

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

MARIA AMÉLIA ROSSI GHOLMIE

**SUSCETIBILIDADE DE *Anticarsia gemmatalis* A INSETICIDAS À BASE DE
Bacillus thuringiensis E HISTOPATOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DE
LINHAGENS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A Cry1Ac**

**PONTA GROSSA - PR
2018**

MARIA AMÉLIA ROSSI GHOLMIE

**SUSCETIBILIDADE DE *Anticarsia gemmatalis* A INSETICIDAS À BASE DE
Bacillus thuringiensis E HISTOPATOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DE
LINHAGENS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A Cry1Ac**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel R. Sosa-Gómez
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sheila M. Levy

**PONTA GROSSA - PR
2018**

G42 Gholmie, Maria Amélia Rossi
Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* a inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* e histopatologia do intestino médio de linhagens resistentes e suscetíveis a Cry1Ac / Maria Amélia Rossi Gholmie. Ponta Grossa, 2018.
46 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-gómez.
Coorientadora: Profa. Dra. Sheila Levy.

1. Lagarta-da-soja. 2. Intestino médio. 3. Bactérias entomopatogênicas. 4. *Bacillus thuringiensis*. I. Sosa-gómez, Daniel Ricardo. II. Levy, Sheila. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Agricultura. IV.T.

CDD: 633



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

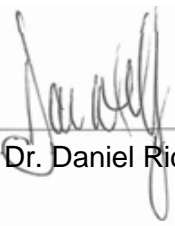
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “**Suscetibilidade de *Anticarsia gematalis* a inseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* e histopatologia do intestino médio de linhagens resistentes e suscetíveis a C ry1Ac**”.

Nome: Maria Amélia Rossi Gholmie

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez



Profª Drª Valkiria Fabiana dos Santos



Dr. Rudiney Ringenberg

Data da Realização: 28 de Junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Jihad e Fátima, pela confiança, pelos valores ensinados e pela oportunidade concedida.

À minha irmã Myriam e meu cunhado Thiago pelo carinho e por estarem sempre ao meu lado.

Ao Dr. Daniel R. Sosa-Gómez pela orientação, apoio e confiança nesses dois anos de curso.

À Profa. Dra. Sheila M. Levy pelos ensinamentos e parceria no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Ângela Falleiros pela atenção e disponibilidade.

À Dra. Ivani de Oliveira Negrão Lopes pela colaboração nas análises estatísticas.

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

À Embrapa Soja pela oportunidade de conduzir os trabalhos da tese nas suas dependências.

À Universidade Estadual de Londrina e aos colaboradores do Laboratório de Insetos do Departamento de Histologia por disponibilizar o laboratório e os equipamentos.

Aos colaboradores do Laboratório de Patologia de Insetos e Criação de Insetos da Embrapa-Soja, em especial ao Fábio Paro e à Ivanilda Soldório, pelo carinho e importantes contribuições para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos do laboratório, Alessandra Benatto, Gizele Rejane Baldo, Felipe Grisard Penteado e Mariana Mantelato pela colaboração e companheirismo nessa jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização do presente trabalho.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta dissertação.

RESUMO

A produção de grandes culturas como soja, *Glycine max*, e milho, *Zea mays*, no Brasil enfrenta sérios problemas que afetam sua produtividade, como os danos causados por insetos-praga. Dentre eles estão as lagartas desfolhadoras como *Anticarsia gemmatalis*. A necessidade de estudos relacionados à suscetibilidade desses insetos a diferentes produtos comerciais que apresentam composições diferentes de toxinas Cry é cada vez maior devido aos fatores que podem estar relacionados ao desenvolvimento da resistência às toxinas já utilizadas no seu controle. Os objetivos deste trabalho foram determinar a suscetibilidade de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis à toxina Cry1Ac e ainda quantificar as alterações celulares do intestino médio de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis inoculadas com a bactéria HD-73. As populações foram expostas aos produtos comerciais Agree[®], Dipel[®] e Xentari[®], que contêm diferentes toxinas de Bt, em bioensaios de incorporação na dieta artificial. A avaliação da mortalidade foi realizada até o 7º dia e a análise dos dados foi realizada utilizando o modelo Weibull-2. Para a quantificação celular no intestino de *A. gemmatalis* os tratamentos foram: linhagem suscetíveis inoculada com HD-73, linha suscetível sem inoculação, linha resistente inoculada com HD-73 e linhagem resistente sem inoculação. Após a montagem das lâminas histológicas, as imagens foram capturadas e a contagem dos diferentes tipos de células intestinais foi realizada. Os resultados foram submetidos a análise estatística, com teste Tukey a 5% de probabilidade. O produto biológico que apresentou maior atividade, tanto na população resistente como na suscetível de *A. gemmatalis*, foi o Xentari[®], e o produto com menor atividade biológica foi o Dipel[®], sendo que o Dipel[®] apresentou atividade 42 vezes menor na população resistente que na suscetível, enquanto essas proporções para o Agree[®] e o Xentari[®] foram aproximadamente 18 e 11, respectivamente. Neste estudo foram observadas diferenças significativas no número de cada tipo de célula intestinal entre os tratamentos e entre as regiões anterior e posterior do intestino médio, o que evidencia as respostas diferenciais entre as linhagens resistentes e suscetíveis.

Palavras chaves: lagarta-da-soja, intestino médio, bactérias entomopatogênicas, *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis aizawai*.

ABSTRACT

The production of extensive crops such as soybean and corn in Brazil faces serious problems that affect their productivity, such as pest insect damage. Among them, the most important defoliators are *Anticarsia gemmatalis*. Studies related to the susceptibility of these insects to commercial products with different Cry toxin composition are desirable to avoid cross resistance between Bt crops and commercial Bt products. The objectives of this work were to determine the susceptibility of resistant and susceptible *A. gemmatalis* to Cry1Ac toxin. In addition, our purpose was to quantify cellular response of the midgut of *A. gemmatalis* inoculated with HD-73 bacterium. Populations from both insects were exposed to the commercial products Agree[®], Dipel[®] and Xentari[®], which contain a complex of Bt toxins. Mortality assessment was performed by day 7th and data analysis was performed using the Weibull-2 model. Cells were quantified in midgut of *A. gemmatalis* treated with: susceptible strain infected with Bt, susceptible strain without inoculation, resistant strain infected with Bt and resistant strain without inoculation. Digital images captured from slides were used to quantify different types of intestinal cells. Data were submitted to ANOVA analysis Tukey= 5%. The biological product that showed the highest activity, both in the resistant and susceptible strains of *A. gemmatalis*, was Xentari[®] and the product with the lowest biological activity was Dipel[®], and Dipel[®] showed 42-fold lower activity in the resistant strain; resistant rates for Agree[®] and Xentari[®] were approximately 18 and 11-fold. In this study, we observed significant differences in numbers of each type of midgut cell between treatments and also between the anterior and hind regions of the midgut, which shows differential response between susceptible and resistant strains.

Key words: velvetbean caterpillar, midgut, entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis kurstaki*, *Bacillus thuringiensis aizawai*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mortalidade das populações suscetíveis (S) e resistentes (R) de *A. gemmatalis* aos produtos Agree, Dipel e Xentari em μg de ingrediente ativo.ml-1 de dieta26
- Figura 3.** Número de células colunares em 1000 μm de extensão nas linhagens suscetível e resistente tratada e não tratada com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis*. As letras maiúsculas comparam os tratamentos no alinhamento vertical e as letras minúsculas no alinhamento horizontal (Tukey a 5%).....29
- Figura 4.** Número de células caliciformes em 1000 μm de extensão nas linhagens suscetível e resistente tratada e não tratada com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis*. As letras maiúsculas comparam os tratamentos no alinhamento vertical e as letras minúsculas no alinhamento horizontal (Tukey a 5%).....32
- Figura 5.** Número de células regenerativas em 1000 μm de extensão nas linhagens suscetível e resistente tratada e não tratada com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis*. As letras maiúsculas comparam os tratamentos no alinhamento vertical e as letras minúsculas no alinhamento horizontal (Tukey a 5%).....36
- Figura 6.** Fotomicrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis*. A: linhagem suscetível controle. B: linhagem resistente controle. C: linhagem suscetível com Bt. D: linhagem resistente com Bt. Aspecto geral do intestino médio: Células colunares (Co) com bordadura estriada (Be) e protusões citoplasmáticas (P), Células caliciformes (Ca), Células regenerativas (Re), membrana peritrófica (Mp), lúmen (lu), camada muscular (Mu). Barra = 10 μm37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de toxinas de Cry de bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> e seu espectro de ação.....	14
Tabela 2. Concentrações de cada produto ($\mu\text{g ia.ml}^{-1}$ de dieta) utilizadas nos bioensaios para cada população.....	21
Tabela 3. Suscetibilidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes (R) e suscetíveis (S) a produtos comerciais à base de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25
Tabela 5. Comparação do número de células colunares entre lagartas de <i>A. gemmatalis</i> tratadas e não tratadas com a bactéria HD-73 (Bt).....	30
Tabela 6. Comparação do número de células calciformes entre lagartas de <i>A. gemmatalis</i> tratadas e não tratadas com a bactéria HD-73 (Bt).....	33
Tabela 7. Comparação do número de células regenerativas entre lagartas de <i>A. gemmatalis</i> tratadas e não tratadas com a bactéria HD-73 (Bt).....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
113 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 LEPIDOPTEROS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	12
3.1.1 <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae)	12
3.2 UTILIZAÇÃO DO <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> NO CONTROLE DE PRAGAS	12
3.2.1 Modo de Ação das Toxinas Cry	14
3.2.2 Mecanismos de Resistência dos Lepidópteros às Toxinas Cry	15
3.3 HISTOPATOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DE LEPIDOPTEROS AFETADOS POR <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 CRIAÇÃO DAS POPULAÇÕES	21
4.2 SUSCETIBILIDADE DAS POPULAÇÕES AOS PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE <i>B. THURINGIENSIS</i>	21
4.2.1 Análises de dados	22
4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DO INTESTINO MÉDIO DE <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> RESISTENTES E SUSCETÍVEIS À PROTEÍNA CRY1Ac	22
4.3.1 Inoculação das lagartas	22
4.3.2 Coleta e dissecação do intestino médio	23
4.3.2 Fixação e montagem das lâminas histológicas	23
4.3.3 Análise quantitativa	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 SUSCETIBILIDADE DAS POPULAÇÕES AOS PRODUTOS DIPEL, XENTARI E AGREE	25
5.2 QUANTIFICAÇÃO DO TIPOS CELULARES DO INTESTINO MÉDIO DE <i>ANTICARSIA GEMMATALIS</i> RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A CRY1Ac TRATADAS COM <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	27
5.2.1 Células Colunares (Co)	27
5.2.2 Células Caliciformes (Ca)	30
5.2.3 Células Regenerativas (Re)	33
6 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O plantio nacional de soja no Brasil apresentou aumento em área, saindo de 33,909 milhões de hectares na safra 2016/17 para 35,100 milhões de hectares na 2017/18 (CONAB, 2018). Porém, essa cultura enfrenta sérios problemas que podem afetar a sua produtividade, como os danos causados por insetos-praga. Dentre as espécies existentes, os Lepidópteros são de grande importância por causarem prejuízos durante todo o desenvolvimento da cultura.

