Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise de risco para a evolução da resistência de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa pelo evento de soja MON87701 × MON89788 no Brasil

Patrick Marques Dourado

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2016

Patrick Marques Dourado
Engenheiro Agrônomo

Análise de risco para a evolução da resistência de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa pelo evento de soja MON87701 × MON89788 no Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CELSO OMOTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Dourado, Patrick Marques
Análise de risco para a evolução da resistência de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa pelo evento de soja MON87701 × MON89788 no Brasil / Patrick Marques Dourado. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
93 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cry1Ac 2. Manejo da resistência de insetos 3. Soja Bt 4. *Helicoverpa* spp. 5. Paisagem agrícola I. Título

CDD 632.78
D739a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha maior incentivadora, minha esposa **Lívia**;*

*à maior alegria de nossas vidas, nossa filha **Isabel**;*

*ao meu melhor amigo e irmão confidente, **Diego**;*

e aos meus pais que nunca deixaram de acompanhar cada passo de minha vida,

***Silvone** e **Izonel**.*

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo que a vida me tem dado.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. **Celso Omoto**, orientador e exemplo de profissional que almejo ser, agradeço por essa oportunidade, e por todos os ensinamentos nestes doze anos.

Ao Prof. Dr. **Alberto Soares** Corrêa, pelo suporte e ensinamentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Artropódes a Táticas de Controle (ESALQ/USP) Douglas Amado, Rogério Machado Pereira e Mariana Regina Durigan, pelo trabalho em grupo e suporte na condução do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Artropódes a Táticas de Controle (ESALQ/USP): Anderson Bolzan, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Dayana Rosalina de Souza, Daniel Bernardi, Daniela Miyuki Okuma, Felipe Antônio Domingues, Natalia Alves Leite, Oderlei Bernardi, Osmar Arias e Renato Jun Horikoshi pelo convívio e ajuda na condução dos trabalhos.

Às funcionarias do Laboratório de Resistência de Artropódes a Táticas de Controle (ESALQ/USP), Eloisa Salmeron e Gislaine Aparecida Amâncio de Oliveira Campos, pelo suporte durante todo o projeto.

As bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly da Biblioteca Central (ESALQ/USP) pelo auxílio na formatação deste trabalho.

A Monsanto do Brasil pelo suporte no projeto, em especial ao colega e amigo Renato Carvalho.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
Referências 17
2 ALTA SUSCETIBILIDADE À PROTEÍNA CRY1AC ASSOCIADA À BAIXA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA REDUZ O RISCO DE EVOLUCÃO DA RESISTÊNCIA DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) À SOJA MON87701 × MON89788 NO BRASIL 21
Resumo 21
Abstract 22
2.1 Introdução 23
2.2 Material e Métodos 25
2.2.1 Coleta de populações no campo e criação em laboratório 25
2.2.2 Linha básica de suscetibilidade à proteína Cry1Ac 26
2.2.3 Bioensaios em laboratório com discos de folhas 29
2.2.4 Eficácia sob condições de alta infestação em casa de vegetação 29
2.2.5 Avaliação da adequação da soja MON87701 × MON89788 ao conceito de "alta dose" 30
2.2.6 Frequência de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788 em *H. armigera* 31
2.3 Resultados 32
2.3.1 Toxicidade da proteína Cry1Ac para *H. armigera* e *H. zea* 32
2.3.2 Linha básica de suscetibilidade à proteína Cry1Ac 33
2.3.3 Bioensaios em laboratório com discos de folhas 36
2.3.4 Eficácia sob condições de alta infestação em casa de vegetação 38
2.3.5 Avaliação da adequação da soja MON87701 × MON89788 ao conceito de "alta dose" 41
2.3.6 Frequência de alelos que conferem resistência a soja MON87701 × MON89788 em *H. armigera* 43
2.4 Discussão 44
2.5 Conclusões 49
Referências 50

3 PREFERÊNCIA HOSPEDEIRA DE *Helicoverpa armigera* E *Helicoverpa zea* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NA PAISAGEM AGRÍCOLA: IMPACTO PARA O MANEJO DA RESISTÊNCIA A SOJA MON87701 × MON89788..... 57
Resumo 57
Abstract..... 58
3.1 INTRODUÇÃO..... 58
3.2 Materiais e Métodos..... 61
3.2.1 Coleta de *Helicoverpa* spp. em diferentes culturas e regiões 61
3.2.2 Estabelecimento e criação de *H. armigera* e *H. zea* em laboratório 64
3.2.3 Biologia de *Helicoverpa* spp. em diferentes hospedeiros 64
3.2.3.1 Produção de estruturas vegetativas e reprodutivas 64
3.2.3.2 Desenvolvimento e sobrevivência de *Helicoverpa* spp. 65
3.2.4 Identificações de *Helicoverpa* spp. coletadas em diferentes hospedeiros no campo 66
3.3 Resultados..... 67
3.3.1 Efeito do hospedeiro no desenvolvimento, reprodução e parâmetros demográficos de *H. armigera* e *H. zea* 67
3.3.1.1 Desenvolvimento de estágios imaturos 67
3.3.1.2 Parâmetros da fase adulta 71
3.3.1.3 Tabela de vida de *H. armigera* em diferentes hospedeiros 73
3.3.1.4 Ocorrência de *Helicoverpa* spp. em diferentes plantas hospedeiras no campo 75
3.4 Discussão 79
3.5 Conclusões 83
Referências 83
4 DISCUSSÃO GERAL 89
Referências 92

RESUMO

Análise de risco para a evolução da resistência de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1ac expressa pelo evento de soja MON87701 × MON89788 no Brasil

A evolução da resistência de insetos a culturas que expressam proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o maior desafio para a manutenção dessa biotecnologia em programas de manejo integrado de pragas. Diante do risco de evolução de resistência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) à soja MON87701 × MON89788 foi realizada uma análise de risco levando em consideração o conjunto de fatores que influenciam no processo de seleção. Portanto, os objetivos do presente estudo foram a de caracterizar a suscetibidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. armigera* e *H. zea*, caracterizar a eficácia da soja MON87701 × MON89788, bem como a adequação do produto ao conceito de alta dose para *H. armigera* e *H. zea*, avaliar a frequência dos alelos que conferem resistência à proteína Cry1Ac em populações de *H. armigera*, identificar a preferência hospedeira de *H. armigera* e *H. zea* em diferentes culturas e paisagens agrícolas e avaliar os parâmetros biológicos e demográficos de *H. armigera* e *H. zea* em diferentes hospedeiros. A espécie *H. zea* foi aproximadamente 60 vezes mais tolerante à proteína Cry1Ac que *H. armigera*. Além disso, baixa variabilidade na suscetibilidade à Cry1Ac foi verificada em populações de *H. armigera* coletadas em diferentes regiões do Brasil, o que pode ser explicada pela recente introdução dessa espécie no continente americano. A soja MON87701 × MON89788 resultou em mortalidade completa de *H. armigera* durante todo o ciclo da cultura, enquanto que para *H. zea* não foi verificado 100% de mortalidade sob condições de laboratório em bioensaios de cinco dias de duração, apesar dos altos níveis de mortalidade encontrados. Uma baixa frequência (frequência estimada = 0,0011) de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788 em populações de campo de *H. armigera* foi estimada pelo método de F_2 screen. A avaliação da tabela de vida em laboratório demonstrou que *H. armigera* tem altos níveis de desenvolvimento e a reprodução nas principais culturas das regiões dos Cerrados, sendo a cultura do algodão a que resulta nos maiores valores de crescimento populacional e menor tempo entre gerações. Por outro lado, *H. zea* se mostrou menos polífaga, se estabelecendo até a fase adulta e gerando descendentes apenas em milho e milheto. A ocorrência das duas espécies no campo corrobora com as informações encontradas na tabela de vida, na qual *H. amigera* foi encontrada em grande parte as culturas da soja e algodão, e em menor frequência à cultura do milho, enquanto que *H. zea* apresentou comportamento funcionalmente monófago no campo, associada apenas à cultura do milho. Os parâmetros toxicológicos da soja MON87701 × MON89788 associada à alta suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac e à baixa frequência inicial de alelos que conferem resistência se adéquam aos preceitos da estratégia de alta dose/refúgio. A manutenção das áreas de refúgio com plantas não-Bt, de acordo com as recomendações, é essencial para retardar o processo de seleção de resistência de populações de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 no Brasil.

Palavras-chave: Cry1Ac; Manejo da resistência de insetos; Soja Bt; *Helicoverpa* spp.; Paisagem agrícola

ABSTRACT

Resistance risk assessment of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1ac protein expressed on MON87701 × MON89788 soybean in Brazil

Insect resistance to crops expressing proteins derived from *Bacillus thuringiensis* proteins (Bt) impose the biggest challenge to maintaining the value of this biotechnology in integrated pest management programs. To support a resistance to *Helicoverpa armigera* (Hübner) to soybean MON87701 × MON89788 was carried out a risk analysis taking into account all factors that influence the selection process. Therefore, the objectives of this study were to characterize the suscetibidade the Cry1Ac protein in *H. armigera* populations and *H. zea*, characterize the effectiveness of soybean MON 87701 × MON 89788, as well as the suitability of the product to the concept of high dose *H. armigera* and *H. zea*, evaluate the frequency of alleles that confer resistance to Cry1Ac protein in *H. armigera* populations from different regions of agricultural production, understand the host preference of *H. armigera* and *H. zea* in different crops in and agricultural landscapes and evaluate the biological and demographic parameters of *H. armigera* and *H. zea* on different hosts. The species *H. zea* was approximately 60 times more tolerant to Cry1Ac protein than *H. armigera*.Low variability on susceptibility to Cry1Ac was found among field *H. armigera* populations, what can be explained by the recent introduction of this species into America. MON 87701 × MON 89788 soybean resulted in complete mortality of *H. armigera* throughout the crop cycle, while incomplete mortality was found for *H. zea* using leaf disc bioassays, although high levels of mortality were found. A low resistance allele frequency (estimated frequency = 0.0011) to MON 87701 × MON 89788 soybean was estimated by using the F_2 screen methodology. The assessment of the Life Table parameters in laboratory demonstrated the main row crops such as cotton, soybean and maize are suitable for the development and reproduction of *H. armigera*, wherein cotton resulted in higher values of population growth parameter and shorter times between generations. Conversely, *H. zea* was less polyphagous in which only corn and millet were suitable hosts. Field occurrence of both species was consistent with laboratory studies. *H. amigera* was mostly found in soybean and cotton, and rarely on corn, while *H. zea* was found mainly on maize. Overall, toxicological aspects of MON87701 × MON89788 soybean associated with high susceptibility of *H. armigera* to Cry1Ac protein and low initial resistance allele frequency fit properly to the high-dose/refuge strategy to delay resistance evolution. Therefore, maintenance of compliance with the refuge recommendation is essential to delay the evolution of resistance in *H. armigera* to MON87701 × MON89788 soybean in Brazil.

Keywords: Cry1Ac; Insect resistance management; Bt soybean; *Helicoverpa* spp.; Agricultural landscape

1 INTRODUÇÃO

A presença de *Helicoverpa armigera* (Hübner) no Brasil foi documentada oficialmente em 2013 e esta praga tem se estabelecido em praticamente todas as regiões do Brasil e de outros países do continente americano (CZEPAK et al., 2013; SPECH et al., 2013; TAY et al., 2013; LEITE et al., 2014; MASTRANGELO et al., 2014; MURÚA et al., 2014; SENAVE, 2014; SOSA-GÓMEZ et al., 2016). Apesar do recente registro desta praga no Brasil, há indícios de que houve múltiplas introduções anteriores a 2013, evidenciado pela alta diversidade genética em populações de *H. armigera* de diferentes regiões do Brasil (LEITE et al., 2014; SOSA-GÓMEZ et al., 2016). Estes relatos coincidem com surtos populacionais de Heliothinae, inicialmente identificados como *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Chloridea virescens* (Fabricius), em diversas regiões do Brasil nas safras de 2011/12 e 2012/13 (DEGRANDE; OMOTO, 2013). Adicionalmente, surtos populacionais de *H. armigera* na região Centro-Oeste do Brasil durante a safra de 2012/13 sugerem que a espécie pode estar presente no país há muito tempo, suficiente para se estabelecer em altas densidades populacionais para ocasionar sérios prejuízos econômicos em diferentes cultivos no Brasil (DEGRANDE; OMOTO, 2013; TAY et al., 2015).

Alguns aspectos podem ser apontados para o sucesso desta espécie em colonizar estas novas paisagens no Brasil. As condições encontradas por *H. armigera* em alguns destes novos ambientes potencializam as principais características que contribuem para que esta praga atinja o estado de importância que tem como praga em diferentes partes do mundo: alto grau de polífagia, mobilidade e fertilidade (FITT, 1989). No Brasil, altas densidades populacionais de *H. armigera* têm sido reportadas principalmente nas regiões do Cerrado, caracterizada por um complexo sistema de cultivo (LEITE et al., 2014). Apesar do alto grau de polifagia, a densidade populacional de *H. armigera* em sistemas agrícolas está intimamente associada às condições climáticas e à disponibilidade das principais culturas durante a safra (FITT, 1989, MAELZER; ZALUCKI 1999). Como esperado de uma espécie polífaga, *H. armigera* tem se estabelecido em uma diversidade de hospedeiros, nas quais espécies dicotiledôneas, principalmente soja e algodão, têm se mostrado preferenciais na maioria das regiões em relação a gramíneas como milho, sorgo e milheto (LEITE et al., 2014). Outra espécie polífaga conhecida por causar danos em diversas culturas, *H. zea* é uma espécie nativa das Américas (BERGVINSON 2005). A espécie tem

grande importância econômica, principalmente por causar danos em plantas da família Poaceae (Gramineae), sendo também encontrada em diversas plantas de outras famílias (BLANCO et al., 2007). No Brasil *H. zea* é encontrada quase que exclusivamente na cultura do milho (LEITE et al., 2015). No entanto, nos Estados Unidos a espécie é uma praga importante para as culturas da soja e do algodão (GORE et al., 2000). A ocupação do mesmo ambiente por espécies com grande similaridade genética traz implicações para o manejo, já que *H. armigera* e *H. zea* apresentam compatibilidade reprodutiva e capazes de gerar descendentes férteis (LASTER; HARDEE, 1995; LASTER; SHENG, 1995; LEITE et al., 2014).

