 159-187, 1991.

HAQUE, M. N.; CHOWDHURY, R.; ISLAM, K. M. S.; AKBAR, M. Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. **Bangladesh Journal of Animal Science**, Bangladesh, v. 38, n. 1 e 2, p. 115-122, 2009.

HENSLEY, S. D.; HAMMOND, A. M. Jr. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, Baton Rouge, v. 61, n. 6, p. 1742- 1743, dez. 1968.

HERVET; V. A. D.; LAIRD, R. A.; FLOATE, K. D. A review of McMorran diet for rearing Lepidoptera species with addition of a further 39 species. **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2016.

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

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. 1. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2012. 859 p.

HOWELL, J. F. Problems involved in rearing the codling moth on diet in trays. **Journal of Economic Entomology**, v. 64, n. 3, p. 631-636, jun. 1971.

JORGE, K. Soft Drinks: chemical composition, In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P.; TOLDRA, F. **Encyclopedia of Food Science**. 2. ed.: Academic Press, 2003. p. 5346-5352.

KISHABA, A. N.; HENNEBERRY, T. J.; PANGALDAN, R.; TSAO, P. H. Effects of mold inhibitors in larval diet on the biology of the cabbage looper. **Journal of Economic Entomology**, Riverside, v. 61, n. 5, p. 1189-1194, out. 1968.

KNIPLING, E. F. **The basics principles of insect population supression and management**. 1979. Disponível em: < <https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uiug.30112019255980;view=1up;seq=8> >. Acesso em: 08/01/2019.

KRAMER, C. Y. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. **Biometrics**, v. 12, n. 3, p. 307-310, set. 1956.

LIN, C. D.; CHEN, T. C. Relative antifungal efficacies of phosphoric acid and other compounds on fungi isolated from poultry feed. **Animal Feed Science and Technology**, Mississipi, v. 54, n1-4, p. 217-226, ago. 1995.

LUDEMANN, L. R.; FUNKE, B. R.; GOODPASTURE, C. E. Mold control in insect rearing media: survey of agricultural fungicides and evaluation of the use of humectants. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 4, p. 579-582, ago. 1979.

MACHADO, V. de O. F.; FERREIRA, G. A.; ROSA, S. R. A.; GARCIA, A. H.; PINHEIRO, J. B.; VELOSO, V. de R. S. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de soja (*Glycine max* Merrill). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 29, n. 1, p. 39-41, 1999.

MAGAREY, P. A. **Managing Downy Mildew**. 2010. Disponível em: < <https://www.wineaustralia.com/getmedia/15d2440f-12bc-40a0-94c6-4379d929844f/201003-Managing-downy-mildew?ext=.pdf> >. Acesso em: 11/01/2019.

MAGRINI, E. A. **Tabela de vida para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em condições de laboratório**. 1993, p. 93. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

MAGRINI, E. A.; BOTELHO, P. S. M.; NETO, S. S. Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 3, p. 1-9, jul. 1999.

MCMORRAN, A. A synthetic diet for the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian entomologist**, New Toronto, v. 97, p. 58-62, jan. 1965.

MOSCARDI, F.; BARFIELD, C. S.; ALLEN, G. E. Effects of temperature on adult velvetbean caterpillar oviposition, egg hatch, and longevity. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 74, n. 2, p. 167-171, mar. 1981.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. de 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. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. 1. ed. Brasília: Embrapa Soja, 2012. cap. 4. p. 213-334.

OLIVEIRA, P. H. R.; REIS, R. R. Ácido benzóico (CAS 65-85-0). **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 6, p. 1-15, nov/dez. 2017.

OUYE, M. T. Effects of antimicrobial agents on micro-organisms and pink bollworm development. **Journal of Economic Entomology**, Brownsville, v. 55, n. 6, p. 854-857, dez. 1962.

PARENTE, R. C. P. **Aspectos da análise de resíduos**. 1984. 118f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/USP, Piracicaba, 1984.

PARRA, J. R. P.; MILANO, P.; CONSOLI, F. L.; ZERIO, N. G.; HADDAD, M. L. Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 1, p. 49-57, 1999.

PARRA, J. R. P. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. In: PANIZZU, A. R.; PARRA, J. R. P. **Insect Bioecology and Nutrition for integrated Pest Management**, 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012, cap. 3, p. 51-92.

PARRA, J. R. P.; PANIZZU, A. R.; HADDAD, M. L. Nutritional indices for measuring insect food intake and utilization. In: PANIZZU, A. R.; PARRA, J. R. P. **Insect Bioecology and Nutrition for integrated Pest Management**, 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012, cap. 2, p. 13-49.

PINO, F. A. A questão da não normalidade: uma revisão. **Revista de Economia Agrícola**, São Paulo, v. 61, n. 2, p. 17-33, jul./dez. 2014.

PRADO, M.; SILVA, E. J. N. L. da; DUQUE, T. M.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; ALMEIDA, J. F. A. de; GOMES, B. P. F. de A. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 2, p. 158-163, 2015.

QUÍMICA CREDIE. **Ficha de informações de segurança de produto químico: formol**. 2012. Disponível em: < http://www.tterra.com.br/projetos/quimica_credie/produtos/Formol.pdf >. Acesso em: 09/01/2019.

R CORE TEAM (2014). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

REID, J. C. **Larval development and consumption of soybean leaf foliage by the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), in laboratory**. 1975. Disponível em: < <https://archive.org/details/larvaldevelopment00reid> >. Acesso em: 10/01/2019.

RIBEIRO, Z. A. **Dieta artificial e metodologia de criação massal para o bem-estar de *Helicoverpa armigera***. 2017, f. 137. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 1-13, dez. 2015.

RITZ, C. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 220-229, jan. 2010.

ROEDER, K. A.; KURIACHAN, I.; VINSON, S. B.; BEHMER, S. T. Evaluation of a microbial inhibitor in artificial diets of a generalist caterpillar, *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Science**, Oxford. v. 10. n. 97. p. 1-12. jan. 2010.

ROMANO, J. C.; QUELHAS, M. C. F. **Esterilização por formaldeído**. Disponível em: < <http://www.hospvirt.org.br/enfermagem/port/formal.html> >. Acesso em: 07/01/2019.

SCHRODTER, K.; BETTERMANN, G.; STAFFEL, T.; WAHL, F.; HOFMANN, T. Phosphoric acid and phosphates. In: ELVERS, B. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 7. ed. v. 26. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. Phosphoric acid and phosphates. p. 679-724.

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

SHAPIRO, M. Micro-organisms as contaminants and pathogens in insect rearing. In: KING, E. G.; LEPPLA, N. C. **Advances and Challenges in Insect Rearing**. 1. ed. New Orleans: Agricultural Research Service, 1984. Section 4. p. 130-142.

SIKOROWSKI, P. P.; THOMPSON, A. C. Effects of bacterial contamination on development and blood chemistry of *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Great Britain, v. 77, n. 2, p. 283-285, 1984.

SIKOROWSKI, P. P.; LAWRENCE, A. M. Microbial contamination and insect rearing. **American Entomologist**, v. 40, n. 4, p. 240-253, winter. 1994.

SILVA, D. M. da; HOFFMANN-CAMPO, C. B. BUENO, A. de F.; MOSCARDI, F. Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes temperaturas. In: WORKSHOP SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS E PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS. n. 1, 2012, Jaguariúna. **Resumo...** Jaguariúna: Climapest, 2012, p. 1-8.

SILVA, R. A. da; CARVALHO, C. F.; MATIOLI, J. C. Efeitos de diferentes dietas na biologia da fase adulta de *Mocis latipes* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 45-50, jan. 1991.

SINGH, P.; HOUSE, H. L. Antimicrobials: 'safe' levels in a synthetic diet of an insect, *Agria affinis*. **Journal of Insect Physiology**, Ontario, v. 16, n. 9. p. 1769-1782, set. 1970.

SINGH, P.; BUCHER, G. E. Efficacy of 'safe' levels of antimicrobial food additives to control microbial contaminants in a synthetic diet for *Agria affinis* larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 297-309, set. 1971.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MIRANDA, J. D. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 56, n. 3, p. 359-362, set. 2012.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and Procedures of statistics: with special reference to the biological sciences**. New York: Macgraw-Hill Book Company, Inc. 1960. 481p.

TARGOVNIK, A. M.; ARREGUI, M. B.; BRACCO, L. F.; URTASUN, N.; BAIELI, M. F.; SEGURA, M. M.; SIMONELLA, M. A.; FOGAR, M.; WOLMAN, F. J.; CASCONI, O.; MIRANDA, M. V. Insect larvae: a new platform to produce commercial recombinant proteins. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 431-438, 2016.

THAO, H. T. B.; YAMAKAWA, T. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator?. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 55, n. 2, p. 228-234, 2009.

TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, v. 5, n. 3, p. 232-242, set. 1949.

VAIL, P. V.; HENNEBERRY, T. J.; KISHABA, A. N.; ARAKAWA, K. Y. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 10, n. 1, p. 84-93, fev. 1968.

VANDERZANT, E. S. Defined diets for phytophagous insects. In: SMITH, C. N. **Insect Colonization and Mass production**. 1. ed. New York: Academic Press, 1966. cap. 18. p. 273-302.

VANDERZANT, E. S. Development, significance, and application of artificial diets for insects. **Annual Review of Entomology**, Texas, v. 19, p. 139-160, 1974.

WATSON, J. R. Life-history of the velvet-bean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). **Journal of Economic Entomology**, v. 9, n. 6, p. 521-528, 1916.

ZEILEIS, A.; HOTHORN, T. Diagnostic checking in regression relationships. **R News**, v. 2/3, p. 7-10, dez. 2002.

ZEILEIS, A. Econometric computing with HC and HAC covariance matrix estimators. **Journal of Statistical Software**, v. 11, n. 10, p. 1-17, nov. 2004.