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ), é encontrada em todos os locais de cultivo, sendo a desfolhadora mais comum da soja no Brasil (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

As dificuldades de controle de lepidópteros ainda são frequentes, devido a não utilização dos níveis de ação recomendados e o uso inadequado de agrotóxicos, o que pode provocar a eliminação dos inimigos naturais e a seleção de insetos resistentes a inseticidas (SOSA-GÓMEZ et al., 2009).

A introdução da soja transgênica que expressa a toxina Cry1Ac no mercado foi uma alternativa importante para diminuir as aplicações de inseticidas químicos. No entanto, a disponibilidade da toxina Cry1Ac em grandes áreas traz a preocupação da possível seleção de fenótipos resistentes a essa toxina (RAHMAN et al., 2007). A resistência é um fenômeno estritamente genético, com mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (LI et al., 2002). Os insetos possuem ciclo de vida curto e prole abundante, o que favorece o surgimento de populações com diferentes características genéticas.

Ferramentas como a implantação de áreas de refúgio devem ser utilizadas para retardar o aumento da frequência de alelos de resistência nas áreas cultivadas com plantas que expressam as proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (MACRAE et al., 2005). Área de refúgio é a semeadura de uma área utilizando cultivares não Bt, de iguais porte e ciclo. As recomendações são no sentido de sincronizar os cruzamentos dos possíveis adultos sobreviventes na área de milho Bt com suscetíveis emergidos na área de refúgio. É permitida a utilização de outros métodos de controle de pragas nessa área, desde que não sejam utilizados bioinseticidas à base de Bt (EMBRAPA, 2011).

Produtos comerciais formulados a partir de *B. thuringiensis* também estão hoje disponíveis no país e na sua grande maioria estão constituídos por cepas da bactéria

que apresentam diferentes toxinas em proporções variáveis. O bioinseticida com maior alcance no mercado mundial é o Dipel® (*B. thuringiensis var. kurstaki*, cepa HD-1). Esse produto, pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é altamente eficiente contra mais de 170 lepidópteros-praga (GLARE e O'CALLAGHAN, 2000).

A necessidade de estudos relacionados à suscetibilidade desses insetos a produtos comerciais que apresentam composições diferentes de toxinas Cry é cada vez maior devido aos fatores que podem estar associados ao desenvolvimento da resistência às toxinas já utilizadas no seu controle. Outro aspecto importante desse conhecimento sobre os produtos que apresentam maior atividade nos insetos resistentes é a finalidade de realizar um manejo apropriado nas áreas de refúgio, evitando o desenvolvimento de resistência cruzada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da presente dissertação é determinar a atividade biológica de produtos à base de cepas de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* e as possíveis alterações histopatológicas do intestino médio dessas lagartas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho tem como propósitos, ainda: (i) determinar a suscetibilidade de *A. gemmatalis* e da linhagem resistente à Cry1Ac aos inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis*; (ii) quantificar os diferentes tipos celulares do intestino médio de populações de *A. gemmatalis* e *A. gemmatalis* resistentes à toxina Cry1Ac, inoculadas com a cepa HD-73 de *B. thuringiensis*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEPIDOPTEROS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

3.1.1 *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae)

A lagarta-da-soja é uma espécie de ocorrência tropical e subtropical restrita aos continentes americanos, sendo importante em várias culturas, principalmente na soja, desde as regiões Norte e Central da Argentina até o Sudeste e Estados do Golfo do México nos Estados Unidos (PRAÇA et al., 2006). É considerada a principal praga desfolhadora da soja nos Estados Unidos, México, Colômbia, Venezuela, Brasil e Argentina (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Quando não manejados corretamente, esses insetos podem provocar até 100% de desfolha, o que, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, ocasiona reduções significativas na produtividade da lavoura, podendo chegar à perda total (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Seu controle é relativamente fácil e não tem sido detectada resistência dessa espécie a inseticidas convencionais, entretanto pode ser considerada uma das espécies com risco de seleção de populações resistentes a Cry1Ac uma vez que é possível obter populações resistentes em laboratório através de poucas gerações (SOSA-GOMEZ e MIRANDA, 2012). Portanto, linhagens resistentes e suscetíveis dessa espécie devem ser estudadas quanto sua resposta a inseticidas biológicos contendo proteínas Cry uma vez que podem ser potencialmente utilizadas nos programas de manejo da resistência, assim como no manejo das áreas de refúgio.

3.2 UTILIZAÇÃO DO *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE PRAGAS

Dentre as alternativas para o controle de populações de lepidópteros de importância agrícola encontra-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*. A principal característica dessa bactéria é que, durante a esporulação, ocorre a produção de um ou mais corpos cristalinos de natureza proteica, que são tóxicas para diversos invertebrados, especialmente larvas de insetos. Essas proteínas são chamadas Cry e são a base dos inseticidas biológicos mais utilizados no mundo atualmente (TABASHNIK et al., 2010).

Diferentes produtos à base de Bt foram desenvolvidos para o controle de pragas na agricultura. A maior parte deles é baseada em preparações de esporos-cristal derivados de algumas estirpes de tipo selvagem, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 que produz Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa; ou *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD-137 que produz Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Da (SOBERÓN et al., 2009).

Um importante avanço na redução de inseticidas químicos na agricultura veio com o desenvolvimento e utilização das culturas transgênicas, que são capazes de expressar toxinas Cry. Em plantas transgênicas, essa proteína é produzida continuamente, com proteção à degradação UV, visando o controle de pragas que atacam tanto a parte externa como a parte interna da planta (TABASHNIK et al., 2010).

No Brasil, foram utilizadas formulações comerciais de Bt para o controle de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que esses produtos foram aplicados corresponde ao território de Cuba ou a apenas um terço do México, ou seja, totaliza cerca de 150.000 hectares. As principais limitações desses produtos são o elevado custo, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores públicos e privados no seu desenvolvimento e formulação (POLANCZYK e ALVES, 2003).

Embora os produtos comerciais disponíveis restrinjam-se ao controle de lepidópteros, dípteros e coleópteros, mais de 1.000 espécies de insetos pertencentes a diversas ordens de insetos, são suscetíveis a esse patógeno (GLARE e O'CALLAGHAN, 2000).

Os produtos formulados a partir das toxinas Cry apresentam amplo espectro de aplicação como agentes de controle biológico. Tais formulações podem ser sólidas (em pó ou granulada) ou líquidas. Atualmente, existem mais de 400 formulações registradas no mercado. A maioria delas é aplicada diretamente em pulverizações, embora os esporos sejam inativados em alguns produtos pela luz ultravioleta. Uma alternativa de grande sucesso tem sido a expressão das toxinas nas plantas transgênicas, método mais eficaz no controle do inseto-alvo (KHETAN, 2001).

A utilização desse tipo de planta tem a vantagem de reduzir a necessidade de inseticidas e proporcionar uma proteção durante todas as etapas de crescimento, afetar apenas insetos expostos à toxina, ou seja, aqueles que se alimentam das culturas, promovendo aos agricultores uma alternativa aos pesticidas químicos tradicionais (KHETAN, 2001).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2018), os principais produtos à base de *B. thuringiensis* existentes no mercado são: Agree[®], Bac-Control (PM)[®], Bactur (PM)[®], Dipel[®], Ecotech Pro[®] e Xentari[®]. Esses produtos comerciais têm como princípios ativos as linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, que são utilizadas no controle de lagartas desfolhadoras como: *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas), *A. gemmatalis* (lagarta-da-soja) e outras espécies pertencentes à ordem Lepidoptera (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo de toxinas de Cry de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* e seu espectro de ação.

		Grupo de toxinas Cry: 1Aa 1Ab 1Ac 1C 1D 2						
		Produtos Bt contendo toxinas Cry						
Subespécie	Cepa	Nome comercial	Níveis de toxina					
<i>Bt kurstaki</i> <i>strains</i>	SA-12	CoStar	+	++	++++	-	-	+
	SA-11	Delfin	+	++	+	-	-	+
	HD-1	DiPel	+	++	+	-	-	+
<i>Bt aizawai</i> <i>strains</i>	ABTS-1857	XenTari	+	++	-	+	+	-
	GC-91	Agree	-	-	++	+	+	+
Suscetibilidade à toxina Cry de alguns insetos-alvo								
<i>Trichoplusia, Pseudoplusia, etc.</i>			+	++	+++	++	-	++
<i>Plutella xylostella</i>			++	++	+++	++	++	-
<i>Chloridea, Helicoverpa</i>			+/-	+/-	+++	-	-	+
<i>Spodoptera spp.</i>			-	+/-	-	++	+	+/-
<i>Anticarsia gemmatalis</i>			?	?	+++	?	?	++

(Adaptada de: IHARABRAS)

3.2.1 Modo de Ação das Toxinas Cry

As toxinas Cry de *B. thuringiensis* atuam por ingestão, ou seja, as proteínas tóxicas associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino médio dos insetos, causando lise osmótica, por meio da formação de poros na membrana celular, ruptura da integridade intestinal e, conseqüentemente, da digestão, e morte do inseto (FERRÉ e VAN RIE, 2002).

As proteínas passam de pró-toxinas para oligômeros que se inserem nas membranas das células do intestino médio do inseto, causando o vazamento de íons

e a lise celular. As inclusões cristalinas são ingeridas por larvas e são dissolvidas em meio alcalino no intestino médio, e as pró-toxinas inativas são solubilizadas por proteases do intestino médio, produzindo proteínas resistentes a proteases de 60 a 70 kDa. A ativação da toxina envolve a remoção proteolítica de um peptídeo N-terminal com 25 a 30 aminoácidos para proteínas Cry1, 58 para Cry3A e 49 para CryAa e, aproximadamente metade da proteína restante do C-terminal em longas pró-toxinas Cry. A princípio a toxina ativada se liga a receptores glicoprotéicos específicos nas microvilosidades do intestino, formando poros líticos nas microvilosidades da membrana apical. Posteriormente, ocorre lise celular e rompimento do epitélio no intestino médio, liberando o conteúdo celular e fornecendo aos esporos um meio propício que leva a uma septicemia e à morte do inseto (FERRÉ e VAN RIE, 2002).

Dois grupos de pesquisadores descreveram modelos que compõem o mecanismo de ação. O primeiro modelo postula a formação de um oligômero por ligação a um receptor secundário inserido na membrana do intestino médio para formar poros que causam um desequilíbrio osmótico e conduz à ruptura celular (BRAVO et al., 2011). O segundo modelo propõe que o receptor de membrana de ligação primária desencadeia uma série de sinais intracelulares resultando em morte celular (IBRAHIM et al., 2010).