As condições climáticas no Brasil permitem o cultivo de duas ou mais culturas durante o ano, sendo a soja o cultivo mais viável na maioria das regiões, plantadas no início da safra e sucedidas por uma cultura na segunda safra (safrinha), como trigo, milho, culturas forrageiras, além da sucessão altamente rentável com algodão na região dos Cerrados (MARTINELLI; OMOTO, 2005). Apesar de altamente rentáveis, sistemas intensivos de produção têm enfrentado desafios no manejo de pragas, de forma que espécies polífagas, como *Spodoptera* spp., *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e outros Heliothinae, têm se estabelecido em grandes populações e acarretado em prejuízos econômicos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Culturas geneticamente modificadas de milho, soja e algodão foram semeadas em mais de noventa porcento das áreas na safra de 2015/16 no Brasil, tendo destaque para o crescimento de eventos que expressem proteínas de *Baccillus thuringiensis* (Bt) (CELERES, 2016). Fatores como resistência de pragas a inseticidas, baixa disponibilidade de novas moléculas e riscos de intoxicação ambiental e humana são contrastados com a alta eficácia e a facilidade associada ao uso de culturas transgênicas expressando proteínas Bt (TABASHINIK et al., 2010). Entretanto, o uso intensivo destas tecnologias traz consigo os riscos de evolução da resistência e perda parcial ou total dos benefícios em médio prazo (JIN et al., 2015). No Brasil, programas de manejo de pragas, baseados quase que exclusivamente no uso de tecnologias Bt, com manejo inadequado, têm se mostrado insustentáveis, sendo que as condições mencionadas acima, associadas com os baixos índices de plantio de refúgio levaram à seleção de resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) ao milho TC1507 (expressando a proteína Cry1F) três anos após início da

comercialização (FARIAS et al., 2014), bem como para o milho MON 810 (expressando a proteína Cry1Ab) (OMOTO et al., 2015).

Sendo a cultura mais plantada no país, a soja foi cultivada em 31,4 milhões de hectares durante a safra de 2014/15 e tem potencial de influenciar a densidade de *H. armigera* na maioria das regiões (CÉLERES, 2015). A soja MON87701 × MON89788 geneticamente modificada resistente a insetos e tolerante ao herbicida glifosato (denomindada INTACTA RR2 PRO) foi aprovada para cultivo no Brasil em 2010 e comercializada a partir da safra 2013/14 (CTNBio, 2010). A soja MON 87701 × MON 89788 expressa a proteína inseticida Cry1Ac derivado de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) e a proteína 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) de *Agrobacterium* sp., que confere tolerância ao herbicida glifosato, tendo como alvos *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), *C. includens, C. virescens*, *Crocidosema aporema* (Walsingham, 1914), *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) e espécies do gênero Helicoverpa. Avaliações de risco de evolução da resistência de pragas foram conduzidas para as principais espécies-alvo, para subsidiar programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI), nas quais tendo a soja MON87701 × MON89788 resultando em mortalidade completa para as principais pragas e indicativos de adequação ao conceito de alta dose (BERNARDI et al., 2012, 2013). A alta eficácia dessa tecnologia é resultado da alta expressão da proteína Cry1Ac, variando de ~50µg/g nos primeiros estágios vegetativos e até mais de 200 µg de proteína por grama de tecido fresco durante o desenvolvimento da cultura (MACRAE et al., 2005).

Culturas geneticamente modificadas expressando a proteína Cry1Ac tem sido utilizadas com sucesso na Austrália, desde 1996, quando foi introduzido o algodão geneticamente modificado Ingard® (denominado posteriomente de Bollgard® no Brasil) para o manejo de *Helicoverpa* spp. (BENEDICT; RING, 2004; FITT, 2000). Apesar de expressar a mesma proteína presente na soja MON 87701 × MON 89788, o algodão Ingard® expressa Cry1Ac em níveis inferiores (~8,6 µg de proteína por grama de tecido fresco) durante os primeiros estágios, decrescendo mais de 10 vezes durante o desenvolvimento da cultura (GREENPLATE et al., 1999). Apesar da menor expressão da proteína, os requerimentos sobre o plantio adequado das áreas de refúgio e a substituição do Ingard® pela tecnologia com eventos piramidados (Bollgard II®) têm garantido a manutenção da suscetibilidade de Cry1Ac desde 1996 (DOWNES; MAHON, 2012a, 2012b).

Neste contexto, ao longo desse trabalho foram geradas informações para subsidiar uma análise de risco de evolução da resistência de *H. armigera* à soja MON 87701 × MON 89788 no Brasil. Devido a inportancia de *H. zea* como praga para a cultura da soja nos Estados Unidos, bem como a compatibilidade reprodutiva de *H. armigera* e *H. zea* e o desconhecimento de efetiva presença de híbridos no ambiente, foram levados também em consideração nesta analise de risco aspectos relacionados a *H. zea*. Visando avaliar a dinâmica populacional de *H. armigera* na paisagem agrícola e traçar estratégias mais efetivas para retardar a evolução da resistência, foram identificados o uso de diferentes hospedeiros por ambas as espécies e a ocorrência em diferentes regiões agrícolas. Adicionalmente, cenários de alta adoção de culturas Bt e baixa diversidade de proteínas Bt podem elevar o risco de resistência de algumas pragas polífagas que têm os grandes cultivos como hospedeiros preferenciais. Portanto, entender a contribuição de cada hospedeiro para a formação da população, bem como aspectos de preferência por determinada cultura, permite a estruturação de um plano de manejo da resistência em nível de paisagem, levando em consideração o ambiente e não apenas uma determinada cultura. Os parâmetros toxicológicos da proteína Cry1Ac e da soja MON87701 × MON89788 para *H. armigera*, bem como a estimativa da frequência inicial de alelos que conferem resistência ao evento estabelecem uma sólida base para a construção de estratégias de MRI. Diante deste cenário, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a atividade biológica da proteína Cry1Ac para *H. armigera* e *H. zea* por meio de bioensaios com dieta artificial.

- Avaliar a variabilidade geográfica da suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac.

- Caracterizar a eficácia da soja MON87701 × MON89788, bem como a adequação do produto ao conceito de alta dose para *H. armigera* e *H. zea*.

- Avaliar a frequência dos alelos que conferem resistência à proteína Cry1Ac em populações de *H. armigera* oriundas de diferentes regiões de produção agrícola.

- Avaliar os parâmetros biológicos e demográficos de *H. armigera* e *H. zea* em diferentes hospedeiros.

- Avaliar a preferência hospedeira de *H. armigera* e *H. zea* em diferentes culturas e regiões agrícolas.

Referências

BENEDICT, J.H.; RING, D.R. Transgenic crops expressing Bt proteins: current status, challenges and outlook. In: KABUL, O.; DAHLIA, G.S. (Ed.). **Transgenic crop protection:** concepts and strategies. Enfield: Science Publ., 2004. p. 15–84.

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,** Susex, v.??, n. ???, p. 588-594, Apr. 2014. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000332393300010>. Acesso em: 22 abr; 2014.

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 gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, Susex, v. 68 n.7, p.1083-91, 2012.

CÉLERES. **Informativo Biotecnologia**: 2º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2015/16. 2016. Disponível em: <http://www.celeres.com.br/2o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201516/>. Acesso em: 21 ago. 2016.

CTNBio. **Commercial approvals**: commercial release of genetically modified insect-resistant and herbicide-tolerant soy containing genetically modified events MON 87701 and MON 89788. (Technical Opinion, 2542/2010). Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15558.html>. Acesso em: 20 ago. 2016.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera:

Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v.43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DEGRANDE P.; OMOTO C.. Estancar prejuízos. **Cultivar Grandes Culturas**, Araxá Abril, p. 32–35, 2013.

DOWNES, S.; MAHON, R. Evolution, ecology and management of resistance in *Helicoverpa* spp. to Bt cotton in Australia. **Journal Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, p. 281–286, 2012.

DOWNES, S.; MAHON, R. Successes and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia. **GM Crops Food**, Austin, v. 3, p. 228–234, 2012.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C. dos, OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, p.150-168, 2014.

FITT, G. P. The ecology of Heliothis species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 17-52, 1989.

FITT, G.P.; WILSON, L.J. Genetic engineering in IPM: Bt cotton. In: KENNEDY, G.G.; SUTTON, T.B. (Ed.). **Emerging technologies in integrated pest management:** concepts, research and implementation. St. Paul: APS Press, 2000. p. 108-125.

GREENPLATE, J.T.; MULLINS, J.W.; PENN, S.R.; DAHM, A.; REICH, B.J.; OSBORN, J.A.; RAHN, P.R.; RUSCHKE, L.; SHAPPLEY, Z.W. Partial Characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.127, p. 340-347, 2003.

HOFFMANN-CAMPO;, B.S.; MOSCARDI, C.B., CORREA-FERREIRA, B.Ç OLIVEIRA, L.J.Ç SOSA-GÓMEZ, D.; PANIZZI, A.R.; COSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de soja, 2000. 70 p. (Embrapa CNPSo, Circular Técnica, 30).

JIN L, ZHANG H, LU Y, YANG Y, WU K, TABASHNIK, B.; WU, Y. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, p. 169-174, 2015.

LASTER, M.L.; HARDEE, D.D. Intermating compatibility between nort america *Helicoverpa zea* and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Russia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, n. 1, p. 77-80, 1995.

LASTER, M.L.; SHENG, C.F. Search for hybrid sterility for *Helicoverpa zea* in crosses between the north American *H. zea* and *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidade) from China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, n. 5, p. 1288-1291, 1995.

LEITE, N.A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I.; OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS One**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e113286, 2014.

MAELZER D.A., ZALUCKI M.P. Analysis and interpretation of long-term light-trap data for *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: the effect of climate and crop host plants. **Bulletin Entomology**, New Delhi, v. 89 p. 455–464, 1999.

MACRAE, T.C.; BAUR, M.E.; BOETHEL, D.J.; FITZPATRICK, B.J.; GAO, A.G.; 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 a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 2, p. 577-587, 2005

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 34, p. 67-77, 2005.

MASTRANGELO, T.; PAULO, D.F.; BERGAMO, L.W.; MORAIS, E.G.F.; SILVA, M.; BEZERRA-SILVA, G.; AZEREDO-ESPIN, A. Detection and genetic diversity of a *Heliothine invader* (Lepidoptera: Noctuidae) from North and Northeast of Brazil. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v.107, n. 3, p. 970-80, 2014.

MURÚA, M.G.; SCALORA, F.S.; NAVARRO, F.R.; CAZADO, L.E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M.E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 97, p. 854–856, 2014.

OMOTO, C.; BERNARDI O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI S.; HEAD, G.P.Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Susex, v. 72, n. 9, p. 1727-17p. 1727-1736, 2016.

SENAVE. Alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola. **ABC Color**, Oct. 2013. Disponível em: <http://www.abc.com.py/edicion-impresa/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html>. Acesso em: 16 set. 2016

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S.V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, A.C.; MICHELI, A.; MORAIS, G.F.; GALLO, P.; PEREIRA, V.S.; SALVADORI, J.R.; BOTTON, M.; ZENKER, M.; AZEVEDO-FILHO, W.S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 101-104, 2015.

SPECHT, A.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PAULA-MORAES, S.V.; YANO, S.A. Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Sete Lagoas, v. 48, p. 689–692, 2013.

TABASHNIK, B.E. Communal benefits of transgenic corn. **Science,** Susex, v. 330, p. 189–190, 2010.

TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T., THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, Berkeley, v. 8, n. 11, p. 80134, 2013.

2 ALTA SUSCETIBILIDADE À PROTEÍNA CRY1AC ASSOCIADA À BAIXA FREQUÊNCIA ALÉLICA DE RESISTÊNCIA REDUZ O RISCO DE EVOLUCÃO DA RESISTÊNCIA DE *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) À SOJA MON87701 × MON89788 NO BRASIL

Resumo

A presença de *Helicoverpa armigera* (Hübner) foi recentemente documentada no Brasil e tem causado danos significativos em diversas culturas, principalmente em soja e algodão. A soja MON87701 × MON89788, resistente a insetos pela expressão da proteína Cry1Ac, resulta em altos níveis de controle para *H. armigera*. Para avaliar o risco de evolução da resistência aos níveis de proteína Cry1Ac expressos pelo evento de soja MON 87701 × MON 89788 no Brasil, foram conduzidos estudos para: estabelecimento de linhas básicas de suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac; avaliação de parâmetros toxicológicos em planta, incluindo a adequação do evento ao conceito de alta dose; e estimativa dafrequência inicial de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788, por meio de F_2 screen. A concentração letal (CL_{50}), para *H. armigera* foi de 1,22 µg de Cry1Ac por mL de dieta e, para *H. zea* de 16,76 µg de Cry1Ac por mL de dieta. Foi observada uma variação na suscetibilidade a Cry1Ac de 16,5 vezes entre as populações de *H. armigera* coletadas em diferentes regiões do Brasil, com CL_{50} variando entre 0,11 e 1,82 µg mL^{-1} de dieta nas safras 2013/14 e 2014/15. A soja MON87701 × MON89788 apresentou altos níveis de eficácia em laboratório e casa de vegetação contra *H. armigera*, indicando se adequar ao conceito de alta dose para *H. armigera*, com altos níveis de mortalidade em diluições de até 50 vezes. Um total de 212 isofamílias foram estabelecidas com sucesso a partir de indivíduos coletados em sete regiões do país e avaliadas para, quanto à presença de alelos que conferem resistência, por meio de F_2 screen. Nenhuma da isofamílias avaliadas apresentou indivíduos sobreviventes em folhas de soja MON87701 × MON89788, tendo uma frequência inicial estimada em 0,0011. A baixa variabilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac, a alta suscetibilidade da espécie à Cry1Ac e à soja MON87701 × MON89788 e a baixa frequência inicial de alelos que conferem resistência se adequam aos preceitos da estratégia de alta dose/refúgio. Portanto, a manutenção das áreas de refúgio, de acordo com as recomendações é essencial para retardar o processo de seleção de resistência de populações de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 no Brasil.

Palavras-chave: *Helicoverpa armigera*; Cry1Ac; Manejo da resistência de insetos; Soja Bt

Abstract

The Old World bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), was recently documented in Brazil, causing extensive damage to different crops, mainly cotton and soybean. MON 87701 × MON 89788 soybean, which expresses the Bt protein Cry1Ac, was recently deployed in Brazil, providing high levels of control against *H. armigera*. To assess the risk of resistance to the Cry1Ac protein expressed by MON87701 × MON89788 soybean in Brazil, we conducted studies to evaluate the baseline susceptibility of *H. armigera* to Cry1Ac, in planta efficacy including the assessment of the high-dose criterion, and the initial resistance allele frequency based on an F2 screen. The mean Cry1Ac lethal concentration (LC50) ranged from 0,11 to 1.82 µg mL^{-1} of diet among all *H. armigera* field populations collected from crop seasons 2013/14 to 2014/15, which indicated about 16.5-fold variation. MON87701 × MON89788 soybean exhibited a high level of efficacy against *H. armigera* and most likely met the high dose criterion against this target species in leaf tissue dilution bioassays up to 50 times. A total of 212 F2 family lines of *H. armigera* were established from field collections sampled from seven locations across Brazil and were screened for the presence of MON87701 × MON89788 soybean resistance alleles. None of the 212 families survived on MON87701 × MON89788 soybean leaf tissue (estimated allele frequency = 0,0011). The responses of *H. armigera* to Cry1Ac protein, high susceptibility to MON87701 × MON89788 soybean, and low frequency of resistance alleles across the main soybean-producing regions support the assumptions of a high-dose/refuge strategy. However, maintenance of reasonable compliance with the refuge recommendation will be essential to delay the evolution of resistance in *H. armigera* to MON87701 × MON89788 soybean in Brazil.