CAPÍTULO 2

***Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidæ) como indicador biológico da expressão de proteína Cry1Ac em folíolos de soja**

RESUMO

Atualmente, a estratégia mais utilizada para o manejo de resistência de insetos (MRI) é o uso de altas doses/ refúgio (ADR), cujo princípio é associar elevada expressão das proteínas inseticidas à adoção de refúgio. Por isso, conhecer a capacidade de expressão de proteínas Bt pelas cultivares é importante dentro do manejo de resistência, devido à necessidade de alta concentração de proteínas Cry nas folhas. Na cultura da soja, os valores de expressões de Cry1Ac encontrados na literatura divergem entre si, quando adotado o método de Elisa para quantificar. A adoção de um indicador biológico, no caso um inseto, pode contribuir com informações sobre o conteúdo de proteínas Cry em cultivares de soja Bt. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho é inferir a quantidade de proteína Cry1Ac em folíolos de soja BRS 1010 IPRO utilizando *Anticarsia gemmatalis* como indicador biológico. Para tanto, compararam-se as concentrações letais obtidas com extratos de folhas da cultivar com as concentrações letais de um padrão conhecido de proteína Cry1Ac, e assim, inferiu-se a concentração de proteína Cry1Ac em folíolos de soja. Amostras de folhas foram coletadas em diferentes períodos do desenvolvimento da cultura e foram armazenados até a realização dos ensaios. Os bioensaios foram conduzidos em bandejas de 128 células, e cada célula recebeu 1 ml de dieta artificial. Os extratos de folha foram preparados através da maceração de folha em água, dentro de microtubos (1,5 ml), os quais foram centrifugados para retirada do sobrenadante. Diluições do sobrenadante e da proteína Cry1Ac foram aplicadas e espalhadas sobre a superfície de dieta em volume de 20 µl e, após a secagem do líquido, uma lagarta neonata foi adicionada a cada célula. Cada ensaio contou com 7 diluições e uma testemunha (água destilada), com 4 repetições de 16 lagartas cada. As concentrações de proteína obtidas estão na faixa de 2,17 a 6,04 µg de Cry1Ac.g⁻¹ de folha fresca, conforme padrão utilizado na comparação. Observou-se, também, oscilação da concentração de proteína ao longo do ciclo da cultura, com expressão máxima no estágio R6. O método demonstrou-se promissor para quantificação de proteínas Cry.

Palavras-chave: extrato de folhas, quantificação, proteína Cry, Erebidæ.

CHAPTER 2

***Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) as a biological indicator of Cry1Ac protein expression in soybean leaflets**

ABSTRACT

Currently, the most used strategy for the management of insect resistance (MIR) is the use of high doses / refuge (HDR), whose principle is to associate high expression of insecticidal proteins with the adoption of refuge. Therefore, knowing the capacity of Bt proteins expression by cultivars is important within the management of resistance, due to the need for high concentration of Cry proteins in the leaves. In soybean crop, the values of Cry1Ac expressions found in the literature differ from each other, when Elisa method was used to quantify. The adoption of a biological indicator, in the case of an insect, may contribute with information about the content of Cry proteins in Bt soybean cultivars. For this reason, the objective of this work is to infer the amount of Cry1Ac protein in BRS 1010 IPRO soybean leaflets using *Anticarsia gemmatalis* as a biological indicator. For this, lethal concentrations obtained with leaf extracts of the cultivar were compared with the lethal concentrations of a known Cry1Ac protein standard, and thus the concentration of Cry1Ac protein in soybean leaflets was inferred. Leaflet samples were collected at different periods through the crop development and stored at -80 °C until tests. The bioassays were run on 128-cell trays, and each cell received 1 ml of artificial diet. Leaflet extracts were prepared by macerating tissues in sterile water, into microtubes (1.5 ml), which were centrifuged for extraction of the supernatant. Dilutions of the leaf extracts and the Cry1Ac protein standard were applied (20 µl volume) and spread on the diet surface and after drying, neonate caterpillars were added individually to each cell. Each assay had 7 dilutions and one control (distilled water), with 4 replicates of 16 caterpillars each. The protein concentrations obtained are in the range of 2.17 to 6.04 µg Cry1Ac. g⁻¹ of fresh leaf, according to the standard used in the comparison. Protein concentration oscillation was also observed throughout the crop cycle, with high expression at the R6 stage. This method has been shown to be promising to quantify Cry protein expression.

Key words: leaf extract, quantification, Cry protein, Noctuidae.

1 INTRODUÇÃO

Forte competidor no mercado de soja, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção da oleaginosa no mundo, correspondendo a aproximadamente 32,7% da produção mundial (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019). É fato que a cultura da soja tem papel importante dentro do setor agropecuário brasileiro, e essa importância foi alcançada com o uso e desenvolvimento de tecnologias que modernizaram o sistema produtivo da cultura. Exemplo de tecnologia adotada atualmente no campo é o uso de cultivares de soja Bt, as quais são resistentes a algumas espécies de lepidópteros pela síntese de proteínas inseticidas.

Aprovada no ano de 2010 e lançada no mercado no ano de 2013 (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA, 2018), a tecnologia Intacta RR 2 PRO permite o controle de algumas espécies de lagartas, minimizando a necessidade de aplicação de inseticidas químicos na cultura da soja devido à produção de proteína Cry1Ac no tecido vegetal. A eficácia dessa tecnologia depende exclusivamente do potencial de expressão do gene inserido na planta e da utilização de refúgio. Portanto, conhecer os níveis de expressão da proteína é importante para o manejo apropriado da resistência a essa toxina.

Trabalhos como os de Macrae et al. (2005) e Yu et al. (2013) buscaram quantificar a expressão da proteína em folhas de soja através do método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), e obtiveram resultados contrastantes quanto ao potencial de expressão de proteína Cry1Ac em cultivares de soja, em que Yu et al. (2013) encontraram até $12 \mu\text{g Cry1Ac.g}^{-1}$ folha fresca e Macrae et al. (2005) quantificaram no mínimo $50 \mu\text{g Cry1Ac.g}^{-1}$ folha fresca. A adoção de um indicador biológico pode auxiliar nos trabalhos de quantificação da expressão de proteínas Cry em cultivares Bt, com objetivo de reduzir as divergências existentes entre os valores de expressão atualmente encontrados na literatura, tornando-os mais confiáveis.

A variabilidade genética existente dentro de populações de lagartas possibilita diferentes níveis de tolerância a proteínas Bt entre indivíduos, o que nos permite calcular curvas de suscetibilidade de diferentes populações a essas proteínas inseticidas. Tendo em vista que as curvas de suscetibilidade à proteína Cry1Ac para *A. gemmatilis* são conhecidas e que apresenta elevada suscetibilidade quando comparado a outras espécies, o inseto pode atuar como indicador biológico da

quantidade dessa proteína presente nas folhas de soja e contribuir com os trabalhos atuais de quantificação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Inferir a quantidade de proteína Cry1Ac presente em folhas de soja BRS 1010 IPRO em diferentes estádios fenológicos da cultura, utilizando *A. gemmatalis* como indicador biológico.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a CL₅₀ de Cry1Ac para *A. gemmatalis* proveniente da criação da Embrapa Soja.
- Determinar a CL₅₀ de extratos de folhas de soja BRS 1010 IPRO, de diferentes estádios, para *A. gemmatalis* proveniente da criação da Embrapa Soja.
- Avaliar a metodologia do uso de lagartas como indicador biológico da quantidade de proteínas Cry presentes em folhas de soja.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Organismos geneticamente modificados

Desde o seu lançamento comercial no ano de 1996, as culturas transgênicas têm entregado benefícios econômicos, agronômicos, ambientais, sociais e na saúde (ISAAA, 2017). A modificação genética das culturas permitiu a transformação de plantas de uma forma inovadora e tem grande potencial para combater problemas importantes no domínio agronômico (PRASAD et al., 2017), sendo que as culturas transgênicas já são parte integrante da agricultura do presente, e já é difícil diferenciá-las de culturas convencionais. Além disso, a área que adota culturas geneticamente modificadas cresceu desde sua inserção no mercado e essas culturas já podem ser encontradas em 28 países (BAKSHI; DEWAN, 2013).

No processo de transformação gênica, os genes de interesse do doador (planta, bactéria ou vírus) são transferidos para a planta hospedeira empregando vários métodos, tais como: mediação por *Agrobacterium*, bioblástica (bombardeamento de partículas), pistola de micro projétil, eletroporação, uma técnica à base de fibra de carboneto de silício, fusão de protoplasto mediada por polietilenoglicol e transferência gênica mediada por lipossomas (RIVERA et al., 2012).

A modificação gênica tem sido utilizada por pesquisadores para aumentar a produtividade de culturas pelo melhoramento de certos traços, como respostas de plantas a estresses bióticos e abióticos (ABIRI et al., 2016; ASHRAF et al., 2008; LAU et al., 2014; TAIT, 1999; WANG; XUE; LI, 2005), que, com o uso da transgenia, pode ser alcançado mais rapidamente comparada à aplicação de seleção (VERMA et al., 2011).

3.2 Plantas “Bt”

Plantas resistentes geneticamente modificadas representam um novo método de controle de pragas em vários agroecossistemas. Essas plantas são caracterizadas por expressarem genes de uma bactéria entomopatogênica chamada *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) que codifica a expressão de proteínas inseticidas e torna essas plantas resistentes a determinadas espécies de lepidópteros (CHRISTOU, 2005; MARTINS-SALLES et al., 2017; MENDELSON et al., 2003). As culturas Bt

produzem essas proteínas na maioria dos tecidos, as quais matam insetos suscetíveis que se alimentam desses tecidos. Isso significa que essas culturas são eficientes no controle de insetos cujos pesticidas não são capazes de atingir, como aqueles que possuem o hábito de perfurar e manter-se dentro do colmo (BAKSHI; DEWAN, 2013).

Há muitos benefícios na adoção de plantas Bt na agricultura, incluindo o controle mais efetivo de insetos praga, especificidade das proteínas inseticidas e redução do uso de inseticidas, e, por consequência, a manutenção de inimigos naturais nas áreas agrícolas, tornando o sistema mais sustentável (MENDELSON et al., 2003; CHRISTOU, 2005; BAKSHI; DEWAN, 2013; MARTINS-SALLES et al., 2017). Por isso, são amplamente utilizadas no controle dos principais lepidópteros e coleópteros, e são importantes ferramentas no manejo integrado de pragas (MIP) (ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006).