3.2.2 Mecanismos de Resistência dos Lepidópteros às Toxinas Cry

Três diferentes mecanismos bioquímicos de resistência a Bt têm sido descritos, são eles (1) o processamento proteolítico da protoxina, (2) a melhoria no reparo das células danificadas do intestino médio e (3) a modificação do sítio de ligação da proteína Cry. Porém, somente o mecanismo de redução do sítio de ligação da proteína tem potencial como agente causal da resistência, devido à modificação bioquímica e ao decréscimo na suscetibilidade. Essa observação, somado à variedade de sítios de ligação das proteínas Cry, em insetos, indica que δ -endotoxinas com diferente especificidade de ligação devem ser consideradas para o uso em estratégias de manejo de resistência (FERRÉ e VAN RIE, 2002).

O cultivo em larga escala de plantas Bt tem levantado questões sobre os possíveis efeitos adversos a longo prazo no ambiente. Os principais problemas que podem surgir com esta tecnologia são: o desenvolvimento da resistência em pragas pela pressão de seleção, o potencial impacto sobre o solo e insetos benéficos, como

predadores e parasitóides, assim como o possível aumento do número de pragas secundárias e da transferência horizontal de transgenes para espécies selvagens (SANAHUJA et al., 2011). Diante disso, o impacto das culturas transgênicas deve ser examinado cuidadosamente antes da liberação para seu uso comercial, respeitando as normas de biossegurança e as recomendações definidas pelas empresas detentoras da tecnologia, e usando adequadamente as estratégias de manejo de resistência dos insetos (IBRAHIM et al., 2016).

O primeiro relato de resistência às toxinas de *B. thuringiensis* ocorreu em 1985, em uma população de laboratório de *Plodia interpunctella*, a qual apresentou uma razão de resistência de 100 vezes após ser criada por 15 gerações em dieta artificial tratada com Dipel® (McGAUGHEY, 1985). Estudos bioquímicos indicaram que essa população possuía uma alteração no sítio de ligação da proteína inseticida no intestino médio.

A seleção de populações de insetos resistentes em condições de laboratório demonstra que, quando existe suficiente variabilidade genética inicial, o inseto pode desenvolver resistência a produtos à base de Bt ou suas proteínas Cry. Pesquisadores relataram que *Chloridea virescens* coletadas do campo desenvolveram resistência de 500 vezes à proteína Cry1Ac após 19 gerações de seleção (GOULD et al., 1995). Relataram, ainda, que, após sete gerações de seleção, *Helicoverpa zea* desenvolveu resistência de até 100 vezes à toxina Bt (LUTTRELL et al., 1999), bem como documentaram a capacidade de *C. virescens* de adquirir resistência ao Bt (STONE et al., 1989).

Existem fatores que podem estar relacionados ao desenvolvimento da resistência dos insetos a patógenos ou toxinas. Todavia, essa possibilidade pode ainda estar relacionada ao sistema imunológico, através de estruturas como os hemócitos, presentes na hemolinfa, que estão associados à defesa contra os patógenos, ou uma resistência localizada nas estruturas responsáveis pela entrada das toxinas Cry no organismo, como o tubo digestivo, onde a infecção se inicia. O intestino médio é considerado o principal local de digestão e absorção de nutrientes e dos compostos químicos e biológicos, razão que levaram os pesquisadores a questionar se existem diferenças morfológicas entre populações suscetíveis e resistentes (NEGREIRO et al., 2004).

O estudo de Levy (2005) identificou as diferenças estruturais na arquitetura do intestino médio de lagartas da soja como um fator de resistência ao comparar

populações resistentes e suscetíveis ao vírus AgMNPV (vírus da poliedrose nuclear de *A. gemmatilis*). Verificou que a população resistente apresentava uma maior concentração de células regenerativas e uma maior quantidade de protrusões citoplasmáticas nas células colunares.

O primeiro caso de resistência às plantas contendo as toxinas Cry foi descrito em populações de *S. frugiperda*, em Porto Rico, com milho Bt que expressava a proteína Cry1F. O mencionado caso ocorreu apenas quatro anos após a liberação comercial desse milho, tornando-se o mais rápido a apresentar resistência a campo para uma cultura contendo genes de *B. thuringiensis* (MATTEN et al., 2008).

Fatores que contribuíram para uma maior pressão de seleção sobre as populações selvagens de *S. frugiperda* foram: a suscetibilidade dessa praga à proteína expressa na cultura do milho, o plantio contínuo de plantas Bt ao longo do ano e a migração limitada de insetos e condições de secas que favoreceram a concentração das populações da praga em áreas das culturas geneticamente modificadas irrigadas (STORER, 2010). No Brasil, FARIAS et al. (2014) relataram uma população resistente de *S. frugiperda* ao milho TC1507, expressando a toxina Cry1F. Além disso, MONNERAT et al. (2015) notaram uma diminuição do controle de *S. frugiperda* com milho Bt expressando a toxina Cry1Fa na região do cerrado brasileiro, mostrando que a população resistente do campo apresentava taxas de resistência 10 vezes maior em comparação com uma colônia suscetível de laboratório.

As estratégias de manejo da resistência podem ser utilizadas separadamente ou combinadas entre si. São elas: o uso de um híbrido ou variedade que expresse a toxina Cry em alta concentração em todos os tecidos da planta (CAPRIO et al., 2000), a implantação de áreas de refúgio, o uso de plantas com pirâmides de genes que envolvem a expressão de duas ou mais proteínas na mesma variedade transgênica, a utilização de baixa dose da proteína Bt no manejo integrado de pragas, a rotação de culturas realizada com plantas Bt que expressam diferentes toxinas Cry e plantas convencionais (WU e GUO, 2003) e a mistura de sementes e plantas armadilhas de plantas Bt e não Bt, constituindo uma lavoura de plantas resistentes e suscetíveis distribuídas ao acaso (TABASHNIK et al., 2009). Da mesma maneira, o manejo da resistência pode ser complementado com o uso de produtos comerciais para os quais não existiria resistência cruzada com a(s) toxina(s) presente(s) na planta modificada.

3.3 HISTOPATOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DE LEPIDOPTEROS AFETADOS POR *Bacillus thuringiensis*

O canal alimentar nos insetos é uma barreira físico-química eficaz contra patógenos que são ingeridos junto da alimentação. Nas espécies que se alimentam basicamente de sólidos o canal digestivo apresenta-se como um tubo reto, longo ou curto, com musculatura desenvolvida e proteção contra abrasão ou ferimentos mecânicos. Essas características são típicas de larvas de lepidópteros, gafanhotos e baratas (GULLAN; CRANSTON, 2007). Em geral, o intestino está dividido em três regiões, cada uma com uma função diferente: intestino anterior (estomodeu), intestino médio (mesêntero) e intestino posterior (proctodeu) (CHAPMAN, 1998).

A região estomodeu, está relacionada com a ingestão, o armazenamento, a trituração e o transporte do alimento para a próxima região, o mesêntero - considerada a principal via de assimilação dos inseticidas químicos e biológicos -, na qual são produzidas enzimas digestivas e onde ocorre a absorção de alimentos. Por fim, o material remanescente no lúmen do trato digestivo, juntamente com a urina, chega à região proctodeu, onde é eliminado pelas fezes (CHAPMAN, 1998; LEVY et al., 2004).

No caso de *A. gemmatalis*, o intestino médio é composto de uma camada acelular chamada membrana peritrófica, seguida pela camada epitelial e posteriormente pela camada muscular (LEVY et al, 2009). A membrana peritrófica tem função de proteger o epitélio contra abrasão do conteúdo intestinal, atuando como barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão (EISEMANN; BINNINGTON, 1994), além de formar uma barreira que impede a entrada de microrganismos na cavidade do corpo e na hemocele (TERRA, 2001).

O epitélio do intestino médio nas lagartas de lepidópteros é classificado como pseudoestratificado colunar e possui três principais tipos celulares diferentes: as células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (LEVY et al., 2004). As células colunares apresentam a superfície apical com microvilosidades, projeções citoplasmáticas e núcleo alongado. São as mais abundantes no epitélio intestinal e possuem várias funções, como secreção de enzimas digestivas, da membrana peritrófica e absorção de produtos assimilados da digestão (RICHARDS; DAVIES, 1994; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996). As células caliciformes possuem invaginações da membrana plasmática apical, formando uma cavidade semelhante a um cálice margeado por projeções citoplasmáticas aparentemente iguais a microvilosidades que

contêm mitocôndrias e com núcleo basal. Essas células auxiliam as células colunares na homeostasia iônica e na absorção de metabólitos (MOFETT; KOCH, 1995; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998). As células regenerativas, por sua vez, são observadas na base do epitélio, individualmente ou em grupos, e apresentam citoplasma escasso, com um núcleo central e poucas organelas presentes. Sua função está relacionada a regeneração epitelial, mais decorrente durante as ecdises ou após a exposição a algum patógeno. (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999; LEVY et al., 2004).

Considerando a arquitetura do epitélio intestinal das larvas de lepidópteros, Levy et al. (2009) em estudos morfométricos comparativos entre populações de larvas de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis ao vírus AgMNPV, observaram diferenças nesse órgão entre as duas populações larvais. Em larvas resistentes, essas células epiteliais apresentavam valores morfométricos superiores em relação às larvas suscetíveis, sugerindo que esse fato poderia estar relacionado com a resistência dessas larvas ao AgMNPV.

O primeiro relato sobre o modo de ação da δ -endotoxina de *B. thuringiensis* em lagartas é o de Heimle e Angus (1959), que observaram que a intoxicação do inseto suscetível ocorre em poucos minutos após a ingestão dos cristais. O efeito dessa toxina no movimento intestinal do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) foi estudado por Hukhara et al. (1984), que relataram que a administração de cristais tóxicos de Bt às larvas resultou na inibição dos movimentos contráteis rítmicos do intestino.

Luethy e Studer (1986) descobriram que a quebra do epitélio intestinal é a principal ação letal da δ -endotoxina de Bt var. *israelensis*. A toxina age por perturbação do sistema de permeabilidade da membrana. Singh et al. (1986) estudaram a ação tóxica de Bt var. *israelensis* em *Aedes aegypti in vivo* e descobriram que os músculos esqueléticos incham, a membrana plasmática se separa das miofibrilas subjacentes e as mitocôndrias perdem sua integridade estrutural.

Os estudos de Sharaby e El-Bendary (2017) demonstraram claramente alterações histopatológicas no epitélio do intestino médio de larvas de *Spodoptera littoralis*. No terceiro dia após a infecção com Bt. var. *aizawai* HD-282 houve o encolhimento e a separação das células do intestino médio deixando muitos vacúolos entre elas, além do que a membrana peritrófica ficou parcialmente encolhida. No quarto dia houve lise das células epiteliais, inchaço e ruptura de algumas células, bem como um aumento na vacuolização ao lado da descarga de algumas células no lúmen

do intestino. No quinto dia após a infecção com Bt a membrana peritrófica foi completamente destruída, ocorreu desintegração das microvilosidades e hipertrofia parcial das células do intestino médio ficando alongadas e inchadas. No sexto dia ocorreu a destruição completa das células epiteliais do intestino médio.