Keywords: *Helicoverpa armigera;* Cry1Ac; Insect resistance management; MON87701 × MON89788 soybean

2.1 Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner) é considerada uma das mais importantes espécies de praga da agricultura no mundo (FTT, 1989). Esta espécie polífaga é amplamente disseminada na Europa, na África, na Ásia e na Austrália, onde tem causado danos extensivos em uma variedade de culturas (PONGUE, 2004; ZALUCKI; DAGLISH; FIREMPONG; TWINE, 1986; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014). As características de *H. armigera* que permitem que a espécie persista em ambientes agrícolas e se adapte às diferentes práticas agrícolas são os principais fatores que contribuem para que esta espécie atinja sua importância como praga (FTT, 1989).

No Velho Mundo e na Austrália, onde *H. armigera* é a principal praga da cultura do algodão, esta espécie tem sido o principal alvo de variedades de algodão geneticamente modificados, que expressem uma ou mais proteínas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), e tem sido amplamente adotado por produtores devido a problemas de resistência da espécie a inseticidas (DOWNES; MAHON, 2012; KRANTI et al., 2002; WU; GUO, 2005). Recentemente, esta espécie foi identificada na América do Sul, especialmente no Brasil (CZEPAK et al., 2013; SOSA-GOMEZ et al., 2010). Diversos estudos também indicam o potencial risco de sucesso de invasão de *H. armigera* em países da América do Norte (ZALUCKI et al., 2005; KRITICOS, 2015), já havendo relato de interceptação da espécie em Porto Rico em 2014 (Animal and Plant Health Inspection Service of the United States Department of Agriculture (USDA-APHIS)) (NAPPO, 2014) e também na parte continental dos Estados Unidos da América em 2015.

No Brasil, *H. armigera* tem sido identificada em grande variedade de hospedeiros, particularmente dicotiledôneas e, em menor intensidade, monocotiledôneas (MASTRANGELO et al., 2014; LEITE et al., 2014). Dentre todos os hospedeiros cultivados, a cultura da soja se destaca como principal cultura pela extenxão da área, totalizando mais de 30 milhões de hectares, seguida pelo algodão com aproximadamente 1 milhão de hectares. Em diferentes partes do mundo, produtores têm enfrentado desafios com manejo de *H. armigera* nas culturas de soja e algodão (DOWNES et al., 2012a, 2012b; FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013; YANG; LI; WU, 2013). Da mesma forma, a distribuição generalizada de *H. armigera* no Brasil tem sido identificada como um risco para a utilização eficaz e sustentável de culturas Bt. O algodão Bt tem sido amplamente utilizado com sucesso em muitos países,

incluindo o Brasil (JIN; ZHANG; LU; YANG; WU, 2015; BARROS; DEGRANDE, 2012). Recentemente, o evento de soja transgênica MON 87701 × MON 89788 que expressa a proteína Cry1Ac (INTACTA RR2 PRO) foi aprovado para o plantio no Brasil (CTNBIO, 2010), sendo lançado comercialmente na safra 2013/14. Devido a sua alta eficácia no controle dos principais lepidópteros de praga da cultura, a soja MON 87701 × MON 89788 tem se mostrado como importante ferramenta para programas de Manejo Integrados de Pragas (MIP), reduzindo a dependência do manejo baseado no uso de inseticidas (BERNARDI et al., 2012, 2014; ABERNAZ et al., 2012). Apesar da lagarta falsa medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker), continuar sendo a espécie de praga prevalente na cultura da soja em todo o Brasil, *H. armigera* tem se estabelecido em áreas brasileiras de cultivo de soja (SPECHT et al., 2013) e o risco de evolução da resistência desta espécie à soja Bt deve ser considerado em um programa de Manejo da Resistência de Insetos (MRI).

Como mencionado, a soja MON87701 × MON89788 tem sido rapidamente adotada pelos agricultores em todo o Brasil, sendo que a principal característica, que a torna atrativa aos agricultores, é alto nível de controle contra as principais pragas de lepidópteros, especialmente *C. includens*, *A. gemmatalis*, *C. virescens* e *H. armigera* (BERNARDI et al., 2012, 2014; MACRAE et al., 2005; YU et al., 2013; AZAMBUJA et al., 2015).

Tal como acontece com outras culturas Bt, a principal ameaça para o uso sustentável da soja MON87701 × MON89788 é a evolução da resistência de pragas-alvo (GOULD, 1998). A estratégia que tem se mostrado mais eficaz para o manejo da resistência de insetos para as culturas Bt é conhecida como "alta dose / refúgio" e se baseia nas premissas que os alelos de resistência a uma proteína Bt são raros; que uma proteína Bt é consistentemente produzida por uma planta em uma concentração altamente tóxica para os insetos homozigotos suscetíveis, que reduza a diferença entre o homozigoto suscetível (SS) e heterozigotos (RS) para o gene da resistência, e por consequência, faça com que os alelos de resistência sejam "funcionalmente recessivos"; e que as áreas de refúgio com plantas não Bt sejam cultivadas para permitir o desenvolvimento de insetos suscetíveis, isto é, não selecionados (GOULD, 1998; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011).

Três fatores-chave são consistentemente associados aos casos de resistência desenvolvida em campo relatados até o momento (DHURUA; GUJAR, 2011; FARIAS et al., 2014; GASSMANN et al., 2011; STORER et al., 2010;

VANRENSBURG et al., 2007; OMOTO et al., 2016): uso de produtos com um modo de ação, uso de produtos que não se adequam ao conceito de alta dose e a baixa adoção de áreas de refúgio (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011; TABASHNIK; BREVAULT; CARRIERE, 2013).

Trabalhos anteriores já haviam relatado elevada toxicidade da soja MON87701 × MON89788 para *H. armigera* (YU et al., 2013; AZAMBUJA et al., 2015). Neste trabalho, foi re alizada a caracterização da suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac, por meio da obtenção de linhas básicas de suscetibilidade com populações coletadas em campos de soja e de algodão. Para a caracterização dos atributos toxicológicos da soja MON87701 × MON89788 contra *H. armigera*, foram gerados dados em laboratório e casa de vegetação, incluindo avaliação de alta dose. Além disso, são apresentados resultados de F_2 screen (ANDOW; ALSTAD, 1998) que visaram estimar), com a frequência de alelos raros de resistência à proteína Cry1Ac, utilizando tecido foliar da soja Bt. Finalmente, são discutidas as implicações do ponto de vista de MRI dos cultivos de soja e algodão Bt em grandes áreas no Brasil.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta de populações no campo e criação em laboratório

As populações utilizadas neste estudo foram estabelecidas em laboratório a partir de coletas de indivíduos selvagens em campos comerciais, de acordo com autorização concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio) do Ministério do Meio Ambiente, para as empresas contratadas SGS Gravena (Sisbio licença # 10018-1) e PROMIP (Sisbio licença # 40380-2).

Para a formação das colônias de *H. armigera*, cerca de 800 a 1.200 lagartas foram coletadas em áreas comerciais de soja e algodão não Bt nas safras de 2013/14 e 2014/15. Os indivíduos foram mantidos em dieta artificial, em condições de laboratório, até a fase de pupa (KASTEN et al., 1978). Informações sobre as coletas estão listadas na Tabela 2.1.

Uma população de *H. armigera* e uma de *H. zea* foram utilizadas como referência suscetível (LAB) nos bioensaios de comparação da toxicidade da proteína Cry1Ac entre espécies e de caracterização dos atributos toxicológicos da soja MON

87701 × MON 89788 (bioensaios de disco de folha, diluição de tecido foliar e infestações em casa de vegetação). A população de *H. armigera* LAB foi coletada na cultura da soja no município de Montividiu (Goiás), durante as primeiras infestações da praga na safra 2013/14. Da mesma forma, uma colônia de *H. zea* foi estabelecida a partir de uma coleta do milho (estágio reprodutivo R3) no município de Casa Branca (São Paulo), na safra de 2013/14. Desde então, ambas as populações têm sido mantidas em condições de laboratório, em dieta artificial e livres de pressão de seleção de inseticidas, proteínas Bt e introdução de indivíduos selvagens. Para garantir a ausência de presença adventícia entre as colônias de diferentes espécies, a cada geração, após o acasalamento, são coletados todos os indivíduos machos (F_0) de cada população, para identificação da espécie por meio da análise morfológica dos órgãos genitais (PONGUE, 2004). As populações utilizadas tiveram todos os indivíduos identificados como sendo da mesma espécie.

2.2.2 Linha básica de suscetibilidade à proteína Cry1Ac

Para caracterização da suscetibilidade de *H. armigera* e *H. zea*, foram realizados bioensaios em laboratório com a proteína formulada Cry1Ac sintética (MVP II, *Pseudomonas* encapsulado Cry1Ac da Dow Chemicals, San Diego, CA, EUA, contendo 11,14% de proteína Cry1Ac ativa). Curvas de concentração-resposta foram obtidas, por meio de bioensaios de incorporação de concentrações seriais de Cry1Ac em dieta artificial sem formalina e antibióticos, à temperatura máxima de 56 °C. Após a incorporação da proteína na dieta, uma alíquota de 1 ml de dieta contendo a proteína foi vertida em bandejas de bioensaio de 128 células (BIO-BA-128 CD Internacional Inc. Pitman, NJ). Cada célula foi infestada com uma neonata e as bandejas foram seladas com tampa adesiva (Bio-CV-16; CD International Inc., Pitman, NJ, EUA), que permitiu a troca de gases com o meio ambiente externo e, em seguida, incubadas em uma câmara climática (temperatura 27 ± 2 ° C, 60 ± 10% de umidade relativa e 14 h de fotoperíodo) por sete dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete a oito repetições por concentração (16 larvas por réplica). Mortalidade (indivíduos mortos e inibidos de muda para além do primeiro instar) e o peso das larvas sobreviventes foram registrados após sete dias, para estimar os parâmetros toxicológicos: concentração letal (CL) e concentração efetiva (CE) (SIMS, 1996). Parâmetros

toxicológicos CL_{50}, CL_{90}, CE_{50} e CE_{90} e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram estimados utilizando JMP® v10.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA).

Tabela 2.1 - Local, cultura hospedeira e safra de coleta das populações de *H. armigera* e *H. zea*

Safra	Espécie	Código	Município, Estado	Hospedeiro	Latitude	Longitude
	H. zea	LAB	Casa Branca, SP	Milho	21°55'03.1"S	47°10'41.3"W
	H. armigera	LAB	Montividiu, GO	Soja	17°22'28.8"S	51°13'23.3"W
	H. armigera	MS-1	Chapadão do Sul, MS	Soja	18°44'38.5"S	52°35'17.8"W
	H. armigera	SP-1	Jaboticabal, SP	Soja	21°12'27.8"S	48°19'37.0"W
	H. armigera	BA-1	Luis Eduardo Magalhães, BA	Algodão	12°00'56.9"S	45°49'19.8"W
	H. armigera	PR-1	Ponta Grossa, PR	Soja	25°05'13.5"S	49°59'18.7"W
2013/14	*H. armigera*	MT-1	Primavera do Leste, MT	Soja	15°26'22.4"S	54°10'44.7"W
	H. armigera	GO-1	Rio Verde, GO	Soja	17°44'27.0"S	50°55'55.4"W
	H. armigera	PR-2	Rolândia, PR	Soja	23°14'34.9"S	51°26'14.7"W
	H. armigera	BA-2	Correntina, BA	Soja	13°21'57.6"S	45°28'36.2"W
	H. armigera	BA-3	Luis Eduardo Magalhães, BA	Soja	11°48'26.6"S	45°59'01.3"W
	H. armigera	MT-2	Primavera do Leste, MT	Algodão	15°20'18.6"S	54°20'23.0"W
	H. armigera	SP-2	Jaboticabal, SP	Soja	21°12'50.7"S	48°15'58.8"W
2014/15	*H. armigera*	MT-3	Lucas do Rio Verde, MT	Soja	12°58'15.7"S	56°08'20.9"W
	H. armigera	BA-4	Luis Eduardo Magalhães, BA	Soja	12°11'27.9"S	45°46'28.5"W
	H. armigera	PR-3	Londrina, PR	Soja	23°26'38.2"S	51°06'04.8"W

2.2.3 Bioensaios em laboratório com discos de folhas

A toxicidade da soja MON87701 × MON89788 para *H. armigera* e *H. zea* foi avaliada em germoplasmas que se enquadram nos grupos de maturação 8.3 e 5.5. Os materiais foram semeados em casa de vegetação e conduzidos de acordo com as recomendações de boas práticas agrícolas. Discos com o diâmetro de 1,2 cm foram retirados de folhas desenvolvidas do terço superior de plantas nos estádios fenológicos da cultura V4, V6 e R1-R2, e colocados sobre ágar a 2,5% em placas acrílicas ® (Costar) com 24 células (Corning, Tewksbury, MA, EUA). Uma lagarta neonata foi depositada por célula. As placas foram mantidas em câmara climatizada (temperatura: 27 ± 1 ° C, umidade relativa: 60 ± 10%; fotoperíodo de 14 horas) por cinco dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de 24 larvas neonatas, com total de 120 larvas testadas para cada estádio fenológico da cultura. Após o período de incubação, foram contabilizados o número de lagartas mortas e o peso dos indivíduos vivos em cada placa. Para análise dos dados, foi utilizado o programa JMP® v10.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA). Antes de analisados, os dados foram transformados para atender o pressuposto de normalidade. Os dados obtidos a partir do bioensaio em laboratório (x) foram transformados em $\sqrt{x + 0{,}5})$ e submetidos à análise de variância; os valores médios dos tratamentos de soja Bt e soja não- Bt do mesmo grupo de maturação foram comparados ao teste de *t* de Student para comparação de médias.