3.3 Bactéria *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria entomopatogênica gram-positiva, em forma de bastonete e tem sido isolada mundialmente em uma grande diversidade de ecossistemas, incluindo água, solos, insetos mortos, poeira de silos, folha de árvores decíduas, diversas coníferas, e mamíferos insetívoros (BOBROWSKI et al., 2003; DOW, 1993; HOFTE; WHITELEY, 1989; KNOWLES; RAYMOND et al., 2010; ROH et al., 2007; PALMA et al., 2014). Essa bactéria foi descoberta no início do século 20 pelo bacteriologista Ishiwata, que reportou organismos infectando *Bombyx mori* (L.), prejudicando a indústria de seda japonesa. Posteriormente, na província de Thuringia na Alemanha, o pesquisador Berliner reisolou a bactéria em larvas de *Ephestia kuehniella* (Zeller), e a “batizou” de *Bacillus thuringiensis* conforme a sua localidade (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992; MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2014).

As diferentes linhagens da bactéria produzem uma ampla variedade de proteínas inseticidas ativas contra larvas de diversas ordens. Isso tem levado os produtos à base de Bt a tornarem-se os inseticidas biológicos mais vendidos (SCHNEPF et al., 1998; ROH et al., 2007; PALMA et al., 2014), com aproximadamente 2% do mercado de inseticidas (BRAVO et al., 2011).

Monnerat et al. (2009) relataram a ocorrência natural de *Bacillus thuringiensis* em diferentes tecidos na cultura do algodão, em que as bactérias foram absorvidas pelas raízes e foram translocadas para diferentes partes da planta. Houve, também, ação inseticida promovida pelo tecido foliar sobre *Spodoptera frugiperda* e *Plutella xylostella* na ordem de 10-20% de mortalidade.

Compostos produzidos pela bactéria, como protoxinas e toxinas solúveis, são altamente específicos para seus hospedeiros e ganharam importância mundial como alternativa aos inseticidas químicos. A utilidade dessas proteínas inseticidas também tem motivado a busca por novos isolados dos mais diversos habitats, a fim de identificar e caracterizar novas proteínas com diferentes especificidades (PALMA et al., 2014).

3.3.1 Proteínas produzidas por *B. thuringiensis*

Linhagens de *B. thuringiensis* sintetizam proteínas denominadas δ -endotoxinas, também conhecidas por proteínas Cry (crystal) e Cyt (cytolytic), durante o início da esporulação e fase de crescimento estacionário, como inclusões cristalinas parasporais (PALMA et al., 2014). Durante a fase vegetativa, também são produzidas proteínas com ação inseticida, denominadas VIP (vegetative insecticidal protein) (CHAKROUN et al., 2016). Além desses grupos proteicos, a bactéria sintetiza uma série de outras toxinas com potencial inseticida (PALMA et al., 2014).

3.3.2 Proteínas Cry

As proteínas Cry são assim conhecidas porque são sintetizadas durante o processo de esporulação e existem na forma de cristais dentro das bactérias, os quais permanecem inativos até a sua clivagem no intestino médio dos insetos (SCHNEPF et al., 1998; POGOTT; ELLAR, 2007; PALMA et al., 2014). Atualmente, o “Bt Nomenclature Committee” (2019) tem identificado 78 tipos diferentes de proteínas Cry classificadas (Cry1 – Cry78).

Toxinas Cry pertencem à família de toxinas Cry com 3 domínios, que apresentam diferenças claras na sua sequência de aminoácido, mas todas partilham estrutura de três domínios notavelmente semelhante e conservada (MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; MAAGD et al., 2003; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013).

As proteínas Cry atuam no intestino médio das lagartas, em que os cristais ingeridos passam por um processo de dissolução em pH alcalino e, posteriormente, sofrem ativação proteolítica, que transformam as proteínas Cry em polipeptídeos tóxicos. Esses fragmentes ligam-se a receptores específicos presentes na superfície das células epiteliais e formam oligômeros, criando poros permeáveis não seletivos a íons inorgânicos, aminoácidos e açúcares (KIROUAC et al., 2002; JUÁREZ et al., 2007; SOBERÓN et al., 2007; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012). Tais poros causam lise nas células epiteliais e promovem desarranjo no intestino médio, levando o inseto à morte. Além disso, esporos podem colonizar, germinar e se replicar na hemolinfa, eventualmente matando o inseto por septicemia (HOFTE; WHITELEY, 1989; KNOWLES; DOW, 1993; PALMA et al., 2014; RAYMOND et al., 2010; SCHNEPF et al., 1998).

Três diferentes modelos têm sido propostos para explicar o modo de ação de proteínas Cry de três domínios, o modelo ‘clássico”, o modelo de ligação sequencial e o modelo via sinalização (VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012; PALMA et al., 2014).

3.4 Soja Bt no controle de lepidópteros

Com o avanço da biologia molecular, genes das proteínas Bt foram inseridos em cultivares, fazendo delas plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos (ROH et al., 2007). O primeiro relato de inserção e expressão de gene Bt em soja foi feito por Parrot et al. (1994), em que houve a expressão de proteína Cry1Ab. Dois anos depois, a primeira inserção para síntese de Cry1Ac em soja foi relatada por Stewart et al. (1996), cujos embriões somáticos da cultivar Jack foram transformados utilizando bombardeamento de micropartículas contendo gene de *B. thuringiensis*. Walker et al. (2000) avaliaram a eficácia de cultivar Jack com gene Bt e demonstraram sua resistência a *Helicoverpa zea* (Boddie), *A. gemmatilis*, *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller).

Macrae et al. (2005), demonstraram linhagens expressando altas doses de proteína sintética TIC 107, que é praticamente idêntica a Cry1Ac, e evidenciaram a alta eficiência no controle de *A. gemmatilis* e *C. includens*. Bernardi et al. (2012) mostraram efetividade da cultivar gerada do cruzamento do MON 87701 x MON 89788

no controle de *A. gemmatilis* e *C. includens*. Essa cultivar expressava a proteína sintética TIC 107, como no estudo abordado anteriormente. Esse mesmo cruzamento também apresentou controle de *Chloridea virescens* (Fabricius) (BERNARDI et al., 2014b) e *Helicoverpa armigera* (Hübner) (DOURADO et al., 2016), mas não se mostrou eficiente no controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera eridania* (Cramer) (BERNARDI et al., 2014a).

No ano de 2008, Homrich et al., relataram a transgenia da cultivar IAS5 que recebeu gene para codificação de Cry1Ac, a qual apresentou alta toxicidade a *A. gemmatilis*. Marques et al. (2016) relataram o primeiro evento de piramidação de proteínas Bt em cultivar de soja no Brasil. Sintetizando as proteínas Cry1F e Cry1Ac, a tecnologia denominada de Conkesta apresenta controle significativo das espécies *A. gemmatilis*, *C. includens*, *C. virescens* e *S. cosmioides* durante toda a fase vegetativa e reprodutiva da cultura. Marques et al. (2017) trazem dados sobre o controle dessa mesma tecnologia para espécies secundárias da cultura, em que *H. armigera* e *E. lignosellus* foram controladas efetivamente durante as fases vegetativa e reprodutiva, porém, para a espécie *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) o controle foi moderado.

3.5 Alta dose/ refúgio para manejo de resistência

Estratégias atuais do Manejo de Resistência de Insetos (MRI) para retardar a seleção de resistência são baseadas no uso da estratégia alta dose/ refúgio (ADR). A estratégia de ADR possui três pilares: alelos de resistência de insetos-alvo são raros e recessivos; toxinas transgênicas são expressas em doses suficientes para matar ao menos 95% dos indivíduos heterozigotos com produção de proteína, ao menos, 25 vezes maior que a CL₉₉ ; e, por fim, a adoção de refúgio para produção de indivíduos suscetíveis heterozigotos para acasalarem com homozigotos resistentes (COATES, 2016; GOULD, 1998; TABASHNIK; RENSBURG; CARRIÈRE, 2009).

Perlak et al. (1991) demonstraram alterações específicas na sequência de DNA inserido em cultivares para síntese de proteínas Bt que possibilitava a expressão dessas proteínas em grande quantidade. Essa descoberta possibilitou a geração dos TICs, cuja expressão de proteínas é mais de 20 vezes maior que a CL₉₉ de indivíduos suscetíveis, em que seria esperada a morte de quase todos os insetos heterozigotos

mesmo se a resistência não fosse fenotipicamente recessiva (GOULD, 1998). A estratégia de ADR, com uma ou duas proteínas, é extremamente atrativa de uma simples perspectiva teórica, mas uma série de fatores pode interferir no seu sucesso (GOULD, 1998), como os níveis de expressão de proteínas discutidos por Macrae et al. (2005) na cultura da soja.

Macrae et al (2005) verificaram a expressão de altas doses de proteínas TIC 107 em cultivares de soja, que é praticamente idêntica à Cry1Ac. Bernardi et al. (2012), verificando a mortalidade causada por tecido liofilizado da mesma cultivar de soja Bt diluído 25 vezes observaram, mortalidade de 100% de indivíduos de *A. gemmatilis*, diferentemente para *C. includens*, cuja mortalidade não foi total. Com isso, a estratégia de ADR é válida para *A. gemmatilis*, mas não para *C. includens* na cultura da soja Bt.

3.6 Quantificação de proteínas Cry em tecido vegetal

Variação na eficácia do controle de plantas Bt e os mecanismos envolvidos precisam ser completamente compreendidos para planejar estratégias racionais de manejo de resistência e controlar efetivamente as pragas-alvo, aumentando a expressão de endotoxinas através do manejo agrônomico (DONG; LI, 2007). Por isso, técnicas válidas de bioensaios (GREENPLATE, 1999) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram estabelecidos para quantificar mudanças na concentração de proteínas Cry (DONG; LI, 2007). Na cultura do algodão, trabalhos para quantificação de proteína Cry são comuns e a adoção do método de ELISA é predominante. Os diversos resultados obtidos em trabalhos para quantificação de Cry1Ac, através do método ELISA, apresentam variabilidade, em que concentrações de proteína por grama de folha fresca variam de menos de 1 µg até mais de 30 µg (BLAISE; KRANTHI, 2011; KNIGHT; HEAD; ROGERS, 2013; LOU et al., 2008; SINGH et al., 2016; TORRES; RUBERSON; ADANG, 2006). Para a cultura, da soja poucos são os trabalhos para quantificar a expressão de proteínas presentes no tecido vegetal.