O inchaço e a lise das células intestinais indicam a penetração do fluido nas células. Esse fenômeno pode estar relacionado à alteração do sistema de regulação iônica intermembranosa (FAST e MORRISON, 1972; GRINGORTEN, 2001; LUCA et al., 2012). O fato é que essas alterações no intestino podem afetar o desenvolvimento do inseto e também causar grandes eventos fisiológicos, como mudanças na absorção de nutrientes, transformação degenerativa, perda de apetite, abandono de alimento, paralisia intestinal, distúrbios fisiológicos e paralisia total.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CRIAÇÃO DAS POPULAÇÕES

Nesta pesquisa, foram utilizadas duas populações de *A. gemmatalis*, uma suscetível e outra resistente a proteína Cry1Ac, todas estabelecidas na Embrapa Soja (Londrina-PR). Os adultos foram mantidos em gaiolas para oviposição e as lagartas foram criadas em dieta artificial de Greene et al. (1976), a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com $70 \pm 10\%$ de umidade e fotoperíodo de 14L:10E, conforme protocolo de HOFFMANN-CAMPO (1985). A raça de *A. gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac foi obtida através da pressão de seleção em condições laboratoriais, a partir da população suscetível, sendo que a taxa de resistência era de 382 vezes no momento da montagem dos bioensaios.

4.2 SUSCETIBILIDADE DAS POPULAÇÕES AOS PRODUTOS COMERCIAIS À BASE DE *B. thuringiensis*

A suscetibilidade foi determinada incorporando sete concentrações de cada bioinseticida na dieta de Greene et al. (1976) (Tabela 2), sendo a testemunha alimentada com dieta sem bioinseticida. Os produtos comerciais foram incorporados quando a dieta artificial estava a 53°C e distribuída em bandejas plásticas de 32 células (Advento do Brasil Ind. e Comércio de Plásticos, SP).

Tabela 2. Concentrações de cada produto ($\mu\text{g ia.ml}^{-1}$ de dieta) utilizadas nos bioensaios para cada população.

<i>A. gemmatalis</i> - Suscetível			<i>A. gemmatalis</i> – Resistente		
Agree®	Dipel®	Xentari®	Agree®	Dipel®	Xentari®
1,30	0,11	1,78	13,2	1,68	12,85
1,95	0,17	2,32	20,0	2,52	16,74
2,95	0,25	3,0	29,6	3,79	21,7
4,45	0,38	3,94	44,45	5,68	28,2
6,70	0,57	4,86	66,7	8,53	36,72
10,00	0,85	5,13	100,0	12,8	47,8
15,00	1,28	6,64	150,0	19,2	62,1

Após a solidificação da dieta, duas lagartas de *A. gemmatalis* em final de segundo instar foram transferidas para cada célula da bandeja. O total de lagartas por bioensaio variou entre 420 e 1080 lagartas. As bandejas foram mantidas em câmaras BOD a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 14L:10E e umidade relativa de $70 \pm 10\%$. Para fins de contagem de mortalidade, foram consideradas apenas as lagartas mortas até o sétimo dia após a inoculação e que apresentavam sintomas da infecção.

4.2.1 Análises de dados

A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente até o 7º dia e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o modelo Weibull-2, que na parametrização utilizada corresponde ao modelo linear generalizado com função de ligação complemento log-log. Essa classe de modelos é especialmente útil quando a distribuição dos dados é assimétrica em relação à média. A análise foi executada no ambiente R, utilizando para o ajuste dos modelos e estimações das concentrações letais o pacote DRC (RITZ et al., 2015).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia gemmatalis* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS À PROTEÍNA Cry1Ac

4.3.1 Inoculação das lagartas

A inoculação das lagartas das duas populações de *A. gemmatalis* foi realizada com a bactéria HD-73 liofilizada que expressa apenas a toxina Cry1Ac, utilizando o método de incorporação na dieta de Greene et al. (1976). O tratamento controle consistiu na alimentação com dieta artificial com apenas adição de água destilada sem a bactéria. Após a geleificação da dieta, 30 lagartas em final de 3º instar de cada população foram inoculadas com as respectivas concentrações, sendo $14,4\mu\text{g}$ de Cry1Ac.ml⁻¹ de dieta para as lagartas resistentes e $0,42\mu\text{g}$ de Cry1Ac.ml⁻¹ de dieta para as lagartas suscetíveis, com três repetições (FERRAL PIÑA, 2016). Ambas as populações foram alimentadas por 16 horas (LEVY, 2005) para posterior coleta do intestino médio.

4.3.2 Coleta e dissecação do intestino médio

Os procedimentos histológicos foram realizados no Laboratório de Insetos do Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina-PR. A coleta dos intestinos foi realizada em 6 lagartas de *A. gemmatalis* para cada tratamento, anestesiadas por resfriamento a -4°C (5 minutos) e dissecadas sob microscópio estereoscópio com solução salina para insetos (1,80g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16g de CaCl₂; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada-q.s.p 100mL). Os insetos foram fixados pelas extremidades com alfinetes entomológicos em placas de Petri preenchidas com parafina. Utilizando tesoura oftalmológica, foi realizada uma incisão longitudinal na região ventral do primeiro segmento torácico ao penúltimo segmento abdominal, com rebatimento lateral da cutícula das lagartas (LEVY et al., 2005).

4.3.2 Fixação e montagem das lâminas histológicas

Os tubos coletados foram fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por 6 horas. Após a fixação, o material foi lavado em solução de álcool etílico 70%, desidratado em série crescente (80, 95 e 100% por 20 minutos em cada diluição) e pré-infiltrado em solução de resina pura (hidroxetilmetacrilato + ativador) e álcool etílico 95% (1:1) por 4 horas em temperatura ambiente. Após esse processo, o material foi infiltrado em resina pura (kit de embebição Historesin[®] Leica) em temperatura ambiente por 12 horas e incluído em moldes apropriados de polietileno com solução de 15ml de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + ativador (dibenzoilperóxido) e 1ml endurecedor (dimetilsulfóxido) e mantido em estufa a 37° até a polimerização da resina. O molde polimerizado foi cortado com espessura de 3 μm , com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo, e colocado em lâminas de vidro previamente limpas com álcool etílico-éter.

Os cortes foram processados para coloração, hidratados (5 minutos) em água destilada, corados pela hematoxilina de Harris (30 minutos) e lavados em água corrente (5 minutos). Posteriormente, o material foi corado com eosina aquosa (5 min), desidratados em soluções crescentes de álcool etílico 90% (5 min) e 100% (5 min), diafanizados em 3 banhos de xilol (10 min cada um) e as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá, para posterior análise ao microscópio de luz.

4.3.3 Análise quantitativa

Após a secagem, as lâminas foram analisadas e as imagens capturadas com auxílio de uma câmera de alta resolução acoplada ao fotomicroscópio AXIO IMAGER A1 (Zeiss, São Paulo). Para a obtenção das imagens, cada intestino médio foi dividido em duas partes, anterior e posterior, e para cada região foram capturadas 6 imagens, 3 contendo a parede superior e 3 contendo a parede inferior.

Uma vez obtidas as imagens, as células colunares, calciformes e regenerativas das duas regiões do intestino médio de cada tratamento foram contadas separadamente. Os valores encontrados foram todos proporcionais para uma mesma extensão do tubo de 1000 μ m. Os dados de contagem e de extensão foram mensurados utilizando o software de análise de imagens Motic Images Plus 3.0 ML e os resultados foram submetidos a análise estatística (ANOVA), utilizando o programa SAS-Statistical Analysis System, versão 9.2 e as medias comparadas através do teste Tukey a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SUSCETIBILIDADE DAS POPULAÇÕES AOS PRODUTOS DIPEL, XENTARI E AGREE

De acordo com a Tabela 3, o produto biológico comercial que apresentou maior atividade biológica, tanto na população de *A. gemmatalis* resistente como na suscetível, foi o Xentari®, uma vez que este apresentou o maior incremento de mortalidade em torno da CL₅₀ para cada micrograma do produto por mililitro da dieta oferecida. O bioinseticida com menor atividade biológica foi o Dipel®, que resultou no menor incremento de mortalidade por unidade de concentração.

Observando a razão entre as CL₅₀ dos indivíduos resistentes e indivíduos suscetíveis, o Dipel® apresentou atividade aproximadamente 42 vezes menor na população resistente a Cry1Ac que na suscetível, enquanto essas proporções para o Agree® e o Xentari® foram aproximadamente 18 e 11, respectivamente. Embora o Dipel® tenha apresentado a maior atividade biológica em populações suscetíveis, seu desempenho foi drasticamente inferior na população resistente (Figura 1).

Tabela 3. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* resistentes (R) e suscetíveis (S) a produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*.

Produto	População	N	$b^* \pm \hat{\sigma}_b$	CL ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\hat{\sigma}_{\text{CL}_{50}}$	95% – IC	$\frac{\text{CL}_{50}(\text{R})}{\text{CL}_{50}(\text{S})}$
Agree®	S	1080	1,24 ± 0,27	2,88	0,95	1,03-4,74	18,06
	R	1080	1,44 ± 0,23	52,09	18,97	14,91-89,27	
Dipel WP®	S	600	1,12 ± 0,15	0,25	0,09	0,08-0,43	41,55
	R	720	1,11 ± 0,14	10,42	3,57	3,41-17,42	
Xentari®	S	1080	1,93 ± 0,28	2,36	0,57	1,24-3,49	10,89
	R	720	1,85 ± 0,14	25,75	5,25	15,46-36,03	

* b é diretamente proporcional ao incremento de mortalidade nas proximidades da CL₅₀.

*N=número de insetos; b=taxa de variação na mortalidade nas proximidades da CL₅₀, quando se altera $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do produto na dieta; CL₅₀=concentração letal para 50% dos indivíduos; $\hat{\sigma}_b$ =Erro padrão da estimativa de b ; $\hat{\sigma}_{\text{CL}_{50}}$ = Erro padrão da estimativa da CL₅₀; IC=Intervalo de confiança para a CL₅₀.