2.2.4 Eficácia sob condições de alta infestação em casa de vegetação

A eficácia de soja MON87701 × MON89788 para proteção contra danos de *H. armigera* e *H. zea* foi avaliada sob condições de alta infestação em casa de vegetação. Dois materiais de soja MON87701 × MON89788 bem como suas respectivas isolinhas com grupos de maturação 8.3 e 5.5, foram cultivados de acordo com recomendações de boas práticas agrícolas. No momento que as plantas atingiram o estágio V6, as parcelas foram cobertas com gaiolas de *nylon* medindo 13 metros de comprimento por 3,5 metros de largura e 2,9 metros de altura, e mantidas até o momento da avaliação. O efeito de alta pressão para cada praga foi causado por

uma única infestação artificial, de 5.000 pupas de *H. armigera* e *H. zea* próximas à eclosão, liberadas dentro dos telados de *nylon* quando as plantas atingiram o estádio reprodutivo R1 (florescimento). Os dados de incidência larval (número de larvas por planta) e de desfolha e a porcentagem de estruturas reprodutivas danificadas foram aferidos 32 dias após a emergência dos adultos. A contagem de lagartas foi feita com auxílio de pano de batida em dois pontos de dois metros da linha de plantio. O levantamento dos danos de desfolha e do número de vagens danificadas foi realizado em treze plantas em sequência. Para análise dos dados, foi utilizado o programa JMP® v10.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA). Antes de analisados, os dados foram transformados para atender o pressuposto de normalidade. Os dados obtidos a partir do bioensaio de casa de vegetação (x) foram transformados em $(x + 0{,}1)^{0.5}$ e submetidos à análise de variância; os valores médios dos tratamentos de soja Bt e soja não- Bt do mesmo grupo de maturação foram comparados ao teste de *t* de Student para comparação de médias.

2.2.5 Avaliação da adequação da soja MON87701 × MON89788 ao conceito de "alta dose"

A avaliação da adequação de soja MON87701 × MON89788 ao conceito de Alta Dose ensaios foram realizados com germosplasmas com grupos de maturação, 8.3 e 5.5. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação sem aplicação de inseticidas até o período reprodutivo. Durante a emissão das primeiras flores (florescimento-R1) da cultura, folhas totalmente expandidas do terço superior foram coletadas e congeladas imediatamente em ultrafreezer (temperatura -70 ± 5 ^{o}C). O material congelado foi liofilizado até a completa retirada de água dos tecidos (ausência de variações no peso) e macerado por meio de almofariz e pistilo para a obtenção de um pó fino a ser incorporado em dieta artificial no bioensaios. Com base no peso do tecido fresco, foram calculadas as quantidades de matéria seca de cada amostra necessárias para resultar em diluições de 5, 10, 25, 50, 100 e 300 vezes, relativas ao tecido fresco, quando incorporadas em dieta artificial. A mistura de dieta e tecido liofilizado foi homogeneizada com auxílio do agitador de tubos tipo Vortex, por período de dois minutos, e, posteriormente, foi distribuída em bandeja de bioensaio (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), contendo 128 células (1 mL de dieta por célula). Para cada espécie, oito repetições, com 16 neonatos por repetição, foi

utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Mortalidade (indivíduos mortos e inibidos de muda para além do primeiro instar) e o peso das larvas sobreviventes foram registrados após sete dias.

2.2.6 Frequência de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788 em *H. armigera*

A frequência de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788 foi estimada por meio do método do F_2 screen, descrito por Huang et al. (HUANG et al., 2009).

Pupas de *H. armigera* foram obtidas a partir de indivíduos amostrados nas culturas da soja e algodão, não-Bt. As pupas sexadas e individualmente colocadas em gaiolas de plástico cilíndricas (20 cm de altura x 10 cm de diâmetro) até a emergência. A partir dos adultos foram formados casais que foram individualizados em gaiolas para acasalamento e oviposição. Aproximadamente 100 neonatas da progênie F_1 de cada acasalamento foram então mantidas em dieta artificial até a fase de pupa, como descrito acima. Adultos da geração F_1 (30 casais) de cada isofamilia foram mantidos em gaiolas plásticas para acasalamento e ovoposição da geração seguinte (F_2). A avaliação de indivíduos resistentes na geração F_2 foi realizada em bandejas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil), com folhas de soja MON87701 × MON89788 retiradas do terço superior de plantas nos estágios V4 a V6. Para cada isofamília, foram avaliados 128 neonatas da geração F_2. O número de larvas sobreviventes foi registrado e o tecido foliar foi substituído a cada quatro dias. Isofamílias que apresentaram sobreviventes após quatro dias da infestação foram novamente testadas para confirmação da presença de alelos. A frequência de alelos que conferem resistência foi estimada utilizando o algoritmo descrito na equação 1, de Andow e Alstad (1998). Intervalos de confiança (IC 95%) foram estimados pela equação 5 para ausência de indivíduos sobreviventes em isofamílias ou pela equação 7 para isofamílias com indivíduos. A frequência do alelo de resistência foi calculada usando a função de binom.bayes do pacote em R 3.1.0.

2.3 Resultados

2.3.1 Toxicidade da proteína Cry1Ac para *H. armigera* e *H. zea*

Os bioensaios de toxicidade revelaram que ambas as espécies *H. armigera* e *H. zea* (populações de referência LAB) são suscetíveis à proteína Cry1Ac. As concentrações de proteína utilizadas para causar as respostas que se adequassem aos modelos propostos variaram de 0,32 a 100 µg de Cry1Ac por mL de dieta. Com as respostas obtidas, foi possível estimar as CL_{50}, para *H. armigera*, em 1,22 µg de Cry1Ac por mL de dieta e, para *H. zea*, em 16,76 µg de Cry1Ac por mL de dieta (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Comparação da mortalidade causada pela proteína Cry1Ac (Concentração Letal [CL]) em neonatas de *H. armigera* e *H. zea* aos sete dias de bioensaio de incorporação em dieta artificial

Espécie	n[a]	Coeficiente Angular ± EP	CL_{50} (µg mL^{-1} de dieta)[b]		χ^2	gl[c]	RT[d]
			Concentração	95% IC			
H. armigera	688	1,59 ± 0,13	1,22	0,92–1,56	0,79	5	-
H. zea	960	2,82 ± 0,15	16,76	7,23–21,24	1,12	5	13,7

[a] Número de indivíduos testados

[b] CL_{50} são as concentrações da proteína Cry1Ac (µg mL^{-1} de dieta) necessárias para causar mortalidade ou inibição de mudança, além do primeiro instar, em 50% dos indivíduos após 7 dias de bioensaio. IC, intervalo de confiança com 95% de confiabilidade

[c] Graus de Liberdade

[d] Razão de tolerância

Com o peso dos sobreviventes, foi possível estimar as CE_{50}, para *H. armigera*, em 0,0028 µg de Cry1Ac por mL de dieta e, para *H. zea*, em 0,1602 µg de Cry1Ac por mL de dieta (Tabela 2.3). O parâmetro de redução de peso (CE_{50}) apresentou maior capacidade ainda para diferenciação da suscetibilidade entre as espécies. A comparação entre as CE_{50} resultou em uma razão de tolerância de *H. zea* de ~60 vezes em relação à *H. armigera*.

Tabela 2.3 - Comparação da inibição de desenvolvimento causado pela proteína Cry1Ac (Concentração Efetiva [EC]) de neonatas de *H. armigera* e *H. zea* aos sete dias de bioensaio de incorporação em dieta artificial

Espécie	n[a]	CE_{50} (µg mL^{-1} de dieta)[b]		RT[c]
		Concentração	95% IC	
H. armigera	523	0,0028	0,0018–0,0049	-
H. zea	436	0,1602	0,0281–1,1120	57,2

[a] Número de indivíduos testados

[b] CE_{50} e CE_{90} são as concentrações efetivas da proteína Cry1Ac (µg mL^{-1} de dieta) necessárias para causar 50% de inibição de desenvolvimento, respectivamente, aos setes dias de bioensaio. IC, intervalo de confiança com 95% de confiabilidade

[c] Razão de tolerância

2.3.2 Linha básica de suscetibilidade à proteína Cry1Ac

A linha básica de suscetibilidade de populações de *H. armigera* no Brasil foi documentada por meio de bioensaios de incorporação da proteína Cry1Ac em dieta artificial. Neonatas de populações amostradas nas safras 2013/14 e 2014/15 foram altamente suscetíveis à proteína Cry1Ac com sete dias de exposição, com valores estimados de CL_{50} (ou seja, concentrações que causaram mortalidade de 50% dos indivíduos) variando entre 0,11 (populações MS-1 e SP-1) e 1,82 µg de Cry1Ac por mL^{-1} de dieta artificial (população BA-2) (Tabela 2.4). Valores de CE_{50} (isto é, as concentrações que provocaram inibição do crescimento de 50% dos indivíduos), foram estimados entre 0,0029 (população MS-1) e 0,0165 µg de Cry1Ac por mL^{-1} dieta artificial (população BA-4) (Tabela 2.5). Houve sobreposição dos intervalos de confiança dos valores estimados de LC_{50} e EC_{50}, para a maior parte das populações, e baixa variabilidade entre as populações, sendo a diferença entre as populações de *H. armigera* mais suscetíveis e mais tolerantes de aproximadamente 16 vezes e 6 vezes para os valores de CL_{50} e de EC_{50}, respectivamente.

Tabela 2.4 - Sumário das concentrações letais estimadas (Concentração Letal [CL]) para diferentes populações de *H. armigera* expostas à proteína Cry1Ac por sete dias em bioensaios de incorporação

Safra[a]	População	Geração	n[b]	Coeficiente Angular ± EP	CL_{50} (µg mL^{-1} de dieta)[c]		LC_{90} (µg mL^{-1} de dieta)[c]		fit	
					Concentração	95% IC	Concentração	95% IC	χ^2	gl[d]
2013/14	LAB	F_4	688	1,59 ± 0,13	1,22	0,92–1,56	7,83	5,88–11,1	0,79	5
	MS-1	F_3	896	1,94 ± 0,13	0,11	0,08–0,13	1,43	1,02–2,15	6,79	5
	SP-1	F_2	896	1,53 ± 0,10	0,11	0,08–0,14	3,15	2,07–5,29	7,84	5
	BA-1	F_2	896	2,00 ± 0,13	1,37	0,95–1,81	5,99	4,55–8,56	4,94	5
	PR-1	F_2	899	1,89 ± 0,12	0,12	0,09–0,15	1,76	1,25–2,67	3,88	5
	MT-1	F_2	896	1,64 ± 0,17	0,41	0,32–0,52	8,96	5,90–15,0	2,20	5
	GO-1	F_2	896	2,04 ± 0,13	0,19	0,15–0,22	2,22	1,60–3,28	5,21	5
	PR-2	F_2	896	2,17 ± 0,18	0,32	0,26–0,39	3,35	2,44–4,90	4,15	5
	BA-2	F_2	1152	2,11 ± 0,24	1,82	1,16–2,49	7,89	5,71–12,5	3,46	4
	BA-3	F_3	720	2,74 ± 0,11	0,32	0,26–0,39	3,35	2,44–4,90	1,54	5
2014/15	MT-2	F_2	896	1,50 ± 0,12	0,20	0,22–0,36	1,66	1,36–2,02	3,45	5
	SP-2	F_2	896	1,87 ± 0,13	0,40	0,36–0,59	0,60	0,43–0,91	1,43	5
	MT-3	F_2	896	1,66 ± 0,13	0,28	0,18–0,48	1,28	0,56–1,64	1,07	5
	BA-4	F_2	768	1,90 ± 0,13	0,44	0,35–0,55	15,35	9,13–30,1	1,27	5
	PR-3	F_2	896	1,43 ± 0,09	0,32	0,25–0,41	10,76	6,69–19,6	4,79	5

[a] Safra em que a população foi coletada em campo
[b] Número de indivíduos testados
[c] CL_{50} sãos as concentrações da proteína Cry1Ac (µg mL^{-1} de dieta) necessárias para causar mortalidade ou inibição de mudança, além do primeiro instar, em 50% dos indivíduos após 7 dias de bioensaio. IC, intervalo de confiança com 95% de confiabilidade.
[d] Graus de Liberdade

Tabela 2.5 - Sumário das concentrações efetivas estimadas (Concentração Efetiva [CE]) para populações de *H. armigera* expostas à proteína Cry1Ac por sete dias em bioensaios de incorporação

Safra	População	Geração	N[a]	CE_{50} (µg mL^{-1} de dieta)[b]		CE_{90} (µg mL^{-1} de dieta)[b]	
				Concentração	95% IC	Concentração	95% IC
2013/14	LAB	F_4	523	0,0028	0,0018–0,0049	0,0189	0,0062–0,0249
	MS-1	F_3	447	0,0029	0,0021–0,0037	0,0421	0,0344–0,0526
	SP-1	F_2	466	0,0034	0,0031–0,0038	0,0407	0,0374–0,0444
	BA-1	F_2	468	0,0072	0,0038–0,0082	0,0468	0,0422–0,2120
	PR-1	F_2	451	0,0055	0,0049–0,0060	0,0341	0,0301–0,0389
	MT-1	F_2	593	0,0079	0,0038–0,0128	0,1848	0,0894–0,4885
	GO-1	F_2	507	0,0036	0,0020–0,0052	0,0547	0,0371–0,0871
	PR-2	F_2	563	0,0033	0,0024–0,0042	0,0658	0,0261–0,0842
	BA-2	F_2	478	0,0032	0,0018–0,0050	0,0602	0,0274–0,0644
	BA-3	F_3	436	0,0050	0,0041–0,0059	0,0554	0,0452–0,0695
2014/15	MT-2	F_2	307	0,0032	0,0002–0,0040	0,0581	0,0470–0,0738
	SP-2	F_2	353	0,0030	0,0026–0,0038	0,0590	0,0500–0,0708
	MT-3	F_2	316	0,0032	0,0002–0,0038	0,0590	0,0501–0,0708
	BA-4	F_2	454	0,0165	0,0128–0,0209	0,2724	0,1676–0,4939
	PR-3	F_2	418	0,0160	0,0153–0,0168	0,1143	0,1030–0,1275

[a] Número de indivíduos testados

[c] CE_{50} e CE_{90} são as concentrações efetivas da proteína Cry1Ac (µg mL^{-1} de dieta) necessárias para causar 50% e 90% de inibição de desenvolvimento dos indivíduos, respectivamente, aos setes dias de bioensaio. IC, intervalo de confiança com 95% de confiabilidade

2.3.3 Bioensaios em laboratório com discos de folhas

Os níves de proteína Cry1Ac expressos em folhas de soja MON87701 × MON89788 foram suficientes para causar mortalidade completa de neonatas de *H. armigera* e *H. zea*. Para *H. armigera*, discos de folha da soja MON87701 × MON89788 foram altamente tóxicos após cinco dias de alimentação, causando 100% de mortalidade, independente do grupo de maturação e do estágio da cultura. Os valores de mortalidade de *H. armigera* em soja MON87701 × MON89788 diferiram dos valores de soja isolinha não-Bt pelo teste de separação de médias (teste de t, P ≤ 0,05) para ambos germoplasmas e estágios da cultura avaliados (P < 0,0001) (Figura 2.1).