Na cultura da soja, Stewart et al. (1996) encontraram concentração de proteína Cry1Ac variando de 0 a 46 ng.mg⁻¹ de proteína extraível. Seguindo a mesma unidade de medida, Miklos et al. (2007) mostraram valores de concentração de 3 linhagens de soja, os quais variam entre 0,52 e 6,12 µg de proteína TIC 107.mg⁻¹ de proteína total extraível. Macrae et al. (2005) e Yu et al. (2013) demonstraram

diferenças na concentração de proteína Cry1Ac ao longo do ciclo da cultura da soja. Macrae et al. (2005) apresentaram uma tendência crescente na concentração da proteína ao longo do ciclo da soja, com máxima expressão de até 250 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de folha fresca em R6. Yu et al. (2013) observaram oscilações no conteúdo de Cry1Ac, com valores mínimos e máximos próximos de 4 e 14 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de folha fresca. Essa diferença entre os trabalhos de Macrae et al. (2005) e Yu et al. (2013) impede comparações adequadas dos níveis de Cry1Ac sintetizados.

Oscilações do conteúdo de Cry1Ac, ao longo do ciclo, também foram mostradas por Olsen et al. (2005) na cultura do algodão, com indicação de variação na eficácia de controle de insetos. Além dessa oscilação ao longo do ciclo, as plantas podem apresentar diferença de concentrações de proteínas Cry em diferentes áreas de uma mesma folha, como observado na cultura do milho por Abel e Adamczyk (2004), o que não foi problema no controle de *S. frugiperda* e *D. grandiosella* (D.) devido à alta expressão de proteína. Esses mesmos autores relataram a diferença na concentração de proteína Cry no tecido foliar seguindo a variação de coloração, em que tecido verde apresentaram maior quantidade de proteína do que tecidos verde-amarelados e amarelo-esbranquiçados. Alterações na fisiologia da planta, associadas à maturação, contribuem para alteração na eficácia de toxinas Bt (OLSEN et al., 2005).

O fornecimento de nitrogênio é outro fator que pode influenciar na quantidade de proteína Cry. A fertilização nitrogenada pode aumentar a concentração de proteínas Bt em folhas, maçãs e capulho de algodão (COVIELLA; STIPANOVIC; TRUMBLE, 2002; SAINI; DHAWAN, 2014). As práticas de manejo adotadas pelos produtores, bem como o plantio em diferentes localidades, também podem provocar variações no conteúdo de proteína Cry no tecido vegetal. Diferentes cultivares também podem expressar uma mesma proteína em quantidades diferentes (HUANG et al., 2014).

3.7 Estresses abióticos na expressão de proteínas Cry em plantas Bt

Fatores abióticos estressantes podem influenciar na concentração de proteína Bt presente na planta. O fator temperatura pode afetar tanto em condições frias como em condições quentes, levando a reduções de até 40% em baixas temperaturas (CHEN et al., 2012). Altas temperaturas podem provocar degradação de proteínas

presentes no material vegetal, que resulta o declínio da concentração de proteína Cry1A na cultura do algodão, por exemplo (CHEN et al., 2005). Essas variações de temperaturas impactam as diversas partes da planta de maneira heterogênea, ou seja, os diferentes tecidos sofrem diferentes graus de influência da temperatura, o que resulta diferentes alterações no conteúdo de proteína nos tecidos vegetais (WU et al., 2002).

A época de semeadura e o regime de umidade também podem alterar a concentração de proteínas Bt. No caso de algodão, semeadura no cedo aumenta a expressão de proteína Cry comparada a plantios tardios, e o regime de umidade influencia em determinados estádios da cultura, em que a presença de alta umidade no solo incrementa a quantidade de proteína Cry (HALLIKERI et al., 2009). No caso de estresse por condições de seca, a cultura do milho não sofreu alterações nos níveis de expressão de proteína Cry, que se manteve em nível constante (GULLÌ et al., 2015).

O estresse salino é outro fator abiótico que pode causar redução da quantidade de proteína Cry no tecido vegetal. No caso de algodão, o conteúdo de proteínas solúveis aumenta nas folhas e diminui em hastes e raízes devido ao estresse salino, contudo o conteúdo de proteína Bt decai (JIANG et al., 2006; LOU et al., 2008; LUO et al., 2018; WANG et al., 2018). Combinado ao estresse salino, o encharcamento de raízes pode reduzir o conteúdo total de proteína em até 65% e em 72% a concentração de proteína Bt na cultura do algodão (LOU et al., 2008).

Elevadas concentrações de CO₂ atmosférico pode impactar na concentração de proteína quando correlacionada a doses de adubação nitrogenada, em que altas doses de fertilizante associadas à concentração alta de CO₂ passam a reduzir a quantidade de proteína Bt (COVIELLA; STIPANOVIC; TRUMBLE, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bioensaios

Em diferentes períodos do desenvolvimento da cultura, uma amostra de folíolos de soja ($n=10$) da cultivar BRS 1010 IPRO foi coletada durante a safra 2017/18 e essas amostras foram armazenadas em ultra freezer a -80°C até a realização dos ensaios. Essa soja foi implantada a campo no dia 19/10/2017 e seu manejo seguiu as recomendações para a região. Coletaram-se folíolos 32, 43, 62, 81, 102 e 123 dias após o plantio (DAP). Para determinar a quantidade de proteína existente nos folíolos, foram realizados bioensaios com intuito de calcular a CL_{50} a partir da mortalidade causada por diluições de extratos de folhas Bt e compará-la com a CL_{50} de um padrão com quantidade conhecida de proteína Cry1Ac.

Os bioensaios com extratos de folíolos iniciaram-se com a obtenção de um extrato inicial através da maceração do tecido foliar de 4 subamostras de folíolos em água destilada (proporção de 1g de folíolos: 10 ml de água), com peso aproximado de 70 mg. A maceração dos tecidos foi realizada em microtubos (Eppendorf 1,5 ml) com auxílio de pistilo plástico e acréscimo de abrasivo carborundum em pó (Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ). Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 4 minutos com valor de $g = 9.500$ e $\text{rcf} = 10621$ (Centrifuge 5804 Eppendorf – Hexis). Retirou-se, então, uma alíquota de mesmo volume de cada microtubo para obter o extrato inicial e, a partir deste, obtiveram-se as diluições seriadas. Esse procedimento foi realizado para cada amostra coletada.

Com o extrato inicial formado, sete diluições foram preparadas para realizar o bioensaio e determinar a CL_{50} . Em cada bioensaio, diferentes diluições foram ajustadas por meio de ensaios prévios, devido a divergências no conteúdo de proteína nos folíolos e para obter mortalidade acima de 1% e abaixo de 99%. Além das sete diluições, utilizou-se água destilada como testemunha, totalizando 8 tratamentos.

Os bioensaios executados para obtenção de CL_{50} foram realizados em bandejas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ) subdivididas em 8 partes com 16 células cada. Em cada célula, 1 ml de dieta artificial recomendada no Capítulo 1 foi acrescentado, e seu preparo ocorreu da mesma maneira. Na superfície dessa dieta, uma alíquota de 20 μl de solução tratamento foi acrescentada e espalhada para garantir a uniformidade de distribuição. Após a secagem do

conteúdo, uma lagarta neonata de *A. gemmatilis* foi acondicionada em cada células. Para cada tratamento, esse procedimento foi realizado 64 vezes, contabilizando 4 repetições de 16 lagartas dispostas em delineamento inteiramente aleatorizado.

O estudo com padrão conhecido de proteína Cry1Ac ocorreu da mesma maneira, em que se utilizou MVP II, uma formulação comercial contendo toxina encapsulada em células de *Pseudomonas fluorescens* com 11,2% de proteína (GILROY; WILCOX, 1992). A partir deste, sete concentrações de proteína foram preparadas para representar, ao se inocular 20 µl de solução na superfície da dieta, 0,5; 0,333; 0,222; 0,148; 0,099; 0,066 e 0,044 ng de Cry1Ac/cm² de dieta artificial. A testemunha utilizada também foi água destilada totalizando os 8 tratamentos, cada um com 4 repetições de 16 lagartas.

As lagartas utilizadas nos ensaios foram provenientes da criação massal da Embrapa Soja, criadas conforme metodologia adaptada de Hoffmann-Campo; Oliveira e Moscardi (1985). As bandejas eram armazenadas em câmaras B.O.D. a 26 ± 2°C, UR de 60 ± 10% e fotoperíodo de 14 horas. As avaliações foram realizadas após 7 dias.

4.2 Metodologia estatística

A análise de dados foi realizada utilizando-se o modelo Log-Logístico representado na Equação 1 com quatro parâmetros (RITZ, 2010) em ambiente R, adotando-se o pacote drc para o ajuste dos modelos e estimações das concentrações letais (RITZ; STREIBIG, 2005). Esse pacote foi empregado para se obterem as estimativas dos parâmetros das equações, e os pacotes lme4 (ZEILEIS, HOTHORN, 2002) e Sandwich (ZEILEIS, 2004) foram utilizados para se ajustarem os erros padrões das estimativas quanto à presença de valores extremos (outliers).

$$f(x; b, c, d, e) = c + \frac{d-c}{1+(\frac{x}{e})^b} \quad (1)$$

Os parâmetros da Equação 1 possuem interpretação biológica direta. Assumiram-se restrições para os parâmetros *c* e *d*, em que os valores de *c* seriam

sempre ≥ 0 e valores de d seriam sempre ≤ 1 . Esses parâmetros representam os limites inferiores e superiores, respectivamente. O valor de e remete à CL_{50} , b é proporcional ao incremento de mortalidade por unidade de princípio ativo na proximidade da CL_{50} . O valor de x são as concentrações de princípio ativo e os valores de f representam as mortalidades.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios com Cry1Ac

Dois bioensaios foram realizados para cálculo da CL_{50} de proteína Cry1Ac e para obtenção das curvas de mortalidade. As curvas apresentadas na Figura 2.1 tiveram comportamentos diferentes e demonstram diferenças significativas entre a faixa aproximada de 30 a 90% de mortalidade. Com isso, os bioensaios diferem significativamente quanto a CL_{50} de proteína Cry1Ac.