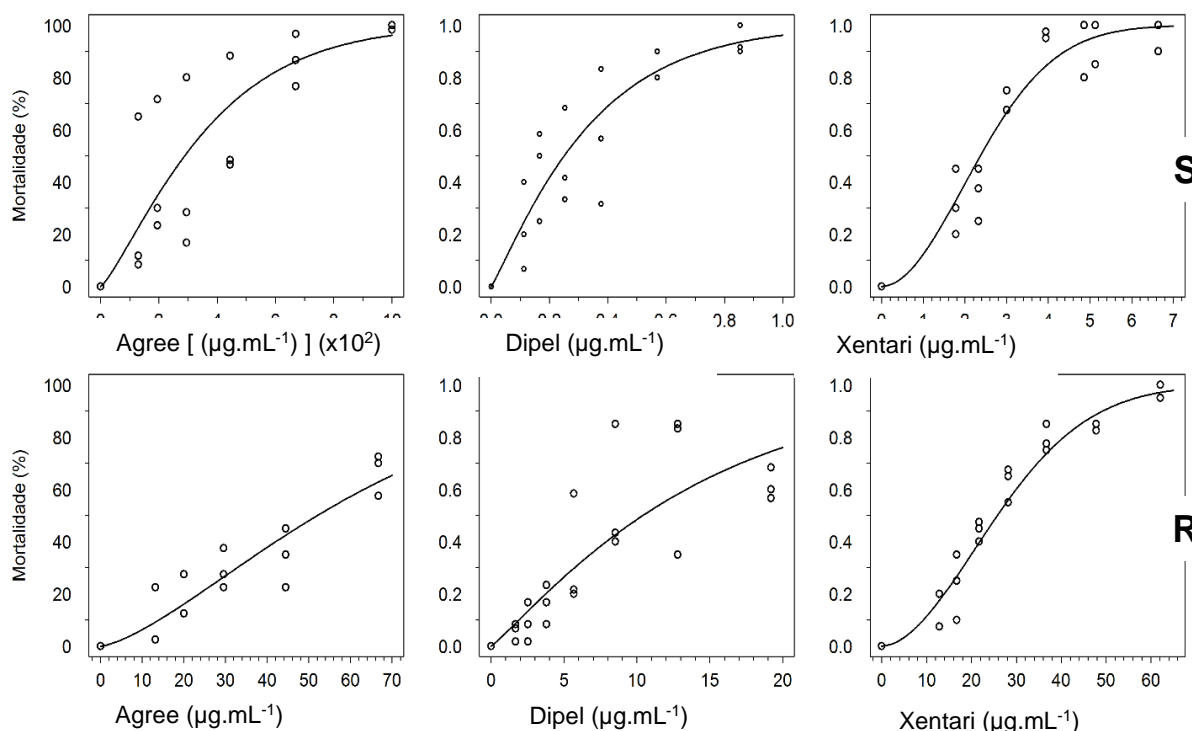


Figura 1. Mortalidade das populações suscetíveis (S) e resistentes (R) de *A. gemmatilis* aos produtos Agree, Dipel e Xentari em μg de ingrediente ativo. mL^{-1} de dieta

Várias hipóteses podem ser colocadas para tentar explicar as diferenças na toxicidade entre formulações considerando uma mesma população de inseto. Segundo Takelar e Shelton, (1993), isso pode ocorrer em razão da presença ou não de toxinas Cry biologicamente ativas, ou devido às diferenças nas proporções das toxinas entre os produtos. Além disso, os efeitos sinérgicos ou aditivos entre as toxinas nos produtos e também diferentes lotes dos produtos podem variar quanto ao seu potencial biológico. Entretanto, as empresas durante o processo de controle de qualidade verificam as proporções nos seus ingredientes ativos.

O Dipel® é composto pelo *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, linhagem HD-1, e apresenta as toxinas Cry1Aa, 1Ab e 1Ac, tendo em maiores quantidades a Cry1Ab e Cry1Ac. Já o Agree® é composto pelo *B. thuringiensis* var. *aizawai*, linhagem GC-91 que apresenta principalmente a toxina Cry1Ac e, em menor quantidade, a Cry1C e 1D. O Xentari® (*B. thuringiensis* var. *aizawai*) possui as toxinas Cry1Aa, 1Ab, 1C e 1D (VALENT BIOSCIENCE CORPORATION, 2009). As toxinas podem ainda atuar individualmente ou em conjunto, potencializando a toxicidade individual de cada uma em cada produto (XUE et al., 2005; WEI et al., 2015). Ademais, a combinação das

toxinas pode reduzir o efeito inseticida (AMEEN et al., 1998; GARBUTT et al., 2011), provavelmente pela competição por um mesmo receptor no intestino da lagarta (GÓMEZ et al., 2007).

As diferenças na suscetibilidade podem ter como principal causa a presença ou ausência de receptores específicos para as toxinas Cry nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio da lagarta (GÓMEZ et al., 2007). Qualquer interferência associada ao modo de ação do Bt auxilia na sobrevivência do inseto e, portanto, no desenvolvimento da resistência (TABASHNIK, 1994). A menor suscetibilidade de *A. gemmatalis* resistente para todas as cepas de *B. thuringiensis* ensaiadas neste estudo indica maior risco de utilizar produtos à base dessas bactérias nas áreas de refúgio.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DO TIPOS CELULARES DO INTESTINO MÉDIO DE *Anticarsia gemmatalis* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A Cry1Ac TRATADAS COM *Bacillus thuringiensis*

5.2.1 Células Colunares (Co)

As células colunares foram observadas em maior quantidade em todos os tratamentos em relação aos outros tipos de células observadas. De acordo com diversos autores (LEVY et al., 2004; OKUDA e ALMEIDA, 2007; FIALHO, 2009; SOUSA, 2009), as células colunares são consideradas as mais numerosas no epitélio intestinal e podem ser denominadas como células digestivas ou principais (Figura 6).

A partir da Tabela 5, ao analisamos somente as Co, as lagartas suscetíveis tratadas com a bactéria HD-73 apresentaram maior número de células do que as lagartas sem tratamento (Figura 3A). Entretanto, a população resistente tratada com a mesma bactéria não apresentou alterações do número das Co em nenhuma região do intestino médio (Figura 3B).

A linhagem suscetível (Figura 6A) não tratada apresentou significativamente maior número de Co na região posterior do que na região anterior do intestino médio (Figura 3C). De acordo com Terra (2001), a região final do intestino médio seria mais alcalina e conseqüentemente a atividade das proteinases seriam mais intensas, justificando o maior número de células colunares. Levy et al. (2009), utilizando técnica de fluorescência com WGA ("wheat germ agglutinin" - aglutinina do gérmen de trigo) acoplada ao FITC (isotiocianato de fluoresceína) para marcação de quitina na

membrana peritrófica, notaram maior intensidade de marcação na região posterior de *A. gemmatalis*. Para os referidos autores, isso indicaria uma diferença na quantidade de quitina e outras proteínas produzidas pelas células colunares nessa região.

Ao comparar as populações suscetíveis e resistentes (Figura 6B), não foi observada diferença significativa entre o número de células colunares, tanto nas lagartas tratadas com Bt (Figura 6C e D) como nas lagartas controle (Figura 6A e B), em ambas as regiões do intestino (Figura 3E e 3F).

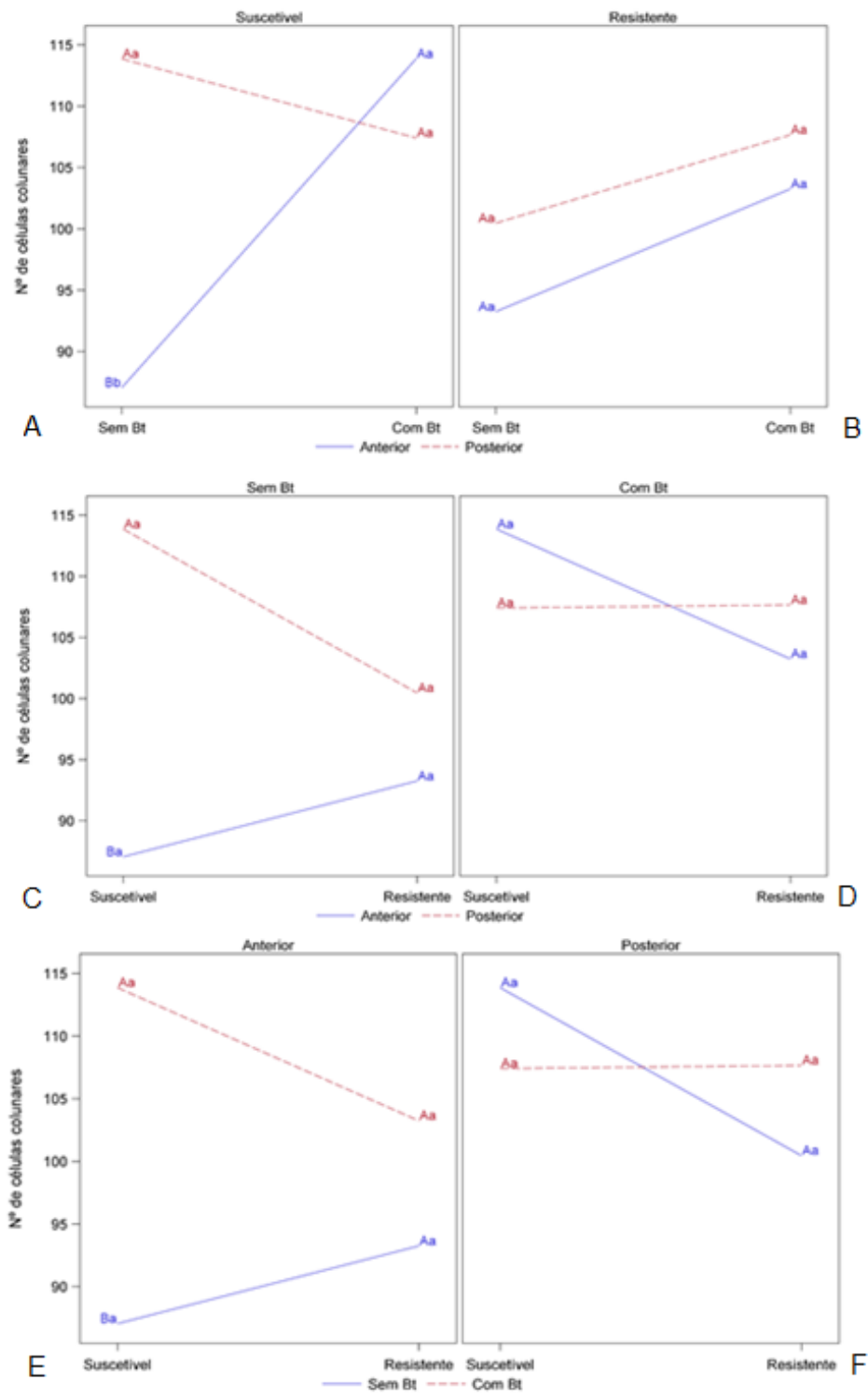


Figura 2. Número de células colunares em 1000µm de extensão nas linhagens suscetível e resistente tratada e não tratada com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis*. As letras maiúsculas comparam os tratamentos no alinhamento vertical e as letras minúsculas no alinhamento horizontal (Tukey a 5%).

Tabela 4. Comparação do número de células colunares entre lagartas de *A. gemmatalis* tratadas e não tratadas com a bactéria HD-73 (Bt).

			Nº de células colunares								
			Lagartas								
			1	2	3	4	5	6	Média ¹	Erro Padrão	
Suscetível	Sem Bt	ANT	74.4	74.2	110.2	52.4	101.7	109.2	87.03	B	3.8
		POS	112.3	136.1	110.9	99.3	99.2	125.3	113.86	A	4.4
	Com Bt	ANT	112.3	136.1	110.9	99.3	99.2	125.3	113.86	A	4.4
		POS	112.3	138.5	98.0	104.6	96.5	94.5	107.40	A	4.2
Resistente	Sem Bt	ANT	93.7	62.7	79.6	100.1	89.6	133.8	93.24	A	3.9
		POS	148.4	83.4	99.1	105.4	52.1	114.3	100.45	A	4.1
	Com Bt	ANT	118.2	99.9	108.3	114.8	91.7	86.5	103.23	A	4.1
		POS	137.5	89.9	73.7	119.6	123.3	101.9	107.65	A	4.2

ANT= porção anterior do intestino médio;

POS= porção posterior do intestino médio;

¹Tukey a 5% de probabilidade

5.2.2 Células Caliciformes (Ca)

Assim como foi observado neste estudo, as células caliciformes são consideradas o segundo tipo células mais numeroso no epitélio intestinal (Figura 6) (Tabela 6). Levy et al. (2004), trabalhando com *A. gemmatalis* e Moscardi (2014), com *S. cosmioides*, descreveram que esse tipo celular apresentou uma grande região basal, citoplasma acidófilo e núcleo basal. As células caliciformes são importantes para homeostase interna, transportando íons, especialmente potássio da hemolinfa para o lúmen, alcalinizando o meio (LEHANE e BILLINGSLEY, 1996).