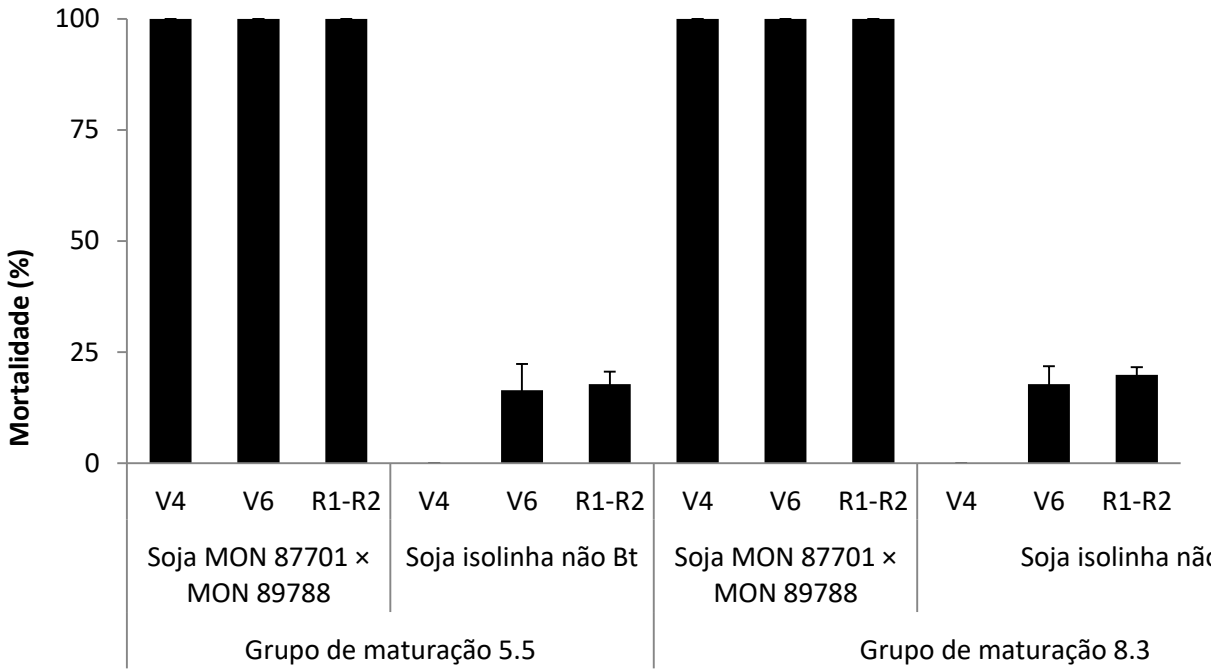

Figura 2.1 - Mortalidade (porcentagem) de neonatas de *H. armigera* após sete dias em discos de folha de soja MON 87701 × MON 89788 e soja isolinha não-Bt em diferentes estágios fenológicos

Os valores de mortalidade de *H. zea* em soja MON87701 × MON89788 também diferiram dos valores de soja isolinha não-Bt pelo teste de separação de médias (teste de t, P ≤ 0,05) para ambos germoplasmas e estágios da cultura avaliados (graus de liberdade = 10; P < 0,0001) (Figura 2.2). Lagartas de *H. zea* que sobreviveram após sete dias se alimentando de folhas de soja MON87701 ×

MON89788 apresentaram, em média, aproximadamente 80% de inibição de desenvolvimento.

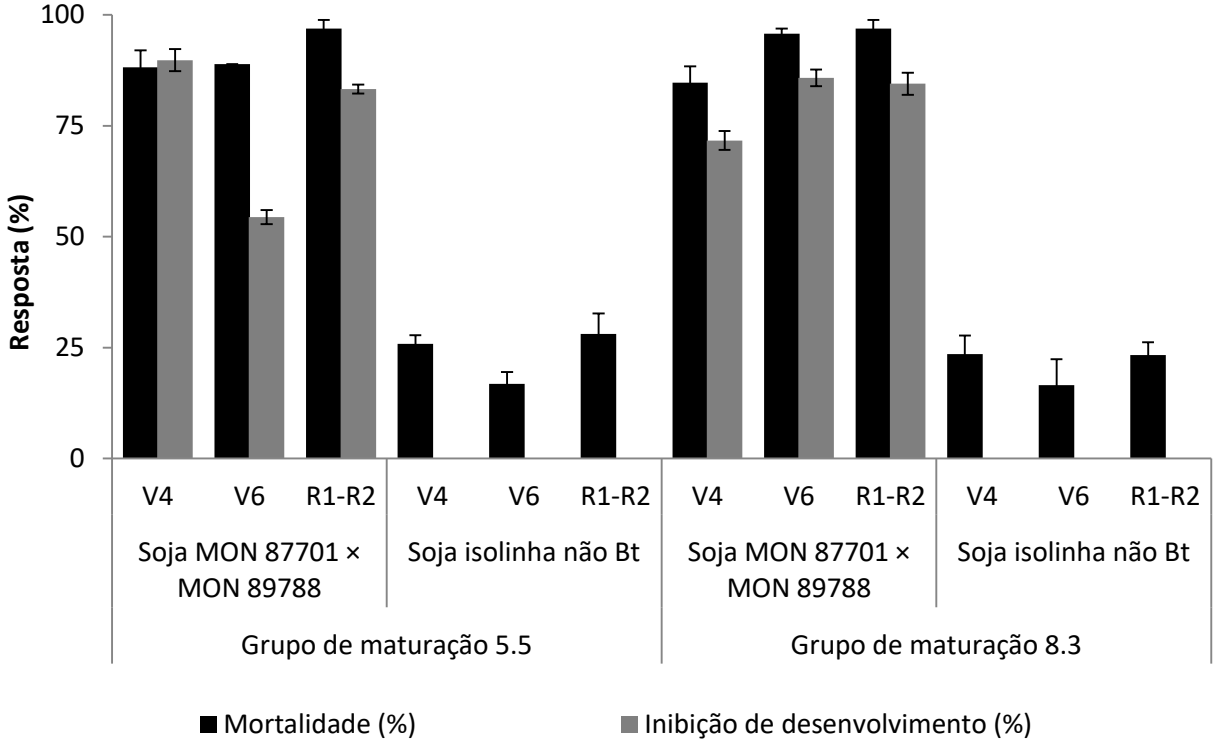

Figura 2.2 - Mortalidade e inibição de desenvolvimento (porcentagem) de neonatas de *H. zea* após sete dias em discos de folha de soja MON87701 × MON89788 e soja isolinha não-Bt em diferentes estágios fenológicos

A avaliação dos danos causados em discos de folha de soja MON87701 × MON89788 diferiu dos valores da soja isolinha não-Bt em todos germoplasmas e estágios da cultura avaliados (teste de t, $P \leq 0,05$) (graus de liberdade = 10; $P < 0,0001$). Entretanto, *H. zea* causou danos médios de até 15% da área, enquanto danos menores do que cinco porcento (raspagem) foram encontrados para *H. armigera* (Figura 2.3).

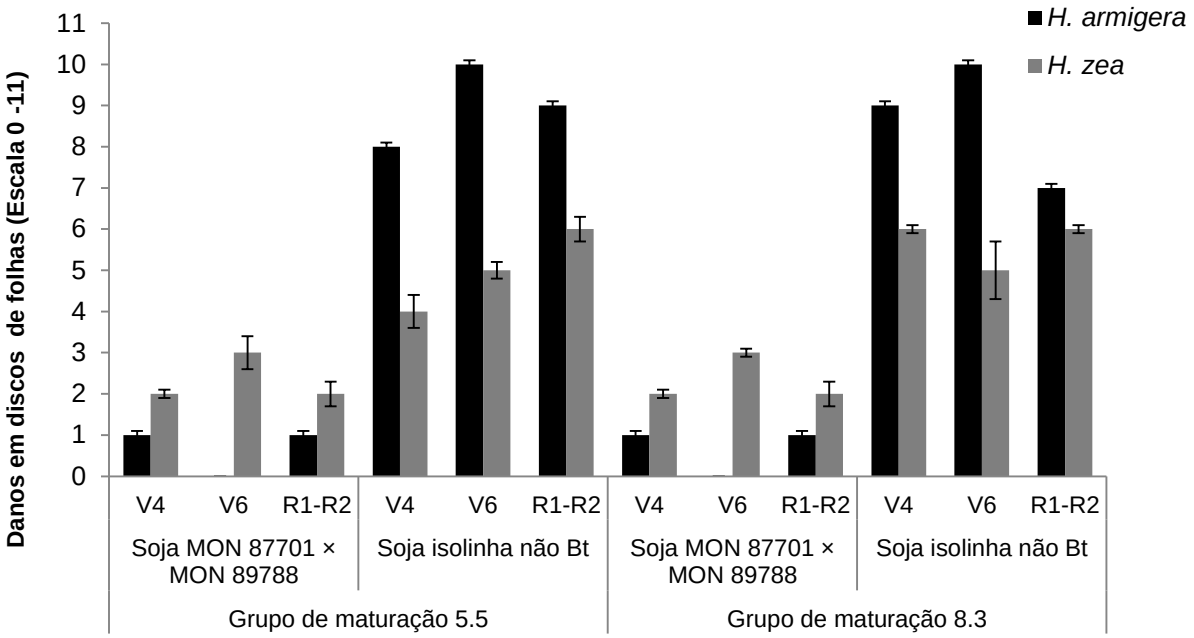

Figura 2.3 - Danos em discos e folhas (escala 0 – 11) causados por neonatas de *H. zea* e *H. armigera* após sete dias em discos de folha de soja MON87701 × MON89788 e soja isolinha não-Bt em diferentes estágios fenológicos

2.3.4 Eficácia sob condições de alta infestação em casa de vegetação

A infestação artificial com pupas de *H. armigera* resultou em mais de 450 lagartas por metro e desfolha maior do que 50% nos materiais de soja não-Bt. Nenhuma lagarta de *H. armigera* se estabeleceu em plantas de soja MON87701 × MON89788, diferindo significativamente do número de lagartas por metro observado no controle negativo (Tabela 2.6) (gl = 6, P < 0,0001). Reduções nos danos em soja MON87701 × MON89788 foram observadas em consequência do controle de *H. armigera*. Trinta e cinco dias após a infestação, a desfolha acumulada atingiu o nível máximo definido pela metodologia (50% de desfolha) nos materiais de soja isolinha não-Bt, significativamente mais danificados do que plantas de soja MON87701 × MON89788 de ambos os grupos de maturação (gl = 6, P <0,0001).

Tabela 2.6 - Incidência de lagartas e danos em plantas de soja MON87701 × MON89788 e soja isolinha não-Bt sob condições de alta pressão de infestação de *H. armigera* em casa de vegetação

Material	Lagartas por metro	Desfolha (%)	Vagens /planta	Vagens danificadas (%)
		Grupo de maturação 5,5		
MON 87701 × MON 89788	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	30,0 ± 1,1	0,0 ± 0,0*
Soja isolinha não-Bt	480,6 ± 32,2	50,0 ± 0,0	37,5 ± 1,0	37, ± 1,9
		Grupo de maturação 8.3		
MON 87701 × MON 89788	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	72,6 ± 4,1*	0,0 ± 0,0*
Soja isolinha não-Bt	463,3 ± 25,9	50,0 ± 0,0	0,7 ± 0,2	94,6 ± 11,2

*Valores representam média ± EP. Houve diferença significativa (Teste de *t*, P<0,05) entre soja MON 87701 × MON 89788 e isolinha não Bt

Em adição aos seus danos em folhas, lagartas de *H. armigera* apresentaram preferência por estruturas reprodutivas, incluindo flores e vagens. Todas as plantas foram infestadas durante o florescimento; entretanto, plantas de soja do grupo de maturação 8.3 permaneceram no estágio de florescimento por mais tempo. Por consequência da maior alimentação de lagartas de *H. armigera* nas flores, plantas de soja da isolinha não- Bt do grupo de maturação 8.3 tiveram redução significativa (~ 99%) no número de vagens desenvolvidas em relação à soja MON87701 × MON89788 do mesmo grupo de maturação (gl = 6, P <0,0001). Em contraste, o número de vagens de soja não Bt com menor ciclo de maturação (grupo de maturação 5.5) não diferiu significativamente das plantas de soja MON87701 × MON89788 do mesmo grupo de maturação (gl = 6, P = 0,066). No entanto, para ambos os grupos de maturação testados, as vagens desenvolvidas em plantas de soja MON87701 × MON89788 foram significativamente menos danificadas do que os dos correspondentes controles negativos (gl = 6, P <0,0001).

Em comparação com *H. armigera*, menor infestação foi obtida com infestação artificial com pupas de *H. zea*, resultando em cerca de 6 lagartas por metro e desfolha máxima de 33% nos materiais de soja não- Bt. Diferentemente dos resultados obtidos nos bioensaios com discos de folha, nenhuma lagarta de *H. zea* se estabeleceu em plantas de soja MON87701 × MON89788, diferindo significativamente do número de lagartas por metro observado nos controles negativos (Tabela 2.7) (gl = 6, P < 0,0001). Reduções nos danos em soja MON87701 × MON89788 foram observadas em consequência do controle de larvas *H. zea*. Trinta e cinco dias após a infestação, a desfolha acumulada atingiu o nível máximo de 33,7% no material de soja isolinha não-Bt do grupo de maturação 8.3 e 24,1% no material de soja isolinha não- Bt do grupo de maturação 5.5, significativamente mais danificados do que as plantas de soja MON 87701 × MON 89788 de ambos os grupos de maturação (gl = 6, P <0,0001).

Tabela 2.7 - Incidência de lagartas e danos em plantas de soja MON87701 × MON89788 e soja isolinha não Bt sob condições de alta pressão de infestação de *H. zea* em casa de vegetação

Material	Lagartas por metro	Desfolha (%)	Vagens /planta	Vagens danificadas (%)
		Grupo de maturação 5.5		
MON 87701 × MON 89788	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	37,1 ± 2,1*	0,0 ± 0,0*
Soja isolinha não-Bt	8,2 ± 2,1	24.1 ± 6.6	34,7 ± 1,9	48,4 ± 0,1
		Grupo de maturação 8.3		
MON 87701 × MON 89788	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	43,9± 3,5*	0,0 ± 0,0*
Soja isolinha não-Bt	3,9 ± 1,2	33,7 ± 5,5	0,7 ± 0,4	67,3 ± 4,2

*Valores representam média ± EP. Houve diferença significativa (*t*-teste, P<0,05) entre soja MON 87701 × MON 89788 e isolinha convencional

Resultados de preferência e danos em vagens foram similares aos de *H. armigera*, nos quais sendo que plantas de soja da isolinha não-Bt do grupo de maturação 8.3 tiveram redução significativa (~ 95%) no número de vagens desenvolvidas em relação à soja MON87701 × MON89788 no mesmo grupo de maturação (gl = 6, P <0,0001; Tabela 2.7). Em contraste, o número de vagens de soja

não Bt com menor ciclo de maturação (grupo de maturação 5.5) não diferiu significativamente das plantas de soja MON87701 × MON89788 do mesmo grupo de maturação (gl = 6, P = 0,066). No entanto, para ambos os grupos de maturação testados, as vagens desenvolvidas em plantas de soja MON87701 × MON89788 não foram danificadas, diferindo significativamente dos correspondentes controles negativos (gl = 6, P <0,0001).