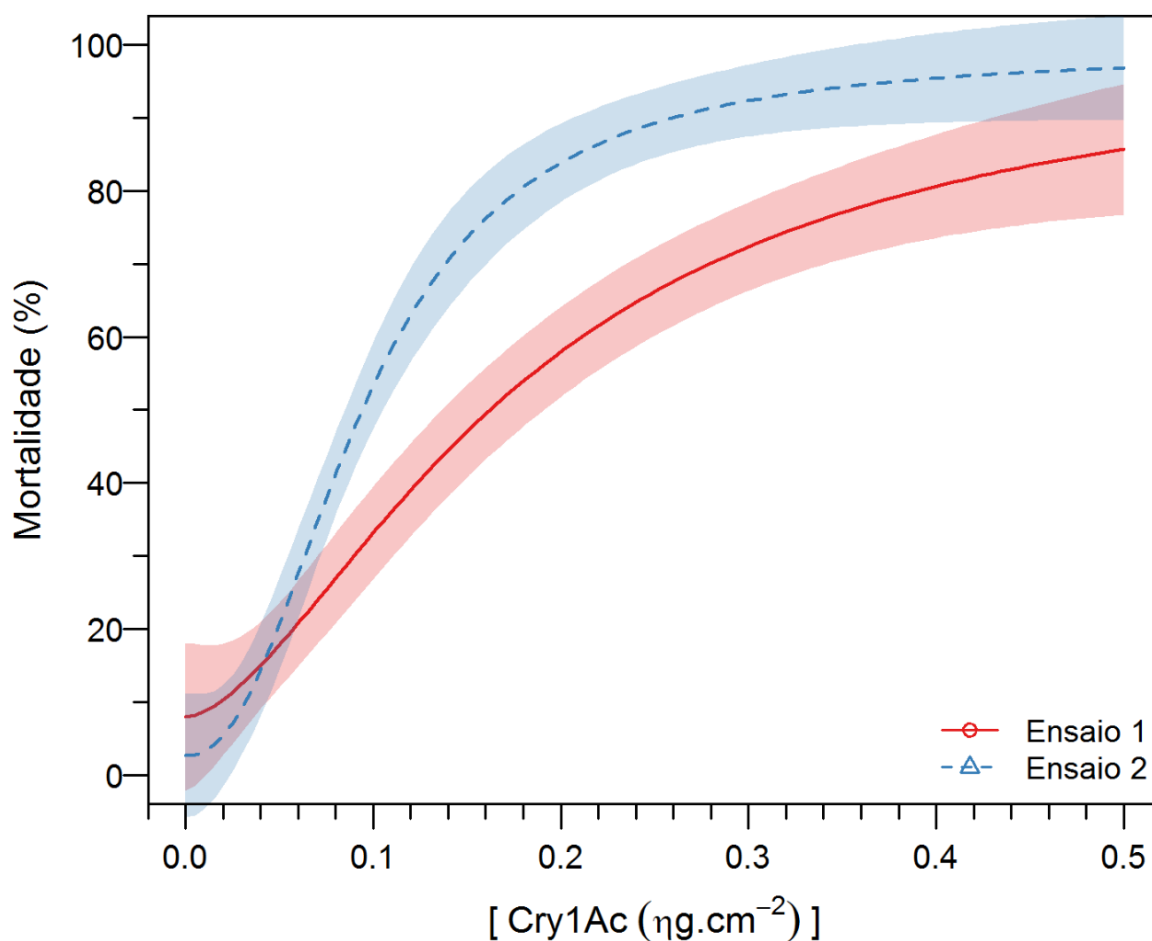


Figura 2.1 – Curvas de mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* para proteínas Cry1Ac espalhada em superfície de dieta artificial.

A CL_{50} calculada com os dados do primeiro ensaio foi de $0,18 \text{ ng.cm}^{-2}$ (IC: $0,10 - 0,26$) de proteína, enquanto, no segundo ensaio, o valor foi a metade, com CL_{50} de $0,09 \text{ ng.cm}^{-2}$ (IC: $0,08 - 0,11$) de proteína. Entretanto, variações nessa ordem são frequentes na realização de bioensaios de dose/ reposta. Os valores de b das curvas

(Tabela 2.1) que apontam a inclinação da curva na proximidade da CL_{50} não diferiram significativamente, embora o valor de b do ensaio 2 tenha sido maior.

Tabela 2.1 – Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis*, proveniente de criação massal da Embrapa Soja, à proteína Cry1Ac proveniente do padrão MVP II com 11,2% de concentração. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL_{50} ; CL_{50} = concentração letal para 50% dos indivíduos; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL_{50}}$ = erro padrão da estimativa da CL_{50} ; IC = intervalo de confiança para CL_{50} .

Bioensaios	N	$b \pm \hat{\sigma}_b$	CL_{50} (ng.cm ⁻²)	$\hat{\sigma}_{CL_{50}}$	95% - IC
Ensaio 1	448	-1,66 ± 0,24	0,18	0,037	0,10 – 0,26
Ensaio 2	448	-2,27 ± 0,40	0,09	0,008	0,08 – 0,11

5.2 Bioensaios com extratos de folhas de soja Bt

A CL_{50} apresentou maior valor para as amostras de folíolos coletados aos 123 dias após o plantio (DAP). Já o menor valor foi encontrado para a amostra coletada aos 102 DAP. O valor de b diferiu significativamente apenas das amostras coletadas 102 e 123 DAP, em que 102 DAP apresentou inclinação superior na proximidade da CL_{50} . Os demais valores de b não diferiram significativamente entre si (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* a extratos de folíolos de soja Bt coletados em diferentes períodos do ciclo da soja. N = número de insetos; b = taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL_{50} ; CL_{50} = concentração letal para 50% dos indivíduos expressa em µg de folha. µl⁻¹.cm⁻²; $\hat{\sigma}_b$ = erro padrão da estimativa b ; $\hat{\sigma}_{CL_{50}}$ = erro padrão da estimativa da CL_{50} ; IC = intervalo de confiança para CL_{50} .

Amostra de folhas (DAP*)	N	$b \pm \hat{\sigma}_b$	CL_{50} (µg.µl ⁻¹ .cm ⁻²)	$\hat{\sigma}_{CL_{50}}$	95% - IC
20/11/2017 (32)	448	-3,60 ± 1,03	1,69	0,14	1,40 – 1,98
01/12/2017 (43)	448	-2,89 ± 0,58	1,76	0,13	1,50 – 2,01
20/12/2017 (62)	448	-2,24 ± 0,37	2,07	0,20	1,65 – 2,49
08/01/2018 (81)	448	-3,19 ± 0,82	1,72	0,13	1,44 – 1,99
08/02/2018 (102)	448	-3,34 ± 1,04	1,49	0,14	1,20 – 1,79
01/03/2018 (123)	448	-1,95 ± 0,25	2,59	0,28	2,00 – 3,17

*DAP – dias após o plantio.

As curvas de mortalidade de *A. gemmatilis*, causada pelos tecidos foliares para cada data coletada, estão representadas na Figura 2.2. Evidenciam-se diferenças das concentrações de proteína Cry1Ac entre as amostras coletadas.

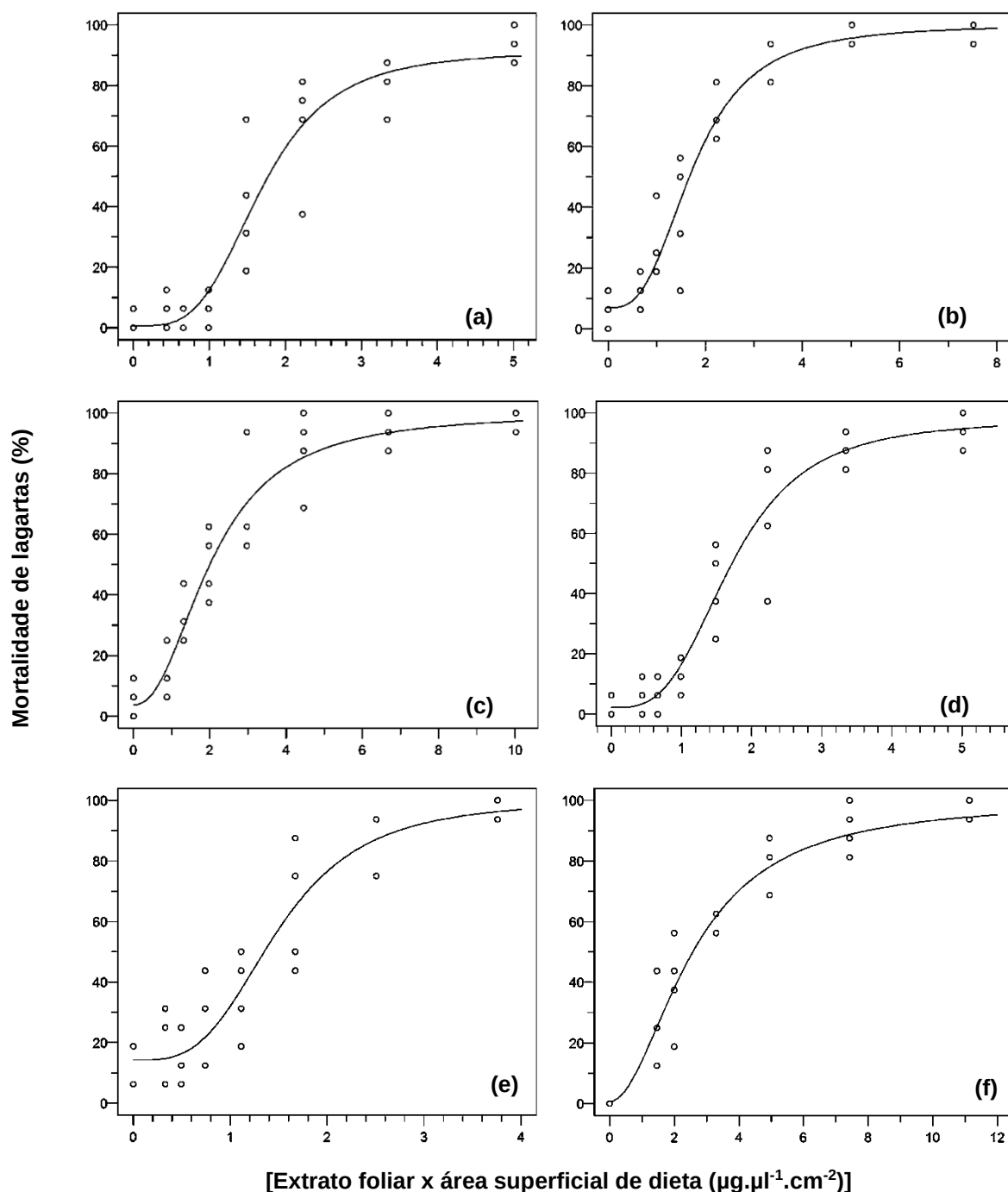


Figura 2.2 – Curvas de mortalidade de *Anticarsia gemmatilis* em função da concentração de tecido foliar de soja Bt coletado em diferentes períodos do ciclo da cultura e aplicado na forma de extrato em superfície de dieta artificial. (a) 32 DAP; (b) 43 DAP; (c) 62 DAP; (d) 81 DAP; (e) 102 DAP; (f) 123 DAP.