As lagartas não tratadas da linhagem suscetível (Figura 6A) apresentaram maior número de Ca na região posterior do intestino médio em relação à região anterior. Esse aspecto pode ocorrer pois essa região é a responsável pela intensa síntese de enzimas digestivas e, conseqüentemente, maior alcalinização dessa região para o pH ótimo para funcionalidade da digestão (TERRA, 2001). Após o tratamento com a bactéria (Figura 6C), houve aumento no número de Ca, na região anterior do intestino (Figura 4A).

As lagartas resistentes (Figura 6B e D) não mostraram diferenças significativas entre as regiões após a inoculação (Figura 4B). Comparando os dados entre lagartas suscetíveis e resistentes tratadas com Bt, na região posterior do intestino, foi notado um aumento significativo de Ca nas suscetíveis, no caso da linhagem resistente a

infecção não interferiu na produção de células nessa porção do intestino (Figura 4F). A linhagem suscetível tratada com a bactéria teve maior número de Ca na região anterior quando comparado com a mesma população sem tratamento (Figura 4E).

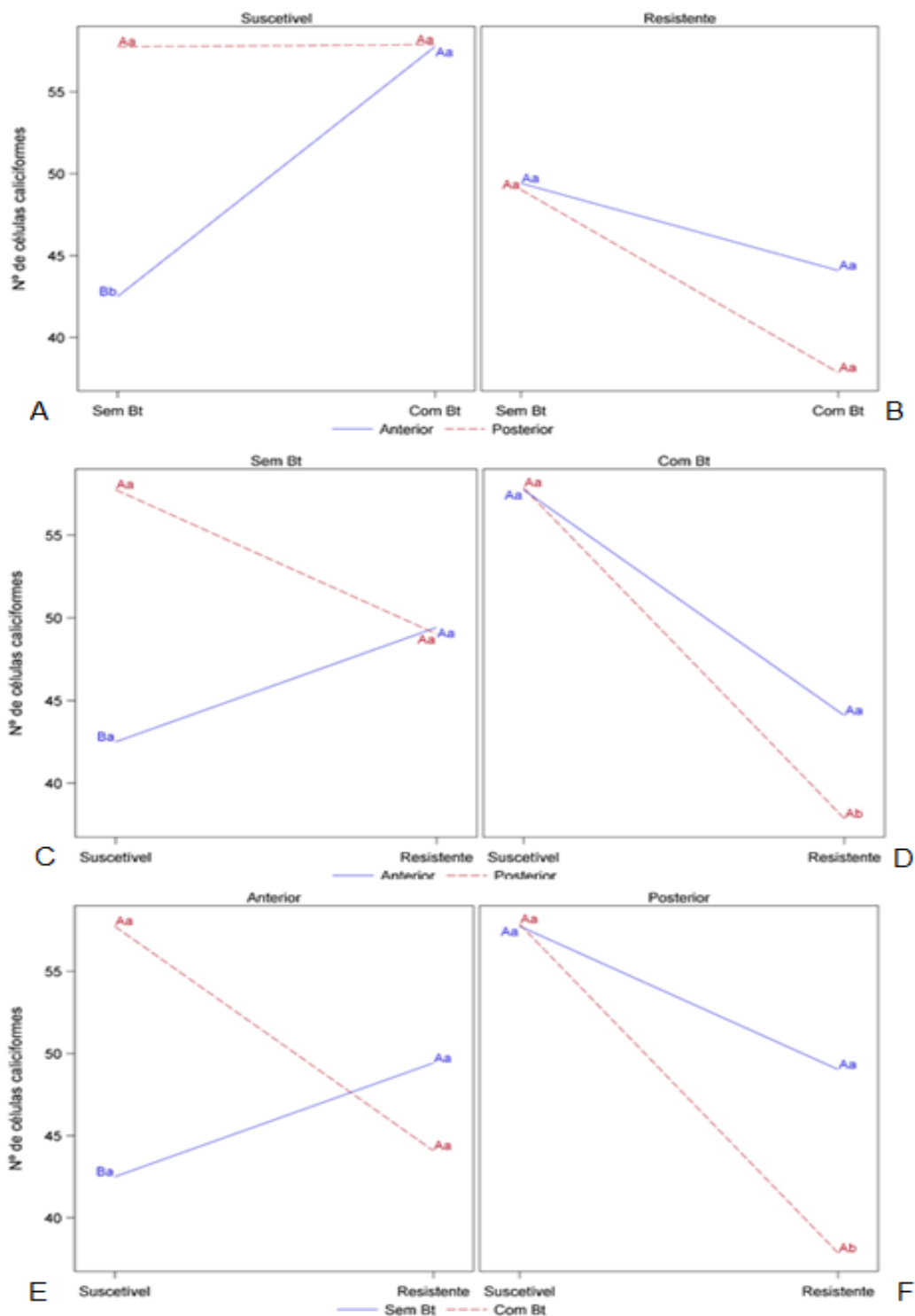


Figura 3. Número de células caliciformes em 1000µm de extensão nas linhagens suscetível e resistente tratada e não tratada com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis*. As letras maiúsculas comparam os tratamentos no alinhamento vertical e as letras minúsculas no alinhamento horizontal (Tukey a 5%).

Tabela 5. Comparação do número de células caliciformes entre lagartas de *A. gemmatilis* tratadas e não tratadas com a bactéria HD-73 (Bt).

			Nº de células caliciformes								
			Lagartas								
			1	2	3	4	5	6	Média ¹	Erro Padrão	
Suscetível	Sem Bt	ANT	36.2	39.4	63.8	21.2	47.2	47.1	42.50	B	3.7
		POS	49.3	70.7	57.5	37.0	62.2	69.8	57.75	A	5.0
	Com Bt	ANT	49.3	70.7	57.5	37.0	62.2	69.8	57.75	A	5.0
		POS	50.1	73.9	55.0	56.3	54.3	57.7	57.88	A	5.0
Resistente	Sem Bt	ANT	55.6	36.6	38.3	53.5	50.9	61.7	49.41	A	4.3
		POS	55.6	45.0	44.0	60.0	31.7	57.8	49.03	A	4.2
	Com Bt	ANT	50.3	50.0	29.7	55.1	39.5	40.0	44.09	A	3.8
		POS	47.2	33.1	31.8	42.8	38.8	33.3	37.86	C	3.3

ANT= porção anterior do intestino médio;

POS= porção posterior do intestino médio;

¹Tukey a 5% de probabilidade

5.2.3 Células Regenerativas (Re)

As células regenerativas foram encontradas isoladamente, emparelhadas ou em grupos na região basal do epitélio intestinal (Figura 6), e possuem formato arredondado ou oval, com citoplasma fortemente basófilo, conforme relataram Levy et al. (2004) e Pinheiro e Gregório (2008).

Esse grupo de células está relacionados ao processo de renovação epitelial, o qual consiste da substituição de células eliminadas e/ou danificadas, geralmente células colunares e caliciformes, por outras desenvolvidas a partir da divisão mitótica dessas células (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999), o que pode influenciar na quantidade de células desse tipo de acordo com o tratamento imposto.

Como pode ser visto na Tabela 7, a linhagem suscetível não tratada (Figura 6A) teve maior número de Re na região posterior em relação à região anterior. Os indivíduos suscetíveis tratados com Bt (Figura 6C) mostraram maior número de Re na região anterior quando comparados com a mesma região das lagartas não tratadas (Figura 5A).

Entre a linhagem de insetos resistente (Figura 6B e D), as lagartas não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tratamentos (Figura 5B), o que permite acreditar que a toxina não age na proliferação celular no intestino médio das lagartas resistentes.

A população resistente sem tratamento teve mais Re na região anterior em relação a mesma região da população suscetível também sem tratamento (Figura 5C). Nesse caso, é possível acreditar que as larvas resistentes têm a maior capacidade de renovação celular, que poderia tornar a população mais rápida na limpeza do epitélio caso haja alguma invasão, como ocorre com a infecção por exemplo. Esse aumento na quantidade destas células foi semelhante ao observado por Cruz (2014) após a pressão de seleção realizada na obtenção da população resistente a proteína Cry1Ac.

Os insetos suscetíveis tratados com Bt mostraram maior número de Re na região anterior do intestino médio do que na mesma região dos indivíduos resistentes tratados. Ainda na região anterior, a população suscetível tratada com Bt teve maior número de Re quando comparada às lagartas suscetíveis sem tratamento (Figura 5E). De alguma forma esses insetos tentam acionar os mecanismos de proteção já na região inicial do intestino, tentando repor células que estariam sendo atingidas pelo Bt. No entanto, nem sempre isso é possível já que nessa linhagem há uma alta mortalidade após os tratamentos com a toxina.

Diferentemente dos nossos resultados, Sousa et al. (2010) em trabalho desenvolvido com o lepidóptero *Alabama argillacea* (Hübner) infectadas com a proteína Cry1Ac, mostraram redução significativa na quantidade de Re. A redução do número dessas células seria uma consequência do aumento da taxa de transformação em outros tipos celulares.

A população suscetível mostrou maior número de Re do que a população resistente quando tratadas (Figura 5D) e menor número do que as resistentes quando não tratadas (Figura 5C). Levy (2005) observou que lagartas resistentes ao vírus AgMNPV apresentaram maior número de células regenerativas quando comparadas a população suscetível.

A formação de protrusões citoplasmáticas no processo de liberação e/ou descarte para o espaço ectoperitrófico é considerada um processo normal de renovação epitelial, ou ainda, pode estar relacionado ao processo de degeneração celular como resultado da renovação epitelial (ANDERSON; HARVEY, 1966; DE PRIESTER, 1971), à eliminação de artefatos (RYERSE et al., 1992), à secreção

apócrina ou microapócrina na liberação de enzimas digestivas (SANTOS e TERRA, 1984; WOOD e LEHANE, 1991), ou ainda à ação de microrganismos (BROOKS et al., 2002).

Alguns lepidópteros resistem à infecção por baculovírus por apoptose seletiva ou descamação de células infectadas fora do intestino (CLEM, 2001). Nas imagens avaliadas no presente estudo não foi possível visualizar esse processo.