2.3.5 Avaliação da adequação da soja MON87701 × MON89788 ao conceito de "alta dose"

Diluição de 25 vezes de tecido liofilizado de folhas de soja MON87701 × MON89788 de ambos os grupos de maturação resultou em altos níveis de mortalidade (larvas mortas ou que não mudaram de instar) e inibição de desenvolvimento (larvas que não mudaram para o terceiro instar) em lagartas de *H. armigera* (Figura 2.4). No entanto, lagartas de *H. zea* apresentaram menor suscetibilidade à proteína expressa pela soja MON87701 × MON89788, com respostas de mortalidade de 25 e 56%, quando alimentadas com diluições de 25 vezes de tecidos dos grupos de maturação 5.5 e 8.3, respectivamente. Lagartas que mudaram de instar foram inibidas em cerca de 85% em relação à mesma concentração de tecido de soja isolinha não Bt (Figura 2.5).

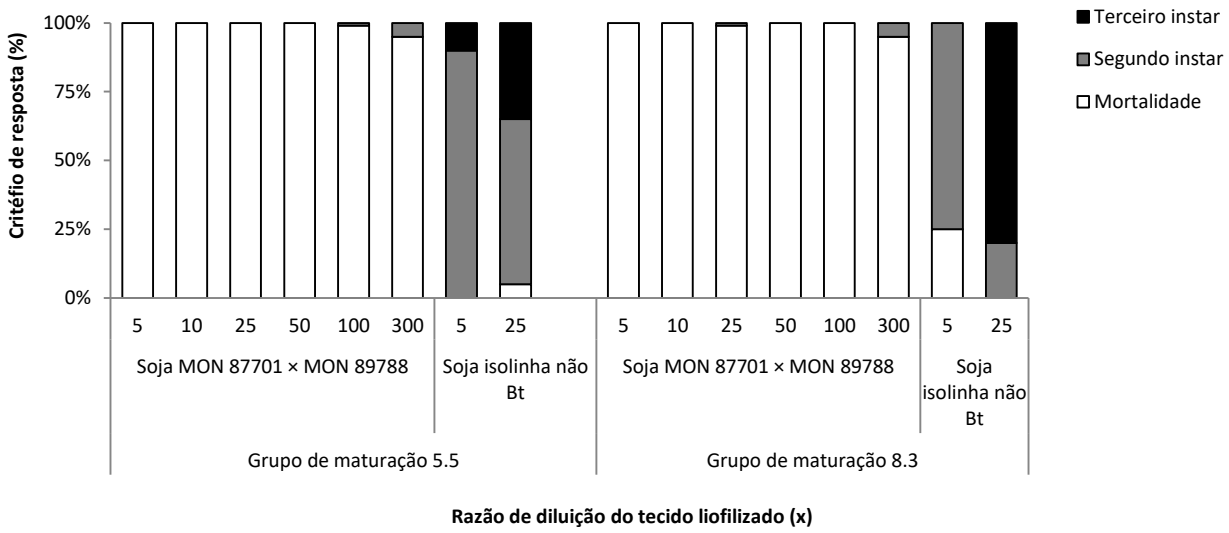

Figura 2.4 - Mortalidade e inibição de desenvolvimento de lagartas de *H. armigera* expostas por sete dias à dieta contendo diluições de tecido liofilizado de soja MON 87701 × MON 89788 ou de soja isoinha não-Bt

A alimentação em diluições de tecido de soja isolinha não-Bt causaram baixos níveis de mortalidade, variando de 6,25% a 15,62% entre os dois grupos de maturação. Em geral, a maioria das larvas expostas à dieta artificial contendo tecido de soja isolinha não-Bt atingiu o segundo instar, após sete dias, ao passo que a maior parte das larvas em dieta contendo tecido liofilizado de soja MON87701 × MON89788 não sobreviveu ou não avançou além do primeiro instar.

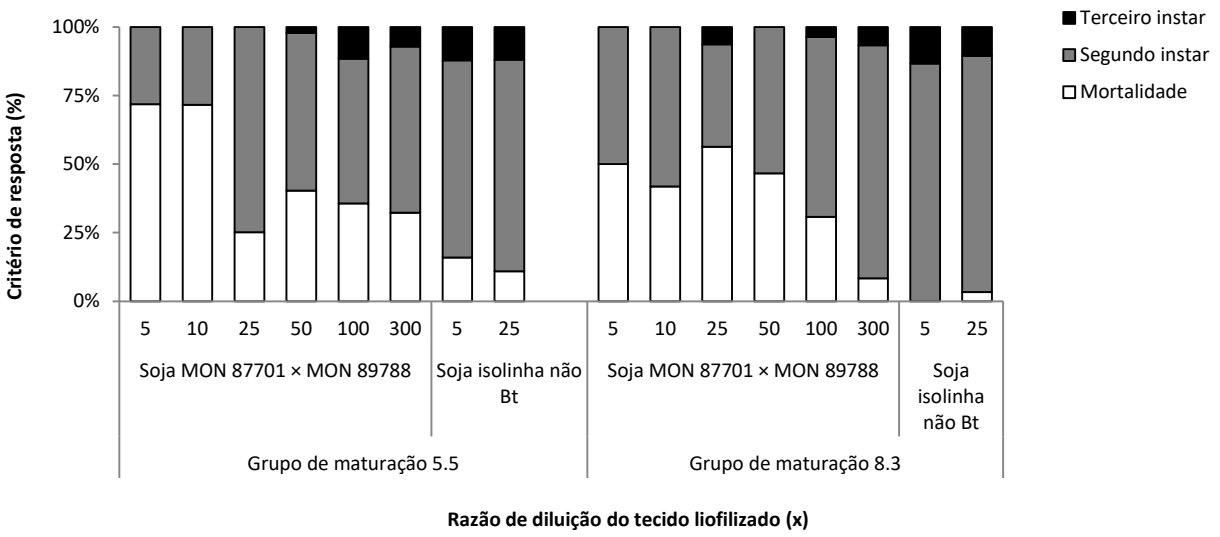

Figura 2.5 - Mortalidade e inibição de desenvolvimento de lagartas de *H. zea* expostas por sete dias à dieta contendo diluições de tecido liofilizado de soja MON87701 × MON89788 ou de soja isoinha não-Bt

2.3.6 Frequência de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788 em *H. armigera*

Dos 870 casais de *H. armigera* formados a partir de lagartas coletadas em campos de culturas não–Bt, 684 se acasalaram e geraram descendentes para a formação das isofamílias (Tabela 2.8). Grande parte das isofamílias apresentou problemas de acasalamento e gerou posturas inférteis, no que resultou em redução de cerca de 65% no número de isofamílias com descendentes férteis. Assim, apenas 212 isofamílias foram avaliadas quanto à presença de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788. Dos 128 neonatos de cada isofamília alimentados com folhas de soja MON87701 × MON89788, nenhum foi capaz de sobreviver além dos quatro dias de bioensaio, indicando que nenhuma das 212 isofamílias avaliadas possuía alelos de resistência ao evento de soja MON87701 × MON89788. A frequência inicial do alelo que confere resistência foi estimada em 0,0011 (95% intervalo de confiança de 0-,0043).

Tabela 2.8 - Frequência inicial de alelos que conferem resistência à soja MON87701 × MON89788 em populações de *H. armigera* no Brasil

Código da população	Casais selvagens (F_0)	Isofamílias obtidas (F_1)	Isofamílias férteis (F_2)		Frequência de alelos Resistentesresistentes (95% CI)[a]
			Avaliadas	Positivas	
BA-1	127	99	11	0	0,0194 (0–0,0701)
BA-2	145	120	51	0	0,0047 (0–0,0174)
BA-3	64	85	37	0	0,0064 (0–0,0236)
BA-4	120	100	37	0	0,0064 (0–0,0236)
MT-1	83	100	12	0	0,0180 (0–0,0652)
MT-2	104	88	28	0	0,0084 (0–0,0306)
SP-2	81	42	36	0	0,0066 (0–0,0242)
Total	870	684	212	0	0,0011 (0–0,0043)

[a] Frequência de alelos resistentes estimada para cada população e em conjunto (Total). IC, intervalo de confiança

2.4 Discussão

A comparação de parâmetros toxicológicos evidenciou grandes diferenças de suscetibilidade entre *H. armigera* e *H. zea* à proteína Cry1Ac e consequentemente ao evento de soja MON87701 × MON89788. A comparação dos valores de CL_{50} revelou razão de tolerância de *H. zea* de ~13 vezes em relação a *H. armigera*. A CL_{50} de 16,76 µg mL^{-1} de dieta obtida para a população de laboratório de *H. zea* se compara os valores obtidos com o mesmo tipo de bioensaio, nos Estados Unidos, com populações de campo, que variaram entre 5,87 e 91,65 µg mL^{-1} de dieta (ALI; LUTTRAELL; YOUNG, 2006). Para *H. armigera*, a sobreposição dos valores de CL_{50} e CE_{50} obtidos para diferentes populações do Brasil indica baixa variabilidade intraespecífica para suscetibilidade à proteína Cry1Ac (Tabelas 2.4 e 2.5). Apesar das distancias geográficas das amostragens de *H. amigera* em diferentes regiões, a

invasão recente da espécie na América do Sul, associada à contínua expansão geográfica e à alta mobilidade da espécie, podem ser algumas características que contribuem para a baixa variabilidade entre populações de diferentes regiões do Brasil (LEITE et al., 2014). No entanto, variações de suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac até de 50 vezes são reportadas em diferentes regiões do mundo, sendo que fatores como fonte de proteína e metodologia de bioensaio foram apontados como as principais fontes de variação nos resultados (BLANCO et al., 2009; GUJAR et al., 2007; BIRD; AKHURST, 2007; LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999).

As respostas obtidas para populações de *H. armigera* coletadas em diferentes regiões do Brasil são comparáveis a valores obtidos com a mesma fonte de proteína Cry1Ac (MVPII) em ensaio de incorporação em dieta para populações de *H. armigera* coletadas em regiões produtoras de algodão da Índia antes da liberação comercial dos plantios de algodão Bt. Estas populações apresentaram os valores de CL_{50} variando de 0,11 a 0,61 µg mL^{-1} de dieta, e para LC_{90} variando entre 1,17 e 6,94 µg mL^{-1} de dieta (JALALI et al., 2004). Adicionalmente, a suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac no Brasil também foi similar à de *C. includens* e *C. virescens,* alvos da tecnologia de soja MON 87701 × MON 89788 (BERNARDI et al., 2012, 2014; YANO et al., 2015).

Devido à importância da proteína Cry1Ac para tecnologias de algodão Bt em todo o mundo, diversos trabalhos têm documentado a suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Cry1Ac, através de linhas básicas de suscetibilidade, na China, na Austrália e na África do Sul (BIRD; AKHURST, 2007; WU; GUO, 1999; KRANTI; KRANTI; WANJARI, 2001; BRÉVAULT; PRUDENT; VAISSAYRE; CARRIÉRE, 2009). Entretanto, estabelecer linhas básicas de suscetibilidade regionalmente permite diferenciar entre as variações intraespecíficas de suscetibilidade à de verdadeiros processos de evolução de populações resistentes (HEAD; GREENPLATE, 2012). Programas de monitoramento baseados em métodos fenotípicos consistem na coleta de populações em campo, no estabelecimento em laboratório e na exposição dos descendentes a concentrações diagnósticas estabelecidas previamente por meio de linhas básicas de suscetibilidade (ROUSH; MILLER, 1986; FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990). O uso de concentrações diagnósticas para o monitoramento da resistência é mais eficiente em detectar variações de resistência ainda em baixa frequência, já que todos os indivíduos são testados a partir de uma única da dose

apropriada, requerendo menos indivíduos em comparação a curvas de dose-respostas, permite testar maior número de populações (ROUSH; MILLER, 1986; HALLIDAY; BURNHAW, 1990). Além do critério de mortalidade, linhas básicas de suscetibilidade foram estabelecidas baseadas na inibição de desenvolvimento, ou seja,pois indivíduos que não foram capazes de mudar de instar foram considerados mortos. Este critério tem se mostrado mais sensível em programas de monitoramento, por representar melhor as condições de campo e, consequentemente, se torna mais apropriado como critério para concentrações diagnósticas e detecção de pequenas variações na suscetibilidade de populações (ALI; LUTTRELL, 2009), além de tornar o monitoramento da suscetibilidade mais rápido e prático (MCPEHERSON; MACRAE, 2009). Mesmo com limitações associadas ao método, tais como baixa sensibilidade de detectar alelos de resistência com caráter recessivo, este tipo de bioensaio é mais adequado para um programa de larga escala de monitoramento da resistência de *H. armigera* à soja MON 87701 × MON 89788 (BERNARDI et al., 2014; BLANCO et al., 2009). Assim, os resultados gerados formam uma base sólida para o estabelecimento e validação de concentrações diagnósticas a serem utilizadas em um futuro programa de monitoramento da suscetibilidade de populações de *H. armigera* à proteína Cry1Ac no Brasil.

Dentre asos principais premissas para o sucesso na manutenção da suscetibilidade de pragas alvo a culturas Bt estão: expressão de altas concentrações de proteína, que, por sua vez, resultem em alta mortalidade na população de espécies alvo (≥99,99%), fazendo com que a resistência seja funcionalmente recessiva; baixa frequência inicial de alelos que conferem resistência; e disponibilidade de refúgios não- Bt em quantidade e distâncias apropriadas (TABASHNIK; BREVAULT; CARRIERE, 2013; TABASHNIK; VAN RESBURG; CARRIERE, 2009). Diversos estudos têm reportado níveis de eficácia de soja MON 87701 × MON 89788 para espécie de pragas da cultura na América do Sul, como *A. gemmatalis*, *C. includens*, *Rachiplusia nu*, *C. aporema* [Walsingham, 1914] e *C. virescens* (BERNARDI et al., 2012, 2014; MACRE et al., 2005). A alta eficácia da soja MON 87701 × MON 89788 contra *H. armigera* foi reportada por Azambuja et al. (2015), que documentaram 100% de mortalidade de lagartas de último instar que se alimentaram de folhas. Resultados similares foram observados por Yu et al. (2013). Mas a forma mais direta de se testar a adequação de um evento ao conceito de alta dose é realizar acasalamentos de adultos resistentes e suscetíveis em condições controladas e quantificar a mortalidade

dos descendentes diretamente em plantas Bt. No entanto, devido à baixa frequência inicial de alelos, frequentemente populações resistentes não estão disponíveis e testes indiretos são utilizados (TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIERE, 2009). Altos níveis de mortalidade e de inibição de desenvolvimento observados para *H. armigera* com diluições de tecido foliar (5 a 100 vezes) indicam que os níveis de proteína Cry1Ac expressos pela soja MON 87701 × MON 89788 sejam suficientes para controlar a maior parte dos heterozigotos, ou seja, indivíduos que carregam o alelo que confere resistência, fazendo com que a resistência tenha caráter funcionalmente recessivo (GOULD, 1998; TABASHNIK; BREVAULT; CARRIERE, 2013; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIERE, 2009; ROUSH, 1997; TABASHNIK; GOULD; CARRIERE, 2004).