Os resultados obtidos para CL_{50} de extratos de tecidos foliares Bt para *A. gemmatalis* apresentaram variação ao longo do ciclo da cultura, demonstrando diferença na concentração de proteína Cry1Ac no tecido vegetal das amostras coletadas (Figura 2.3). A oscilação encontrada para CL_{50} é inversamente proporcional à concentração de proteína presente na folha, ou seja, quanto maior a CL_{50} da amostra, menor a concentração de proteína Cry1Ac no tecido foliar.

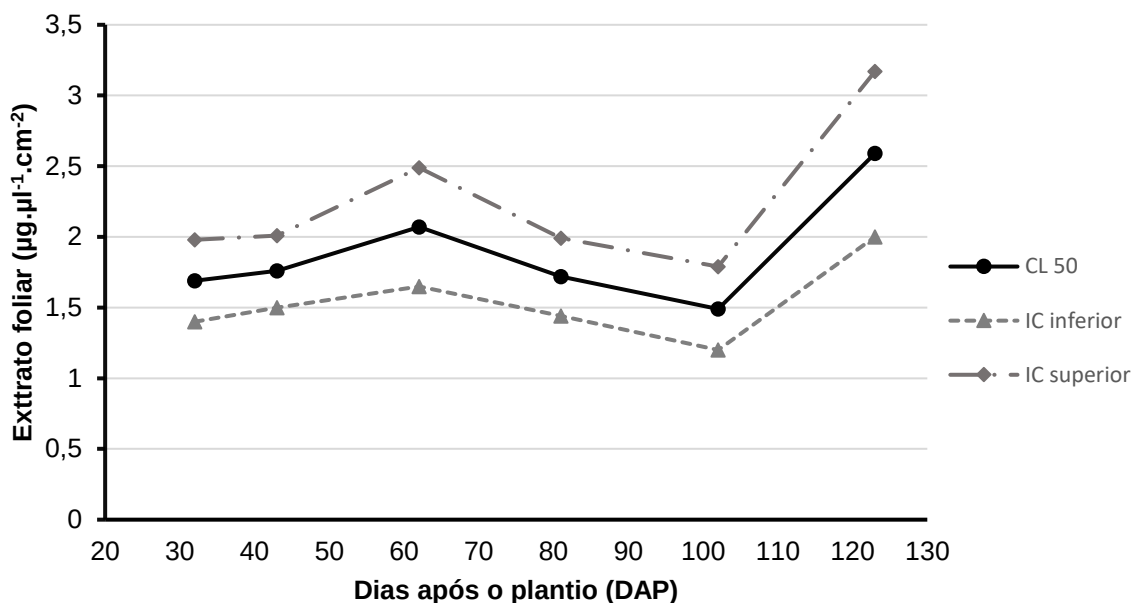


Figura 2.3 – CL_{50} de *Anticarsia gemmatalis* para extratos de folhas BT coletadas em diferentes períodos da cultura, espalhados em superfície de dieta artificial, e Intervalos de Confiança (IC = 95%) superiores e inferiores para os valores obtidos.

Para determinação das curvas de mortalidade, os extratos foliares foram diluídos em diferentes concentrações, cuja faixa de diluição variou conforme amostra de folíolos, com objetivo de obter mortalidade acima de 1% e menor que 99% para os tratamentos. Na amostra coletada aos 123 DAP, foram realizadas as menores diluições utilizadas, que variaram entre 45 e 512 vezes, ou seja, proporcional a 1 grama de folha em 45 e 512 ml de água, respectivamente. A amostra, cuja faixa de variação das concentrações foi maior, foi a coletada aos 101 DAP, na qual a maior diluição superou 2000x (1g: 2000 ml). Essas diluições elevadas são indicadores que a expressão da proteína nos tecidos foliares é elevada e por outro lado que *A. gemmatalis* tem grande suscetibilidade a esta toxina.

5.3 Quantificação de proteína Cry1Ac

Comparando as concentrações letais obtidas para os extratos de folhas das diferentes coletas com as concentrações letais do padrão de proteína Cry1Ac, é possível inferir a concentração de proteína Cry1Ac em folhas de soja BRS 1010 IPRO aplicando os valores obtidos na Equação 2.

$$\mu\text{g de Cry1Ac. g}^{-1}\text{folha fresca} = \frac{CL_{50} \text{ bioensaio Cry1Ac } (\text{ng. cm}^{-2})}{CL_{50} \text{ bioensaio extrato de folha } (\mu\text{g. }\mu\text{l}^{-1}. \text{cm}^{-2})} \times 50 \quad (2)$$

Os dados apresentados na Figura 2.4 demonstram que a maior concentração de proteína foi encontrada na amostra coletada aos 102 DAP (R6), representando 3,02 (IC = 2,51 – 3,75) a 6,04 (IC = 5,03 – 7,50) $\mu\text{g de Cry1Ac. g}^{-1}$ de folha fresca, comparando-se com os bioensaios 1 e 2 de proteína, respectivamente. A menor concentração foi encontrada na amostra de folha coletada aos 123 DAP, em estágio avançado de senescência, em que os valores atingiram concentração de 1,74 (IC = 1,42 – 2,25) a 3,47 (IC = 2,84 – 4,50) $\mu\text{g de Cry1Ac. g}^{-1}$ de folha fresca comparando-se com os dois bioensaios.

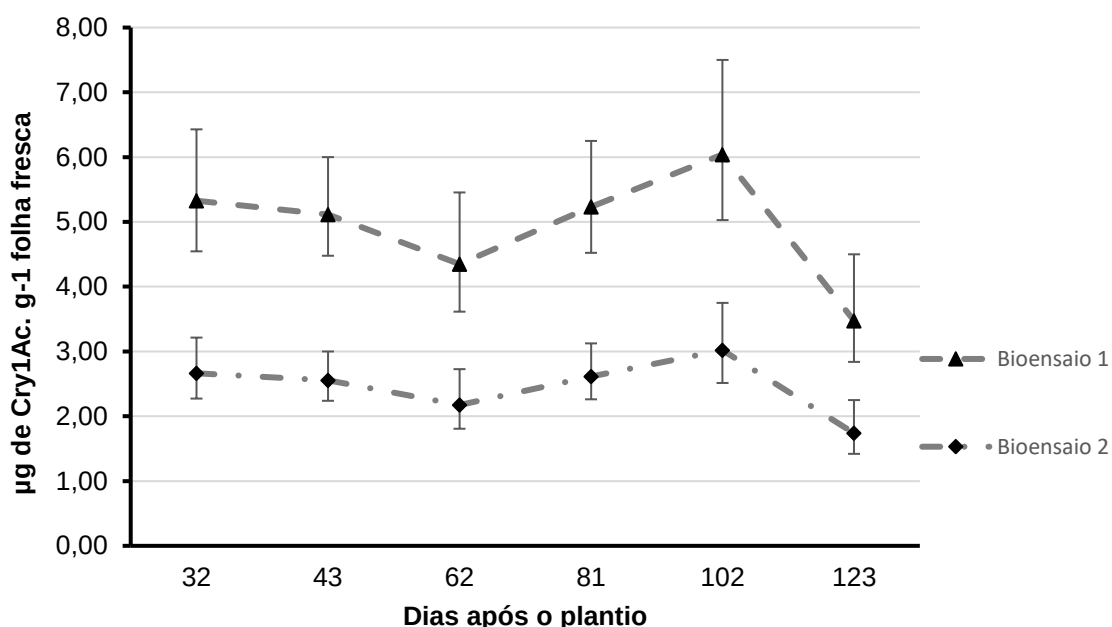


Figura 2.4 – Concentração de proteínas Cry1Ac (IC 95%) em folhas de soja BRS 1010 IPRO em diferentes períodos de desenvolvimento da cultura. Comparação entre resultados obtidos com a transformação de dados a partir dos dois bioensaios com padrão de Cry1Ac.

5.4 Discussão

Os resultados apresentados para concentração de proteína em folíolos divergem dos resultados apresentados por Macrae et al. (2005), os quais encontraram concentrações médias de proteína que variam de 50 a 250 μg de Cry1Ac. g^{-1} de folha fresca, adotando método de ELISA. Os mesmos autores, quando consideraram o erro padrão, obtiveram as concentrações de Cry1Ac que variaram entre 40 e 280 μg de Cry1Ac. g^{-1} de folha fresca.