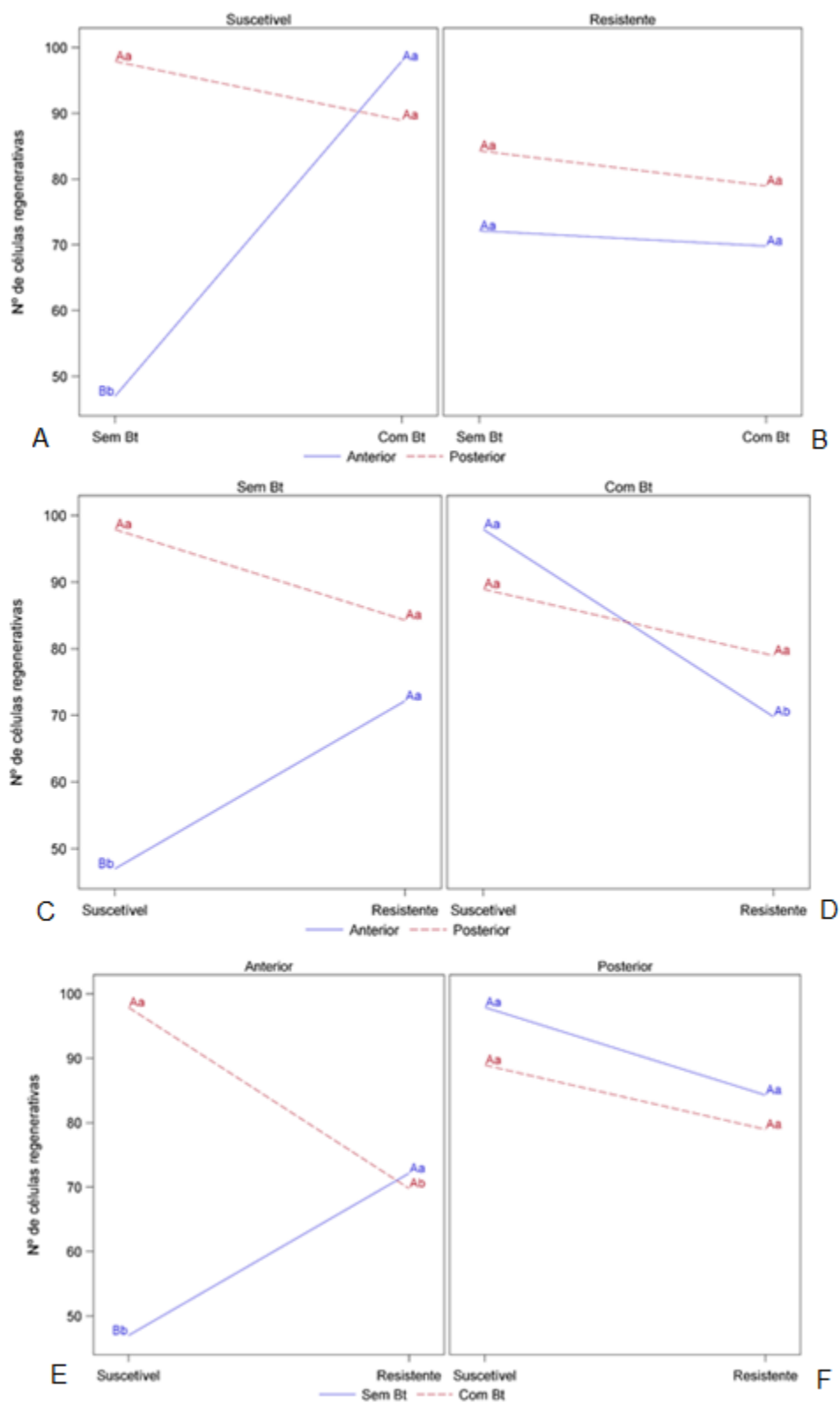


Figura 4. Número de células regenerativas em 1000µm de extensão nas linhagens suscetível e resistente tratada e não tratada com a cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis*. As letras maiúsculas comparam os tratamentos no alinhamento vertical e as letras minúsculas no alinhamento horizontal (Tukey a 5%).

Tabela 6. Comparação do número de células regenerativas entre lagartas de *A. gemmatalis* tratadas e não tratadas com a bactéria HD-73 (Bt).

			Nº de células regenerativas								
			Lagartas								
			1	2	3	4	5	6	Média	Erro Padrão	
Suscetível	Sem Bt	ANT	55.3	35.4	50.9	40.4	60.5	39.1	46.94	B	4.1
		POS	118.8	138.2	61.5	63.5	98.5	106.8	97.89	A	8.5
	Com Bt	ANT	118.8	138.2	61.5	63.5	98.5	106.8	97.89	A	8.5
		POS	88.6	127.3	68.4	78.5	88.1	82.8	88.92	A	7.7
Resistente	Sem Bt	ANT	74.3	43.0	72.3	73.4	66.1	103.7	72.11	A	6.2
		POS	102.5	78.2	86.2	88.1	75.8	74.9	84.28	A	7.3
	Com Bt	ANT	74.3	74.5	75.4	76.9	62.3	55.3	69.79	C	6.0
		POS	93.4	71.0	62.1	81.2	80.3	85.7	78.95	A	6.8

ANT= porção anterior do intestino médio;
 POS= porção posterior do intestino médio;
¹Tukey a 5% de probabilidade

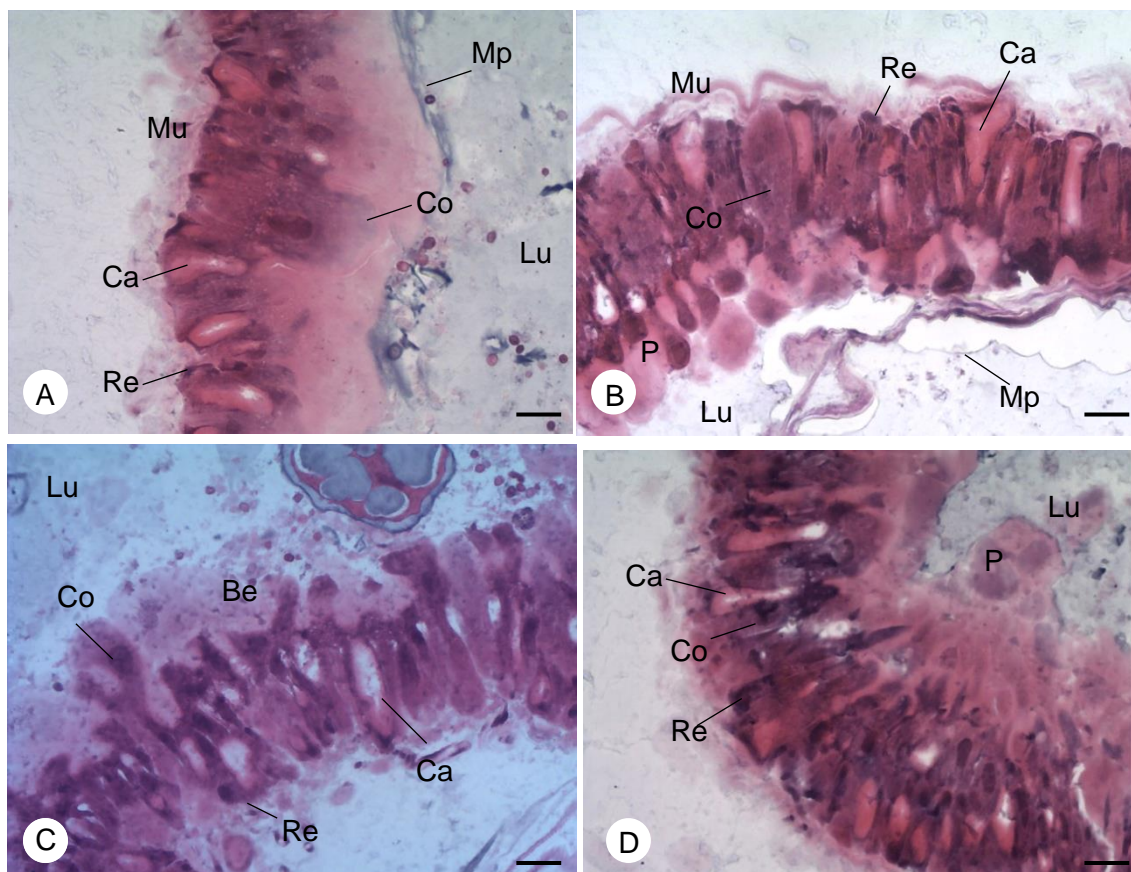


Figura 5. Fotomicrografias do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis*. A: linhagem suscetível controle. B: linhagem resistente controle. C: linhagem suscetível com Bt. D: linhagem resistente com Bt. Aspecto geral do intestino médio: Células colunares (Co) com bordadura estriada (Be) e protusões citoplasmáticas (P), Células calciformes (Ca), Células regenerativas (Re), membrana peritrófica (Mp), lúmen (lu), camada muscular (Mu). Barra = 10µm.

6 CONCLUSÕES

Os produtos biológicos produzidos à base de *B. thuringiensis* possuem diferentes toxinas Cry na sua composição e estas atuam em conjunto ou independentes, de forma diferente em cada espécie de Lepidoptera.

A população de *A. gemmatalis* resistente a Cry1Ac demonstra ter menor suscetibilidade aos produtos testados em comparação com a população suscetível a Cry1Ac.

As diferenças no número de células intestinais das duas linhagens de *A. gemmatalis* provam que o desenvolvimento da resistência à bactéria HD-73 provoca alterações celulares no intestino médio das lagartas.

Após a ingestão do liofilizado de HD-73, tanto as lagartas resistentes e quanto as suscetíveis a Cry1Ac experimentam alterações no número de células intestinais.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Ministério da Agricultura**. Acesso em maio de 2018, disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.
- AMEEN, A.; FUXA, J.; RICHTER, A. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, v.33, p.129-134, 1998.
- ANDERSON, E.; HARVEY, W. Active transport by cercopia midgut. **The journal of Cell Biology**, v.31, p.107-134, 1966.
- ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v.4, p.142-199, 2008.
- BERNARDI, O. A. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. p.179-204, 2011.
- BIANCO, R. **Pragas e seu Controle**. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná. Londrina: IAPAR. Circular, 29, 1991.
- BILLINGSLEY, P.; DOWNE, A. Non digestive cell types in the midgut epithelium of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). **Journal of Medical**, v.23, p.212-216, 1986.
- BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.41, n.7, p.423-431, 2011.
- BROOKS, M. E.; GORDON, K. H.; DORRIAN, S. J.; HINES, E. R.; HANZLIK, T. N. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera* stunt virus (Tetraviridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.80, p.97-111, 2002.
- BUENO, A.; CORRÊA-FERREIRA, B.; BUENO, R. Controle de pragas apenas com o MIP. **A Granja**, v.1, p.76-79, 2010.
- CAPRIO, M. A.; SUMMERFORD, D. V.; SIMS, S. R. Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. p.805-828, *In Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, L.A. Lacey and H. K. Kaya, eds., **Kluwer Academic Publishers**, Netherlands, 2000.
- CARVALHO, A. O. **Pragas e seu controle**. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná. Londrina: IAPAR. Circular, 68, 1982.
- CAVALCANTE, V.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**, v.24, p.19-40, 1999.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: Havard University Press, 1998.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acesso em 20 de novembro de 2017, Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/graos>>.