O conjunto de resultados apresentados demonstra que a soja MON87701 × MON89788 apresenta alta eficácia para *H. armigera*. A alta eficácia reflete-se não apenas a alta suscetibilidade da espécie à proteína, como também na expressão de altos níveis da proteína Cry1Ac em tecidos das plantas de soja MON87701 × MON89788. Estruturalmente, a proteína Cry1Ac expressa por soja MON87701 × MON89788 é idêntica à proteína Bt expressa pelos eventos de algodão Bt MON531 e MON15985, que resultam em alta mortalidade contra *C. virescens* e *Pectinophora gossypiella* [Saunders]) e moderada mortalidade contra *H. zea* e *H. armigera* (WILSON et al., 1992; LLEWELLYN; MARES; FITT, 2007). No entanto, níveis de proteína Cry1Ac presentes em folhas de algodão Bt são significativamente inferiores (cerca de 5 µg de Cry1Ac /g tecido seco de folha) (GREENPLATE et al., 2003) quando comparados com os níveis encontrados em soja MON87701 × MON89788 (variando de 50 a 200 µg de Cry1Ac /g tecido seco de fresco) (MACRAE et al., 2005).

A frequência inicial de alelos que conferem resistência em populações de *H. amigera* do Brasil foi estimada em 0,0011 (intervalo de confiança de 95% de 0-0,0043). Esta estimativa se sobrepõe aos dados de frequência de populações de *H. armigera* da Austrália, onde, em sete anos de monitoramento da resistência à proteína Cry1Ac, por meio do método de F_2 screen, foi possível estimar a frequência em 0,0006 (intervalo de confiança de 95%, 0,0001– 0,002)) (DOWNES; MAHON, 2012a, 2012b). No Brasil, recentemente, também foi estimada em 0,0004 a frequência inicial de alelos que conferem resistência para *C. includens* à soja MON87701 × MON89788 (YANO et al., 2015). Esta espécie possui suscetibilidade à proteína Cry1Ac similar à

H. armigera. Apesar do método F_2 screen resultar em estimativas mais precisas sobre a frequência de alelos de resistência em populações de campo, ele tem como desvantagem maiores investimentos comparados ao método de concentrações diagnósticas utilizado como rotina emprogramas de monitoramento em larga escala (ANDOW; ALSTAD, 1998). A análise dos resultados apresentados, de alta toxicidade de soja Bt e baixa frequência inicial de alelos que conferem resistência para *H. armigera*, indica que o evento de soja MON87701 × MON89788 se adéqua aos preceitos para o sucesso da estratégia de manejo da resistência de alta dose/refúgio (GOULD, 1998; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIERE, 2013; ROUSH, 1997).

Outro elemento essencial para o sucesso da estratégia de alta dose/refúgio é a existência de hospedeiros não-Bt em quantidade suficiente para permitir o desenvolvimento de insetos não selecionados (GOULD, 1998). *H. armigera* é uma espécie altamente polífaga e tem como hospedeiros diversas plantas cultivadas e não cultivadas. Na China, até o momento, não é requerido o plantio de algodão não-Bt como refúgio de algodão Bt (WU et al., 2008; ZHANG et al., 2011). Para este caso especificamente, o relativo sucesso do manejo da resistência de *H. armigera* a algodão Bt é sustentado pela abundância de hospedeiros alternativos ao algodão Bt, que são capazes de gerar indivíduos suscetíveis em número suficiente. O reduzido tamanho das propriedades e a alta diversidade de cultivos que compõem o ambiente agrícola desta região se somaram à alta mobilidade de *H. armigera* para retardar evolução de populações resistentes (WU; GUO, 2005, WU; GUO; GAO, 2002; BEHERE et al., 2008). No entanto, modelos matemáticos sugerem que o uso de refúgios alternativos, na China, pode não ser equivalente, em eficiência, às áreas de refúgio estruturadas com algodão não-Bt e que a substituição por tecnologias piramidadas, com duas ou mais proteínas, e a associação com outras táticas de controle podem ser necessárias para manter os atuais níveis de eficácia no futuro (JIN et al., 2015).

Apesar de diversas, as paisagens agrícolas do Brasil trazem desafios adicionais para o manejo da resistência de insetos a culturas Bt. Condições ambientais favoráveis oferecem oportunidades de maiores janelas de plantio, o que, ao mesmo tempo, favorece o estabelecimento de grandes populações de insetos-praga, principalmente espécies polífagas (BARROS; DEGRANDE, 2012). A cultura da soja é caracterizada por ser uma economia de escala e, apesar da grande variação no tamanho das propriedades ao longo de toda extensão do país, o tamanho médio das

propriedades na região Centro-Oeste, principal região produtora de soja do país, é em média, seis vezes maior do que a média brasileira (CONTE, 2006). Proteínas Bt estão presentes no Brasil em eventos nas culturas de milho, soja e algodão, criando condições nas quais interações ecológicas entre pragas e hospedeiros se relacionam diretamente com a eficácia de diferentes culturas Bt. Até o momento, não existem informações sobre padrões de *H. amigera* no uso espacial e temporal de hospedeiros nos diferentes ambientes do Brasil. Este tipo de informação seria aplicável para ajustes de estratégias de manejo da resistência no Brasil (HEAD; JACKSON et al., 2010). A soja MON 87701 × MON 89788 foi recentemente aprovada para plantios comerciais no Brasil (CTNBIO, 2010) e tem crescido em adoção devido à alta eficácia contra os principais lepidópteros-praga da cultura da soja (CÉLERES, 2014). Diante do risco de evolução da resistência que este ambiente impõe, agricultores brasileiros são recomendados a plantar áreas de refúgio estruturado contendo no mínimo 20% da área semeada com soja não-Bt, à distância máxima de 800 metros, permitindo que insetos suscetíveis se desenvolvam e acasalem aleatoriamente para diluir os alelos de resistência. A conformidade e a distribuição das áreas de refúgio estruturado de acordo com a recomendação serão essenciais para a manutenção da suscetibilidade de *H. amigera* e outras pragas que são alvos da tecnologia de soja MON 87701 × MON 89788. Uma vez que o plantio de área de refúgio não é mandatório por lei no Brasil, o alinhamento entre todos os componentes da cadeia produtiva de soja será essencial para que os produtores plantem, de forma efetiva, áreas de refúgio. O desenvolvimento de novas tecnologias, que expressem duas ou mais proteínas e que sejam mais robustas em termos de manejo da resistência de insetos, será essencial em longo prazo para retardar a evolução da resistência no Brasil.

2.5 Conclusões

- *H. armigera* apresenta maior suscetibilidade à proteína Cry1Ac em relação a *H. zea*.
- Populações de *H. armigera* apresentaram baixa variabilidade intraespecífica para suscetibilidade à proteína Cry1Ac.
- A soja MON87701 × MON89788 resulta em altos níveis de mortalidade e proteção contra danos de *H. amigera* e *H. zea* durante o desenvolvimento da cultura.

- Alelos que conferem resistência de *H. armigera* à soja MON87701 × MON89788 são de baixa frequência no Brasil.
- Soja MON87701 × MON89788 se adequa aos preceitos de alta dose/refúgio para *H. armigera*.

Referências

ALBERNAZ, K.C.; MERLIN, B.L.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Baseline susceptibility to Cry1Ac insecticidal protein in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 106, p. 1819–1824, 2012.

ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 572-578, 1998.

ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Response estimates for assessing heliothine susceptibility to Bt toxins. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 102, n. 5, p. 1935-1947, 2009.

AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P.E.; SANTOS, R.O.; SOUZA, E.P.; GOMES, C.E. Effect of Bt soybean on larvae of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 7, n. 8, p. 90-94, 2015.

BARROS, R.; DEGRANDE, P.E. Evaluation of Bt-cotton as a strategic tool for the control of cotton plant-pests under field conditions. **Científica**, Jaboticabal, v. 40, n. 2, p. 117-137, 2012.

BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A.; BATTERHAM, P. Molecular markers to dis-criminate among four pest species of Helicoverpa (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 98, n. 6, p. 599–603, 2008.

BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A.; HECKEL, D.G.; APPLETON, B.R.; KRANTHI, K.R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 117, 2007.

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,** Susex, v. 70, n. 4, p. 588-594, 2014.

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 gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science,** Susex, v. 68, n. 7, p. 1083-1091, 2012.

BIRD, L.J.; AKHURST, R.J. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of invertebrate pathology**, New York, v. 94, n. 2, p. 84-94, 2007.

BLANCO, C.A.; ANDOW, D.A,; ABEL, C.A.; SUMERFORD, D.V.; HERNANDEZ, G.; LÓPEZ, J.D. J.R.; ADAMS, L.; GROOT, A.; LEONARD, R.; PARKER, R.; PAYNE, G.; PERERA, O.P.; TERÁN-VARGAS, A.P.; AZUARA-DOMÍNGUEZ, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance frequency in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 102, n. 1, p. 381-387, 2009.

BRÉVAULT, T.; PRUDENT, P.; VAISSAYRE, M.; CARRIÈRE, Y. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry2Ab2 Insecticidal Proteins in Four Countries of the West African Cotton Belt. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 102, n. 6, p. 2301-2309, 2009.

CÉLERES. **Informativo biotecnologia, IB14.03,** Uberlândia, 2014. 8 p.

CTNBIO. **Commercial approvals:** commercial release of genetically modified insect-resistant and herbicide-tolerant soy containing genetically modified events MON 87701 and MON 89788. (Technical Opinion, 2542/2010). Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15558.html>. Acesso em: 24 nov. 2015.

CONTE, L. **Economia de escala e substituição de fatores na produção de soja no Brasil.** 2006. 115 p. Tese (Doutorado em Economia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006. 115 p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11132/tde-21112006-141552/>. Acesso em: 23 nov. 2015.

CUNNINGHAM, J.P.; ZALUCKI, M.P. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 107, n. 3, p. 881-896, 2014.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DHURUA, S.; GUJAR, G.T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Management Science**, Susex, v. 67, n. 8, p. 898-903, 2011.

DOWNES, S.; MAHON, R. Evolution, ecology and management of resistance in *Helicoverpa* spp. to Bt cotton in Australia. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, n. 3, p. 281-286, 2012a.

DOWNES, S.; MAHON, R. Successes and challenges of managing resistance in *Helicoverpa armigera* to Bt cotton in Australia. **GM Crops & Food**, London, v. 3, n. 3, p. 228-234, 2012b.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J,; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, n. 1, p. 150-158, 2014.

FATHIPOUR, Y.; SEDARATIAN, A. Integrated management of *Helicoverpa armigera* in soybean cropping systems. In: EL-SHEMY, H.A. (Ed.). **Soybean:** pest resistance. Cairo: InTeOpP, 2013. p. 231–280.

FFRENCH-CONSTANT, RH.; ROUSH, R.T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in Arthropods**. Boston: Springer US, 1990. p. 4-38.

FITT GP. The ecology of Heliothis species in relation to agroecossystems. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 17-52, 1989.

GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; KEWESHAN, R.S.; DUNBAR, M.W. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. **PLoS One**, Berkeley, v. 6, n. 7, p. e22629, 2011.

GREENPLATE, J.T.; MULLINS, J.W.; PENN, S.R.; DAHM, A.; REICH, B.J.; OSBORN, J.A.; RAHN, P.R.; RUSCHKE, L.; SHAPPLEY, Z.W. Partial Characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, n. 1, p. 340-347, 2003.

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

GUJAR, G.T.; KALIA, V.; KUMARI, A.; SINGH, B.P.; MITTAL, A.; NAIR, R.; MOHAN, M. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. **Journal of Invertebrate Pathology,** New York, v. 95, n. 3, p. 214-219, 2007.

HALLIDAY, R.W.; BURNHAW, K.P. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 4, p. 1151-1159, 1990.

HEAD, G.; JACKSON, R.E.; ADAMCZYK, J.; BRADLEY, J.R.; VAN DUYN, J. Spatial and temporal variability in host use by *Helicoverpa zea* as measured by analyses of sTabela carbon isotope ratios and gossypol residues. **The Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 583–592, 2010.

HEAD, G.P.; GREENPLATE, J. The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. **GM Crops & Food**, London, v. 3, n. 3, p. 144-153, 2012.

HUANG, F.; ANDOW, D.A., BUSCHMAN, L.L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 1-16, 2011.

HUANG, F.; GHIMIRE, M.N.; LEONARD, B.R.; WANG, J.; DAVES, C.; LEVY, R. F2 screening for resistance to pyramided *Bacillus thuringiensis* maize in Louisiana and Mississippi populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science,** Sussex, v. 67, n. 10, p. 1269-1276, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**: quantidade produzida, valor da produção, área plantada e área colhida da lavoura temporária. Rio de Janeiro, 2012. 26 p.

JALALI, S.K.; MOHAN, K.S.; SINGH, S.P.; MANJUNATH, T.M. LALITHA, Y. Baseline-susceptibility of the old-world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from India to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal protein. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 1, p. 53-59, 2004.

JIN, L.; ZHANG, H.; LU, Y.; YANG, Y.; WU, K.; TABASHNIK, B.E.; WU, Y. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 2, p. 169-174, 2015.

KASTEN, P.J.R.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 69–78, 1978.

KRANTHI, K.R.; KRANTHI, S.; WANJARI, R.R. Baseline toxicity of Cry1A toxins to *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in India. **International Journal of Pest Management**, London, v. 47, n. 2, p. 141-155, 2001.

KRANTHI, K.R.; JADHAV, D.R.; KRANTHI, S.; WANJARI, R.R.; ALI, S.S.; RUSSELL, D.A. Insecticide resistance in five major insect pests of cotton in India. **Crop Protection,** Guildford, v. 21, n. 6, p. 449-460, 2002.

KRITICOS, D.J.; OTA, N.; HUTCHISON, W.D.; BEDDOW, J.; WALSH, T.; TAY, W.T. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? **PLoS One**, Berkeley, v. 10, n. 3, p. e0119618, 2015.

LEITE, N.A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I.; OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS One**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e113286, 2014.

LLEWELLYN, D.J.; MARES, C.L.; FITT, GP. Field performance and seasonal changes in the efficacy against *Helicoverpa armigera* (Hübner) of transgenic cotton expressing the insecticidal protein vip3A. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 93-101, 2007.

LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 1, p. 21-32, 1999.

MACRAE, T.C.; BAUR, M.E.; BOETHEL, D.J.; FITZPATRICK, B.J.; GAO, A.G.; 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 a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 2,p. 577-587, 2005.

MASTRANGELO, T.; PAULO, D.F.; BERGAMO, L.W.; MORAIS, E.G.F.; SILVA, M.; BEZERRA-SILVA, G.; AZEREDO-ESPIN, A. Detection and genetic diversity of a *Heliothine invader* (Lepidoptera: Noctuidae) from North and Northeast of Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 3, p. 970-980, 2014.