Yu et al. (2013) também adotaram o método de ELISA para quantificar proteína Cry1Ac em folhas de soja. Contudo, o *kit* para o teste de ELISA (comercialmente disponível pela empresa Enviroligix Inc.) utilizado para quantificar a proteína, segundo o departamento técnico da Enviroligix, tem caráter apenas qualitativo, e não quantitativo. Embora o *kit* utilizado não tenha sido o ideal, os valores encontrados pelos autores estão mais próximos dos valores detectados no presente estudo, em que as concentrações obtidas variam entre 4 e 13 μg de Cry1Ac. g^{-1} de folha fresca. Os autores, assim como no presente trabalho, identificaram oscilação ao longo do ciclo da cultura, diferentemente do trabalho de Macrae et al. (2005), que demonstrou aumento da concentração de proteína no decorrer do desenvolvimento das plantas.

A quantificação de proteína Cry1Ac na presente pesquisa foi realizada através de indicador biológico. Entretanto, também se tentou através do método ELISA com o uso do *kit* comercialmente disponível, de caráter qualitativo, da empresa Agdia. Os valores observados de absorbância para diferentes concentrações de extrato foliar permaneciam os mesmos, demonstrando que o *kit* não possuía características quantitativas, além da comparação com o padrão Cry1Ac indicar quantidades exorbitantes de proteína Bt no tecido foliar. Com isso, o Kit demonstrou-se inapto para quantificar a proteína.

A metodologia aplicada na quantificação pode ter contribuído com as divergências de resultados entre o presente trabalho com os trabalhos dos autores citados anteriormente, tendo em vista que o processo de maceração em ambos os casos ocorre em solução tampão extratora, que pode ter extraído maior quantidade de proteína do tecido foliar. O uso de extrator em ensaios de quantificação de proteínas Cry através de indicador biológico deve ser estudado, com objetivo de

verificar possíveis otimizações na extração de proteína do tecido foliar e também verificar possíveis efeitos do extrator no desenvolvimento dos insetos utilizados nos estudos.

A quantificação em diferentes cultivares, ou material vegetal proveniente de diferentes localidades, ou o manejo da soja também podem explicar as divergências de resultados (HUANG et al., 2014). As oscilações na concentração de Cry1Ac são normais em condições de campo, uma vez que diversos fatores abióticos estão ligados à expressão de proteína, como oscilações de temperatura (CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2012; WU et al., 2002), época de semeadura (HALLIKERI et al., 2009), disponibilidade de nitrogênio (COVIELLA; STIPANOVIC; TRUMBLE, 2002), ou encharcamento de raízes (LOU et al., 2008).

O presente estudo, bem como os trabalhos de Macrae et al. (2005) e de Yu et al. (2013) indicaram alta expressão da proteína no estágio de R6 (que corresponde a 102 DAP), com aumento da expressão ao longo da fase reprodutiva. Yu et al. (2013) também identificaram decréscimo no conteúdo de Cry1Ac nas amostras de folhas coletadas ao fim de ciclo, correspondente à coleta 123 DAP, devido ao processo de senescência, em que folhas amareladas possuem menor quantidade de proteína Cry (ABEL; ADAMCZYK, 2004; OLSEN et al., 2005).

O uso de *A. gemmatalis* como inseto indicador, foi realizado considerando que essa espécie apresenta alta sensibilidade à toxina Cry1Ac (BERNARDI et al. 2012; SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012) o que permitiria detectar pequenas variações na quantidade de proteína presente nos tecidos. Tal característica também foi observada neste trabalho, com concentrações letais de 0,09 e 0,18 ng.cm^{-2} demonstrando alta suscetibilidade.

Os resultados de bioensaios com proteína padrão Cry1Ac influenciam diretamente na quantificação de proteína no tecido foliar, uma vez que as CL_{50} encontradas nos bioensaios são diretamente proporcionais à quantidade de proteína na folha, ou seja, quanto maior a CL_{50} para proteína Cry1Ac, maior a concentração de proteína presente na folha após a comparação. Crialesi-Legori (2014) encontraram CL_{50} de 0,75 ng.cm^{-2} de proteína Cry1Ac para *A. gemmatalis*, valores aproximadamente 7 vezes maior que no presente trabalho. Com isso, a concentração de proteína na folha seria acrescida em aproximadamente 7 vezes. Comparações

entre CL_{50} obtidas em diferentes estudos dessa natureza são arriscadas, uma vez que o bioensaio sofre influência de fatores associados à qualidade da dieta e variação de suscetibilidade das populações do inseto, por exemplo.

A qualidade (estabilidade do formulado, nível de pureza) do padrão utilizado, bem como da população de insetos e dos bioensaios realizados, contribui para uma aferição mais precisa do conteúdo de proteínas Cry. A metodologia aplicada neste trabalho para quantificação de proteínas Cry apresenta-se promissora, contudo mais pesquisas devem ser realizadas para comprovação do método e para eventuais adaptações, como a adoção de extrator tampão, com intuito de obterem-se resultados mais precisos.

6 CONCLUSÕES

- O método apresentado no trabalho para quantificar proteína Cry1Ac em folhas de soja apresentou-se promissor.
- A concentração de proteína Cry1Ac nas folhas de soja variou entre 2,17 e 6,04 μg de Cry1Ac. g^{-1} de folha fresca, conforme data de coleta de folhas e conforme bioensaio de padrão utilizado para comparação.
- O máximo de concentração de proteína Cry1Ac nos folíolos de soja ocorreu no estágio R6 aos 102 DAP, com expressão de 3,02 a 6,04 μg de Cry1Ac. g^{-1} de folha fresca
- A expressão de Cry1Ac na folha decai com avanço do processo de senescência.
- A população de *Anticarsia gemmatilis* estudada apresentou CL_{50} de 0,09 a 0,18 ng.cm^{-2} de proteína Cry1Ac.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de indicadores biológicos para estudo de quantificação de proteínas Cry presentes em tecido vegetal pode ser metodologia alternativa em futuros trabalhos. O método também pode ser utilizado como prova dos resultados obtidos a partir da aplicação dos métodos de ELISA, os quais demonstram resultados divergentes. Por outro lado, as empresas detentoras dos *kits* para determinação qualitativa, não recomendam o seu uso para quantificação dos níveis de proteína na cultura da soja. Uma vez que o conteúdo de proteína nos folíolos de soja apresenta elevada variabilidade, os métodos de determinação desses teores devem ser melhor estudados, verificando possíveis diferenças entre cultivares e realizando estudos em condições controladas para evitar o efeito de agentes abióticos.

REFERÊNCIAS

- ABEL, C. A.; ADAMCZYK, J. J. Jr. Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 5, p. 1737-1744, out. 2004.
- ABIRI, R.; VALDIANI, A.; MAZIAH, M.; SHAHARUDDIN, N. A.; SAHEBI, M.; YUSOF, Z. N. B.; ATABAKI, N.; TALEI, D. A critical review of the concept of transgenic plants: insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 18, n. 1, p. 21-42, 2016.
- ASHRAF, M.; ATHAR, H. R.; HARRIS, P. J. C.; KWON, T. R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. In: SPARKS, D. L. **Advances in Agronomy**, 1. ed. v. 97. Delaware: Academic Press, 2008. Capítulo 2. p. 45-110.
- BAKSHI, S.; DEWAN, D. Status of transgenic cereal crops: a review. **Cloning & Transgenesis**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2013.
- BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, v. 124, n. 4, p. 587-616. ago. 1992.
- BERNARDI, O.; MALVESTITI, 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 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, [S.l.]. v. 68. n. 7. p. 1083-1091. jul. 2012.
- BERNARDI, O.; SORGATTO, R. J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F. A.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; 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, n. 1, p. 33-40, abr. 2014a.
- BERNARDI, O.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; BERGER, G. U.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 x MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 70, n. 4, p. 588-594, abr. 2014b.
- BLAISE, D.; KRANTHI, K. R. Cry1Ac expression in transgenic Bt cotton hybrids is influenced by soil moisture and depth. **Current Science**, v. 101, n. 6, p. 783-786, set. 2011.
- 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**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 843-850, set/out. 2003.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, mar. 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, jul. 2011.

BT TOXIN NOMENCLATURE COMMITTEE. **Full toxin list**. Disponível em: < <http://www.btnomenclature.info/> >. Acesso em: 17/01/2019.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial vegetative insecticidal proteins (VIP) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329-350, jun. 2016.

CHEN, D.; YE, G.; YANG, C.; CHEN, Y.; WU, Y. The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, n. 3, p. 333-342, jun. 2005.

CHEN, Y.; WEN, Y.; CHEN, Y.; COTHREN, J. T.; ZHANG, X.; WANG, Y.; PAYNE, W. A.; CHEN, D. Effects of extreme air temperature and humidity on the insecticidal expression level of Bt cotton. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 11, p. 1836-1844, nov. 2012.

CHRISTOU, P. Sustainable and durable insect pest resistance in transgenic crops. **ISB News Report**, 2005. Disponível em: < <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.569.7028&rep=rep1&type=pdf> >. Acesso em: 21/01/2019.

COATES, B. S. *Bacillus thuringiensis* toxins resistance mechanisms among Lepidoptera: progress on genomic approaches to uncover causal mutations in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 70-77, jun. 2016.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Tabela de plantas aprovadas para comercialização**. 2018. Disponível em: < <http://ctnbio.mcti.gov.br/documents/566529/1684467/Tabela+de+Plantas+Aprovadas+para+Comercializa%C3%A7%C3%A3o/e3087f9c-c719-476e-a9bd-bfe75def842f> >. Acesso em: 07/01/2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Análise mensal de soja: novembro 2018**. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-soja> >. Acesso em: 07/01/2019.

COVIELLA, C. E.; STIPANOVIC, R. D.; TRUMBLE, J. T. Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO₂ and nitrogen in transgenic cotton plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 367, p. 323-331, fev. 2002.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVOLOS, C. C.; LEMES, A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 49, n. 2, p. 79-87, fev. 2014.

DONG, H. Z.; LI, W. J. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 193, n. 1, p. 21-29, nov. 2007.

DOURADO, P. M.; BACALHAU, F. B. AMADO, D.; CARVALHO, R. A. MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. OMOTO, C. High susceptibility of Cry1Ac and low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt soybean in Brazil. **Plos One**, v. 11. n. 8. p. 1-15. ago. 2016.

GILROY, T. E., WILCOX, E. R., 1992. **Hybrid *Bacillus thuringiensis* gene plasmid, and transformed *Pseudomonas fluorescens***. US Patent, 5,128–130.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 701-726, 1998.