CRUZ, N. A. **Desenvolvimento biológico e Alterações morfofisiológicas no Intestino Médio da Lagarta da Soja *Anticarsia gemmatalis* Resistentes ao Baculovírus AgMNPV Alimentadas com Genótipos de Soja**. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, p.166, 2014.

DE PRIESTER, W. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Callifora erythrocephala*. **Journal of Ultrastructure Research**, v.36, p.783-805, 1971.

EISEMANN, C. H.; BINNINGTON, K. C. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. **International Journal for Parasitology**, v.24, n.1, p.15-26, 1994.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Acesso em maio de 2018. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884142/1/Arearefugio.pdf>>, 2011.

FARIAS, J.; ANDOW, D.; HORIKOSHI, R.; SORGATTO, R.; SANTOS, A.; OMOTO, C. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brasil. **Crop Protection**, v.64, n.1, p.150-158, 2014.

FAST, P. G.; MORRISON, I. K. The δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: IV. The effect of δ -endotoxin on ion regulation by midgut tissue of *Bombyx mori* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.20, p.208-211, 1972.

FERRAL PIÑA, J. **Herança da resistência à toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, p.123, 2016.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *B. thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v.47, p.501-533, 2002.

FIALHO, M. D. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (heteroptera: pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. **Annals of the Entomological Society of America**, v.102, p.119-127, 2009.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.; BATISTA, G.; BERTI FILHO, E.; OMOTO, C. **Pragas das hortícolas e ornamentais**. In: GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, p.714-769, 2002.

GARBUTT, J.; MICHAEL, B. B.; WRIGHT, D.; RAYMOND, B. Antagonistic competition moderates virulence in *Bacillus thuringiensis*. **Ecological Letters**, 2011.

GASSEN, D. **Pragas associadas a cultura do milho**. Passo Fundo, 1994.

GAZZONI, D. M. Effect of defoliation levels on recovery of leaf area, on yield and agronomic traits of soybeans. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.4, p.411-424, 1998.

GAZZONI, D.; OLIVEIRA, E.; CORSO, I.; FERREIRA, B.; VILLAS BOAS, G.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. (1998). **Manejo de pragas da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, p.44 (Embrapa-CNPSo. Circular Técnica, 5).

GEORGHIOU, G.; TAYLOR, C. Factors influencing the evolution of resistance. **National Academy Press**, v.1, n.1, p.157-169, 1986.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v.28, p.169-173, 2007.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.; BUMGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Helicoverpa virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.1545-1559, 1995.

GREENE, G. L. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, n.4, p.488-497, 1976.

GRINGORTEN, J. I. Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In Biochemical sites of insecticide action and resistance. Edited by Ishaaya, I. **Heidelberg**: Springer, p.167-207, 2001.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os Insetos: Um resumo de Entomologia**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007.

HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. A. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidopterous larvae. **Journal Insect Pathology**, v.1, p.152-170, 1959.

HOFFMANN-CAMPO, C. E. **Criação massal da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis***. Embrapa. Londrina: Embrapa CNPSo. Documento, 10, 1985.

HOFFMANN-CAMPO, C.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.; OLIVEIRA, L.; SOSA-GÓMEZ, D.; PANIZZI, A.; OLIVEIRA, E. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Embrapa-CNPSo. Londrina: Embrapa-CNPSo. Circular Técnica, 30, 2000.

HUKUHARA, T.; MIDORIKAWA, M.; IWAHANA, H. The effect of δ -endotoxin of Bt on the gut movements of the silk worm *Bombyx mori*. **Applied Entomology and Zoology**, v.19, n.2, p.270-272, 1984.

IBRAHIM J.M. Advances of transgenic Bt-crops in insect pest management: An overview. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.4(3), p.48-52, 2016.

IBRAHIM, J. M.; NAWAZ, M.; HUA, H. Advances of transgenic Bt-crops in insect pest management: An overview. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.4(3), p.48-52, 2016.

IBRAHIM, M.; GRIKO, N.; JUNKER, M.; BULLA, L. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, v.1, n.1, p.31-50, 2010.

KHETAN, S. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. **Microbial Pest Control**, v.14, 2001.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. A lagarta dos milharais. **O Biológico**, v.6, n.9, p.105-113, 1953.

LEPPLA, N. A. Laboratory life history of the velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, v.70, p.217-220, 1977.

LEVY, S. M. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, 2005.

LEVY, S. M., et al. The larval midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**, v.64, p.633-638, 2004.

LEVY, S., et al. A morphometric study of the midgut in resistant and non-resistant *Anticarsia gemmatilis*(Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.101, n.1, p.17-22, 2009.

LEVY, S., et al. Morfologia do intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*, susceptível e resistente ao vírus da poliedrose nuclear (AgMNPV), em larvas controle e infectadas pelo vírus. **Simpósio de Controle Biológico**, v.4, p.188, 2005.

LI, M. S.; JE, Y. H.; CHANG, J. H.; ROH, J.; KIM, H. S.; OH, H. W.; BOO, K. S. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new S-endotoxin gene. **Current Microbiology**, v.45, p.299-302, 2002.

LUCA, R.; ALBERTO, A.; IGNAZIO, F. Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after *Brevibacillus laterosporus* ingestion. **Journal Invertebrate Pathology**, v.111, n.3, p.211-216, 2012.

LUTTRELL, R.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins

and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.92, p.21-32, 1999.

MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A. G.; GAMUNDI, J. C.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v.98, n.1, p.577-587, 2005.

MARTOJA, R.; BALLAN-DUFRANÇAIS, C. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. **Insect ultrastructure**, v.2, p.119-261, 1984.

MATTEN, S. R.; HEAD, G.; QUEMADA, H. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs, in Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. **Springer**, p.27-39, 2008.

McGAUGHEY, W. H. Insect Resistance to the Biological Insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v.229, n.4709, p.193-195, 1985.

MOFETT, F.; KOCH, A. Electrophysiology of K⁺ transport by midgut epithelium of lepidopteran insect larvae. **The Journal of Experimental Biology**, v.198, n.10, p.2115-2125, 1995.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA, L. B.; SOARES, M. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **Plos One**, v.10, n.4, p.119-544, 2015.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. In: ALVES, S.B., Coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Editora Manole, p.188-202, 1986.

MOSCARDI, M. L. **Passagens sequenciais do múltiplo nucleopoliedrovírus de *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae): mortalidade e aspectos morfológicos do intestino médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, 2014.

NEGREIRO, M.; ANDRADE, F.; FALLEIROS, A. M. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina Ciências Agrárias**, v.25, n.4, p.293-308, 2004.

OKUDA, K.; DE ALMEIDA, F.; MONTARA, R. A. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v.53, p.1307-1315, 2007.

OMOTO, C.; BERNARDI, O. Estratégias de manejo podem prolongar vida útil das tecnologias de milho Bt. **Visão agrícola**, v.13, p.107-109, 2015.

PINHEIRO, D. O.G.; GREGÓRIO, E. A. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Neotropical Entomology**, v.37, p.413-419, 2008.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. *B. thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, v.7, p.1-10, 2003.

PRAÇA, L.; SILVA NETO, S.; MONNERAT, R. ***Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae): biologia, amostragem e métodos de controle.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 196, 2006.

RAHMAN, M. M. Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Electronic Biotechnology**, v.10, n.2, p.241-251, 2007.

RICHARDS, O.; DAVIES, R. **Imms' general textbook of entomology.** Londres: Chapman & Hall, v.1, 10ed. 1994.

RITZ, C.; EDWARDS, T. L.; DURAND, G.; PAYNE, A. J.; PEYAUD, V.; HINDMARSH, R. C. Potential sea-level rise from Antarctic ice-sheet instability constrained by observations. **Nature**, v.528, p.115-118, 2015.

RYERSE, J. S.; PURSELL, R. D.; SAMMON, P. B. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. **Cell and Tissue Research**, v.24, p.751-771, 1992.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v.9, n.1, p.283-300, 2011.

SANTOS, C. D.; TERRA, W. R. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. **Cell and Tissue Research**, v.237, p.565-574, 1984.

SHARABY, A.; EL-BENDARY, M. Assessment of mode of action and histopathological changes induced by *Bacillus thuringiensis* in various tissues and organs of *Spodoptera littoralis* larvae. **World Journal of Innovative Research**, v.3, p.01-06, 2017.

SINGH, G. J. P.; SCHOUEST, J. R.; GILL, S. S. The toxic action of Bt var. *israelensis* in *Aedes aegypti* in vivo. II. The relevance of skeletal muscle system lesion to its poisoning syndrome. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v.26, n.1, p.47-55, 1986.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.66, n.8, p.1337-1349, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MIRANDA, J. E. Custo adaptativo da resistência a *Bacillus thuringiensis* em lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.56, p.359-362, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D.; SILVA, J.; LOPES, I.; CORSO, I.; ALMEIDA, A.; MORAES, G.C.P.; BAUR, M.E. Susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae)

adults to insecticides used in Brazilian soybeans. **Journal Economic of Entomology**, v.102, p.1209-1216, 2009.

SOUSA, M. Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) midgut. **Micron**, v.40, p.743-749, 2009.

STONE, T.; SIM, S.; MARRONE, P. Selection of tobacco budworm to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p.228-234, 1989.

STORER, N. B. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v.103, p.1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.47-79, 1994.

TABASHNIK, B.; SISTERTON, M.; ELLSWORTH, P.; DENNEHY, T.; ANTILLA, L.; LIESNER, L.; CARRIÈRE, Y. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. **Nature Biotechnology**, v.28, n.12, p.1304-1307, 2010.

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

TAKELAR, N.; SHELTON, A. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, v.38, p.275-301, 1993.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.47, n.2, p.47-61, 2001

TUKEY, J. W. (1955). **Answer to Query 113**. *Biometrics*, v. 11, p. 111 – 113.

VALENT BIOSCIENCE CORPORATION. Simply the best-balanced attack against your lepidopteran pests. **Folder**, v.3, 2009.

VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. **Controle Biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus**. Embrapa. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 15, 1991.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. **Entomopathogenic bacteria**, p.371-381, 2000.

WEI, J.; GUO, Y.; LIANG, G.; WU, K.; ZGANG, J.; TABASHNIK, B.; LI, X. Cross resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. **Scientific Reports**, v.5, 2015.

WEIBULL, W. **A statistical distribution function of wide applicability**. *J. Appl. Mech. Trans.*, 18(3) (1951), 293-297.

WHITELEY, W. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v.40, p.549-576, 1986.

WOOD, A. R.; LEHANE., M. J. Relative contributions of apocrine and eccrine secretion to digestive enzyme release from midgut cells of *Stomoxys calcitrans* (Insecta: Diptera). **Journal of Insect Physiology**, v.37, p.161-166, 1991.

WU, K.; GUO, Y. Influences of *Bacillus thuringiensis* Berliner cotton planting on population dynamics of the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover, in Northern China. **Environmental Entomology**, v.32, n.2, p.312-318, 2003.

XUE, J.; CAI, Q.; ZHENG, D.; YUAN, Z. The synergistic activity between Cry1Aa e Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.460-465, 2005.