GREENPLATE, J. T. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit and terminals. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 6, p. 1377-1383, dez. 1999.

GULLÌ, M.; SALVATORI, E.; FUSARO, L.; PELLACANI, C.; MANES, F.; MARMIROLI, N. Comparison of drought stress response and gene expression between a GM maize variety and a near-isogenic non-GM variety. **Plos Ones**, v. 10, n. 2, p. 1-21, fev. 2015.

HALLIKERI, S. S.; HALEMANI, H. L.; KAYAGERI, I. S.; PATIL, B. C.; PATIL, V. C.; PALLED, Y. B. Influence of sowing time and moisture regimes on Cry protein concentration and related parameters of Bt-cotton. **Karnataka Journal of Agriculture Science**, v. 22, n. 5, p. 995-1000, 2009.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242-255, jun. 1989.

HOMRICH, M. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEREIRA, J. F.; BERTAGNOLLI, P. F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M. A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Resistance to *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 522-531, 2008.

ISAAA. **Global status of commercialized biotech/ GM crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years**. Ithaca, 2017. p. 153. (ISAAA Briefs, n. 53).

JIANG, L.; DUAN, L.; TIAN, X.; WANG, B.; ZHANG, H.; ZHANG, M.; LI, Z. NaCl salinity stress decreased *Bacillus thuringiensis* (Bt) protein content of transgenic Bt cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, n. 3, p. 315-320, mar. 2006.

JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; MUÑOZ-GARAY, C.; GÓMEZ, I.; SAAB-RINCON, G.; DAMIAN-ALMAZO, J. Y.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21222-21229, jul. 2007.

KIROUAC, M.; VACHON, V.; NOEL, J.; GIRARD, F.; SCHWARTZ, J.; LAPRADE, R. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane

vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v.1561, n. 2, p. 171-179, abr. 2002.

KNIGHT, K.; HEAD, G.; ROGERS, J. Season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab proteins in Bollgard II cotton in Australia. **Crop Protection**, v. 44, n. 1, p. 50-58, fev. 2013.

KNOWLES, B. H.; DOW, J. A. T. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, v. 15, n. 7, p. 469-476, jul. 1993.

LAU, W.; FISHBACH, M. A.; OSBOURN, A.; SATTELY, E. S. Key applications of plant metabolic engineering. **Plos Biology**, v. 12, n. 6, p. 1-5, jun. 2014.

LOU, Z.; DONG, H.; LI, W.; MING, Z.; ZHU, Y. Individual and combined effects of salinity and waterlogging on Cry1Ac expression and insecticidal efficacy of Bt cotton. **Crop Protection**, v. 27, n. 12, p. 1485-1490, dez. 2008.

LOU, J. Y.; ZHANG, S.; ZHU, X. Z.; JI, J. C.; ZHANG, K. X.; WANG, C. Y.; CUI, J. J. Effects of NaCl-stressed *Bacillus thuringiensis* (Bt) cotton on the feeding behaviors and nutritional parameters of *Helicoverpa armigera*. **Plos One**, v. 13, n. 9, p. 1-12, set. 2018.

MAAGD, R. A. de; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has envolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, abr. 2001.

MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Reviews of Genetics**, v. 37, n. 1, p. 409-433, 2003.

MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A.; GAMUNDI, J. C.; HARRISON, L. A.; KABUYE, V. T.; MCPHERSON, R. M.; MIKLOS, J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 577-587, abr. 2005.

MARQUES, L. H.; CASTRO, B. A.; ROSSETTO, J. SILVA, O. A. B. N.; MOSCARDINI, V. F.; ZOBIOLE, L. H. S.; SANTOS, A. C.; VALVERDE-GARCIA, P.; BABCOCK, J. M.; RULE, D. M.; FERNANDES, O. A. Efficacy of soybean's event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac to manage key tropical lepidopteran pests under field conditions in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 4, p. 1922-1928, ago. 2016.

MARQUES, L. H.; SANTOS, A. C.; CASTRO, B. A.; MOSCARDINI, V. F.; ROSSETTO, J.; SILVA, O. A. N.; ZOBIOLE, L. H. S.; VALVERDE-GARCIA, P.; BABCOCK, J. M.; STORER, N. P.; RULE, D. M.; FERNANDES, O. A. Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. **Crop Protection**, v. 96, n. 1, p. 109-115, jun. 2017.

MARTINS-SALLES, S.; MACHADO, V.; MASSOCHIN-PINTO, L.; FIUZA, L. M. Genetically modified soybean expressing insecticidal protein (Cry1Ac): management risk and perspectives. **Facets**, v. 2, p. 496-512, jun. 2017.

MELO, A. L. de A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2014. Disponível em: <
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2014.960793?scroll=top&needAccess=true> >. Acesso em: 22/01/2019.

MENDELSON, M.; KOUGH, J.; VAITUZIS, Z.; MATTHEWS, K. Are Bt crops safe?. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 1003-1009, set. 2003.

MIKLOS, J. A.; ALIBHAI, M. F.; BLEDIG, S. A.; CONNOR-WARD, D. C.; GAO, A.; HOLMES, B. A.; KOLACZ, K. H.; KABUYE, V. T.; MACRAE, T. C.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; HARRISON, L. A. Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry1A transgene that confers a high degree of resistance to lepidopteran pests. **Crop Science**, v. 47, n. 1, p. 148-157, jan. 2007.

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M.; CAPDEVILLE, G.; JONES, G.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L.; CORDEIRO, B. A.; BRAZ, S. V.; SANTOS, R. C. dos; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plant. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 512-520, jul. 1999.

OLSEN, K. M.; DALY, J. C.; HOLT, H. E.; FINNEGAN, E. J. Season-long variation in expression of Cry1Ac gene and efficacy of *Bacillus thuringiensis* toxin in transgenic cotton against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 3, p. 1007-1017, jun. 2005.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3324, dez. 2014.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3-22, jan. 2013.

PARROT, W. A.; ALL, J. N.; ADANG, M. J.; BAILEY, M. A.; BOERMA, H. R.; STEWART, C. N. Jr. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* insecticidal gene. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 30, n. 3, p. 144-149, jul. 1994.

PERLAK, F. J.; FUCHS, R. L.; DEAN, D. A.; McPHERSON, S. L.; FISCHHOFF, D. A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of the insect control protein genes. **PNAS**, v. 88, n. 8, p. 3324-3328, abr. 1991.

PRASAD, B. D.; RANJAN, T.; SAHNI, S.; SHARMA, V. Recent advances in transgenic crops: a review. **Journal of Cell and Tissue Research**, v.17, n.2, p. 6185-6196, 2017.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, jun. 2007.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189-194, mar. 2010.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, n. 5, p. 1-22, jan. 2005.

RITZ, C. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 220-229, jan. 2010.

RIVERA, A. L.; GÓMEZ-LIM, M.; FERNÁNDEZ, F.; LOSKE, A. M. Physical methods for genetic plant transformation. **Physics of Life Reviews**, v. 9, n. 3, p. 308-345, set. 2012.

ROH.; YUL, J.; 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.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 63-71, jan. 2006.

SAINI, M. K.; DHAWAN, A. K. Nitrogen fertility and plating date effects on Bt ä-endotoxin and mortality of *Helicoverpa armigera* (Hüb.) in Bollgard II cotton genotype. **Journal of Cotton Research and Development**, v. 28, n. 2, p. 289-292, jul. 2014.

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

SINGH, A. K.; PARITOSH, K.; KANT, U.; BURMA, P. K.; PENTAL, D. High expression of Cry1Ac protein in cotton (*Gossypium hirsutum*) by combining independent transgenic events that target the protein to cytoplasm and plastids. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1-17, jul. 2016.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B. E.; BRAVO, A. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. **Science**, v. 318, n. 5856, p. 1640-1642, dez. 2007.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. 1. ed. Brasília: Embrapa Soja, 2012. cap. 10. p. 673-723.

STEWART, C. N. Jr.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, H. R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROT, W. A. Genetic transformation, recovery, and characterization

of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac gene. **Plant Physiology**, v. 112, n. 1, p. 121-129, set. 1996.

TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of economic Entomology**, v. 102, n. 6, p. 2011-2025, dez. 2009.

TAIT, R. C. The application of molecular biology. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 1999.

TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; ADANG, M. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 8, n. 3, p. 191-202, ago. 2006.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, n. 1, p. 1-12, set. 2012.

VERMA, C.; NANDA, S.; SINGH, R. K.; SINGH, R. B.; MISHRA, S. A review on impacts of genetically modified food on human health. **The Open Nutraceuticals Journal**, v. 4, n. 1, p. 3-11, fev. 2011.

WALKER, D. R.; ALL, J. N.; McPHERSON, R. M.; BOERMA, H. R.; PARROT, W. A. Field evaluation of soybean engineered with synthetic Cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 613-622, jun. 2000.

WANG, Y.; XUE, Y.; LI, J. Towards molecular breeding and improvement of rice in China. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 610-614, dez. 2005.

WANG, Y. H.; GAO, J.; SUN, M. F.; CHEN, J. P.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; CHEN, D. H. Impacts of soil salinity on Bt protein concentration in square of transgenic Bt cotton. **Plos One**, v. 13, n. 11, p. 1-13, nov. 2018.

WU, G.; CUI, H.; YE, G.; XIA, Y.; SARDANA, R.; CHENG, X.; LI, Y.; ALTOSAAR, I.; SHU, Q. Inheritance and expressing oh the Cry1Ab gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 727-734, mar. 2002.

YU, H.; LI, Y.; LI, X.; ROMEIS, J.; WU, K. Expression of Cry1Ac in transgenic bt soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. **Pest Management Science**, v. 69, n. 12, p. 1326-1333, dez. 2013.

ZEILEIS, A.; HOTHORN, T. Diagnostic checking in regression relationships. **R News**, v. 2/3, p. 7-10, dez. 2002.

ZEILEIS, A. Econometric computing with HC and HAC covariance matrix estimators. **Journal of Statistical Software**, v. 11, n. 10, p. 1-17, nov. 2004.