MCPHERSON, R.M.; MACRAE, T.C. Evaluation of transgenic soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A transgene for suppressing lepidopteran population densities and crop injury. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 4, p. 1640-1648, 2009.

NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **Detection of old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico.** Phytosanitary Alert System Official Pest Report. 2014. Disponível em: <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID/600>. Acesso em: 05 ago. 2015.

OMOTO, C.; BERNARDI O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI S.; HEAD, G.P.Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Susex, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.

POGUE, M.G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiationof adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae:Heliothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 1222–1226, 2004.

ROBERTSON, J.L.; SAVIN, N.E.; PREISLER, H.K.; RUSSELL, R.M. **Bioassays with Arthropods**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007. 125 p.

ROUSH, R.T. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? **Pesticide Science**, Tokyo, v. 51, n. 3, p. 328-334, 1997.

ROUSH, R.T.; MILLER, G.L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 79, n. 2, p. 293-298, 1986.

SIMS, S.R.; GREENPLATE, T.B.; STONE, T.B.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.L. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M. (Ed.). **Molecular genetics and evolution of pesticides resistance.** Washington: American Society, 1996. P. 229-242.

SPECHT, A.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PAULA-MORAES, S.V.; YANO, S.A. Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 1, p. 689–692, 2013.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S.V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, A.C.; MICHELI, A.; MORAIS, G.F.; GALLO, P.; PEREIRA, V.S.; SALVADORI, J.R.; BOTTON, M.; ZENKER, M.; AZEVEDO-FILHO, W.S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 101-104, 2015.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 3, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B.E.; BREVAULT, T.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 6, p. 510-521, 2013.

TABASHNIK, B.E.; GOULD, F.; CARRIÈRE, Y. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. **Journal of Evolutionary Biology**, London, v. 17, n. 4, p. 904-912, 2004.

TABASHNIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.; CARRIERE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2011-25, 2009.

TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T. ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, Berkeley, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013.

VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, Pretoria, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007.

WILSON, D.F.; FLINT, H.M.; DEATON, R.W.; FISCHHOFF, D.A.; PERLAK, F.J.; ARMSTRONG, T.A. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other Insects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, n. 4, p. 1516-1521, 1992.

WU, K.M.; GUO, Y.Y. The evolution of cotton pest management practices in China. **Annual Review of Entomology,** Palo Alto, v. 50, n. 1, p. 31-52, 2005.

WU, K.; GUO, Y.; GAO, S. Evaluation of the natural refuge function for *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) within *Bacillus thuringiensis* transgenic cotton growing areas in north China. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 95, n. 4, p. 832-837, 2002.

WU, K.; GUO, Y.; LV, N. Geographic variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 2, p. 273-278, 1999.

WU, K.M.; LU, Y.H.; FENG, H.Q.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. **Science,** New York, v. 321, n. 5896, p. 1676-1678, 2008.

YANG, Y.; LI, Y.; WU, Y. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. **Journal of Economic Entomolog**, Lanham, v. 106, n. 1, p. 375-381, 2013.

YANO, S.A.; SPECHT, A.; MOSCARDI, F.; CARVALHO, R.A.; DOURADO, P.M.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.H.; SOSA-GOMEZ, D. R. High susceptibility and low resistance allele frequency of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to Cry1Ac in Brazil. **Pest Management Science**, Susex, v. 72, n. 8, p. 1578-1584, 2016.

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**, Susex, v. 69, n. 12, p. 1326-1333, 2013.

ZALUCKI, M.P.; FURLONG, M.J. Forecasting Helicoverpa populations in Australia: a comparison of regression based models and a bioclimatic based modelling approach. **Insect Science**, Queensland, v. 12, n. 1, p. 45-56, 2005.

ZALUCKI, M.; DAGLISH, G.; FIREMPONG, S.; TWINE.,P. The biology and ecology of *Heliothis-armigera* (Hubner) and *Heliothis-punctigera* Wallengren (Lepidoptera, Noctuidae) in Australia: what do we know. **Australian Journal of Zoology,** Queensland, v. 34, n. 6, p. 779-814, 1986.

ZHANG, H.; YIN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, Y.; WU, S. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. **PLoS One,** Berkeley, v. 6, n. 8, p. e22874, 2011.

3 PREFERÊNCIA HOSPEDEIRA DE *Helicoverpa armigera* E *Helicoverpa zea* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NA PAISAGEM AGRÍCOLA: IMPACTO PARA O MANEJO DA RESISTÊNCIA A SOJA MON87701 × MON89788

Resumo

O rápido estabelecimento de *Helicoverpa armigera* (Hübner) em regiões agrícolas do Brasil foi impulsionado por características da espécie, tais como polifagia, alta mobilidade e alta capacidade de reprodução. Culturas geneticamente modificadas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm se tornado ferramentas essenciais para o manejo de *Helicoverpa* spp. em diversas regiões do Brasil. No entanto, a dinâmica populacional de pragas polífagas entre culturas impõe desafios para estratégias de manejo da resistência em paisagens agrícolas. Diante destes desafios, foram conduzidos estudos visando entender o potencial de cada cultura na composição das populações de *H. armigera* e *Helicoverpa zea* (Boddie) no Brasil. O papel das culturas mais abundantes nas regiões de cerrado (milho, milheto, sorgo, soja e algodão) na biologia e os aspectos demográficos de dessas espécies foram avaliados em laboratório. Também foram realizadas coletas sistemáticas para identificação molecular e taxonômica de lagartas de *Helicoverpa* spp. nestas mesmas culturas em diferentes regiões e épocas de plantio. Apesar de ambas as espécies serem consideradas pragas polífagas, *H. armigera* e *H. zea* apresentaram diferenças no uso de plantas hospedeiras na paisagem. Todos as plantas hospedeiras avaliadas foram favoráveis para o desenvolvimento e a reprodução de *H. armigera*, enquanto apenas milho e milheto foram capazes de sustentar *H. zea* até a fase adulta. Os maiores valores de crescimento populacional e o menor tempo de desenvolvimento em folhas e estruturas reprodutivas de algodão indicam maior adequação desta planta hospedeira para o desenvolvimento de *H. armigera*. Lagartas de *H. zea* estão associadas primariamente com a cultura do milho, enquanto *H. armigera* está presente em todas as culturas avaliadas. No entanto, o pequeno número de indivíduos de *H. armigera* encontrados em milho indica que a cultura não é o principal hospedeiro utilizado pela espécie no Brasil. O planejamento da paisagem em regiões de cerrado pode auxiliar na redução populacional de *H. armigera* e reduzir a pressão de seleção em culturas Bt. Devido à alta adaptabilidade às principais culturas, estratégias devem ser definidas em nível de paisagem para o manejo da resistência de *H. armigera* em culturas Bt. A manutenção de áreas de refúgio dentro de cada cultura é essencial para a manutenção da suscetibilidade de *H. armigera* e *H. zea* a culturas Bt em todas as regiões do Brasil.

Palavras-chave: *H. armigera*; *H. zea*; Tabela de vida; Hospedeiros; Manejo da resistência de insetos; Culturas Bt

Abstract

The rapid establishment of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in agricultural regions of Brazil was driven by characteristics of the species, such as polyphagia, high mobility and high capacity of reproduction. GM crops expressing *Bacillus thuringiensis* proteins (Bt) have become essential tools for the management of *Helicoverpa* spp. in various regions of Brazil. However, the population dynamics of pests polyphagous

between cultures poses challenges for management strategies of resistance in agricultural landscapes. Faced with these challenges, studies were conducted to understand the potential of each culture in the composition of populations of *H. armigera* and *Helicoverpa zea* (Boddie) in Brazil. The role of the most abundant crops in cerrado areas (maize, millet, sorghum, soybeans and cotton) in biology and demographics of these species were evaluated in the laboratory. They were also carried out systematic collection for molecular and taxonomic identification of larvae of *Helicoverpa* spp. these same crops in different regions and planting seasons. Although both species are considered polyphagous pests, *H. armigera* and *H. zea* showed differences in the use of host plants in the landscape. All the tested host plants were favorable for the development and reproduction of *H. armigera*, while only corn and millet were able to sustain *H. zea* to adulthood. The highest values of population growth and development shorter leaves and reproductive structures in cotton indicate greater adequacy of host plant for the development of *H. armigera*. Caterpillars of *H. zea* are associated primarily with corn, while *H. armigera* is present in all the studied cultures. However, the small number of *H. armigera* found in corn indicates that the culture is not used by the main host species in Brazil. The landscape planning in cerrado areas can assist in reducing population of *H. armigera* and reduce the selection pressure in Bt crops. Due to the high adaptability to the major crops, strategies should be defined landscape level for the management of *H. armigera* resistance to Bt crops. Maintaining refuge areas within each culture is essential for the maintenance of *H. armigera* and *H. zea* susceptibility to Bt crops in all regions of Brazil.

Keywords: *H. armigera*; *H. zea*; Life table; Host crops; Insect resistance management; Bt crops

3.1 Introdução

Fatores econômicos e operacionais têm limitado o uso de ferramentas do Manejo Integrado de Pragas (MIP) em muitas regiões produtoras de grãos e fibras no Brasil. Ocupando 45,7 milhões de hectares, mais de 90% da área total do país de soja, milho e algodão é semeada com culturas transgênicas que se tornaram a principal ferramenta para o manejo de insetos pragas e plantas daninhas (CELERES, 2016). No entanto, o plantio contínuo e sucessivo de extensas áreas com culturas que expressam genes de *Bacillus thuringiensis* Berliner tem acarretado em intenso processo de seleção e evolução de populações de pragas resistentes (FARIAS et al., 2013; BERNARDI et al., 2015; OMOTO et al., 2016). No Brasil, trinta e três eventos que expressam proteínas Bt para o controle de insetos são autorizados para o plantio comercial (CTNBIO, 2016). Apesar da abundância de eventos, reduzido número de proteínas é utilizado para o controle das pragas-alvo, formadas pelo grupo das proteínas Cry e apenas uma proteína VIP.

Neste cenário, a dispersão de pragas polífagas na paisagem traz desafios para o manejo de resistência a culturas Bt. Diversos estudos têm demostrado o intenso movimento de pragas polífagas entre diferentes hospedeiros cultivados em regiões do Brasil (MARTINELLI et al., 2006; DOMINGUES et al., 2012; ALBERNAZ et al., 2012; LEITE et al., 2014). Diversas estratégias são propostas para retardar o processo de evolução da resistência de pragas a culturas Bt. No entanto, o uso de tecnologias que expressam “Alta Dose” associadas ao plantio de culturas não-Bt que funcionem como áreas de refúgio tem se mostrado como estratégia mais eficiente (TABASHNIK; GOULD; CARRIÈRE, 2004). Como pressuposto para o sucesso desta estratégia, está o plantio de refúgio em tamanho e distância apropriados, permitindo que insetos não selecionados se desenvolvam e se acasalem aleatoriamente (GOULD 1998; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN 2011). Por exemplo, o uso de hospedeiros alternativos à cultura Bt pela praga alvo pode auxiliar a diluir os alelos de resistência. Em determinadas regiões dos Estados Unidos, populações de *H. zea* são compostas, em grande número, por indivíduos que se desenvolveram em plantas de soja e algodão, sendo fonte de insetos suscetíveis para a cultura do milho Bt (HEAD et al., 2010).

Espécies do gênero *Helicoverpa* são altamente polífagas e atacam grande variedade de hospedeiros cultivados e não cultivados em todo o mundo (KOGAN et al.,1989; MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993). *Helicoverpa armigera* (Hübner) é considerada como uma das mais importantes espécies de praga da agricultura no mundo (TAY et al., 2014). A espécie é amplamente disseminada na Europa, na África, na Ásia e na Austrália, onde tem causado danos extensivos em uma variedade de culturas (PONGUE, 2004; ZALUCKI et al.,1986; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014). Recentemente, esta espécie foi identificada no Brasil e outros países da América Latina (CZEPAK et al., 2013; SOSA-GÓMEZ et al., 2016). Diversos estudos também indicam o potencial risco de sucesso de invasão de *H. armigera* em países da America do Norte (ZALUCKI; FURLONG, 2005; KRITICOS et al., 2015), já havendo relato de interceptação da espécie, em Porto Rico em 2014 (Animal and Plant Health Inspection Service of the United States Department of Agriculture (USDA-APHIS) (NAPPO, 2014) e também na parte continental do Estados Unidos da América em 2015 (ANONIMO, 2015). Outra espécie polífaga conhecida por causar danos em diversas culturas, *Helicoverpa zea* (Boddie) é uma espécie nativa das Américas (BERGVINSON 2005). A espécie tem grande importância econômica, principalmente

por causar danos em plantas da família Poacea, sendo também encontrada em diversas plantas de outras famílias (BLANCO et al., 2007). No Brasil, *H. zea* é reconhecida como lagarta-da-espiga do , podendo causar danos econômicos com frequência na cultura do milho, com infestações em até 90% das espigas e reduzindo em até 8% a produtividade do milho (CRUZ et al., 1997).

A simplificação de sistemas agrícolas brasileiros tem se baseado em poucos cultivos e ganho em escala pelo aumento do tamanho das áreas. Entretanto, diversos autores têm demonstrado que estas mudanças temporais e espaciais na paisagem têm contribuído para o aumento populacional de pragas polífagas (MATSON et al., 1997; BIANCHI et al., 2003, 2006; MARTINELLI et al., 2006, 2007; FARIAS et al., 2014; BERNARDI et al., 2015). A habilidade de *H. armigera* em colonizar diversos hospedeiros simultaneamente em diferentes regiões ao longo do ano é reconhecida como o principal fator que define o tamanho e a manutenção populacional (PASHLEY, 1988; FITT, 1989; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). No entanto, espécies consideradas polífagas apresentam diferentes níveis de polifagia e preferência por determinadas espécies e estágios da planta (LIU et al., 2004). O entendimento destes padrões de utilização de diferentes fontes de alimento é aplicável no manejo de paisagem como um todo. Na Austrália, por exemplo, *Helicoverpa punctigera* (Wall.) está associada a plantas dicotiledôneas, enquanto *H. armigera* ocorre em ambos os grupos, monocotiledôneas e dicotiledôneas (FITT, 1989; WALTER; BENFIELD, 1994). O maior grau de polifagia de *H. armigera*, associado a outras características, permite que a espécie se estabeleça localmente ao longo do ano, enquanto picos populacionais de *H. punctigera* sejam observados apenas na primavera, com a chegada de adultos em migração (OERTEL et al., 1999). Na China, como outro exemplo deste comportamento, o plantio de refúgio de algodão não é requerido para o manejo da resistência de algodão Bt (WU; GUO, 2005). A abordagem utilizada na China é sustentada pelo alto grau de polifagia de *H. armigera* e pela abundância de plantas hospedeiras não- Bt, proporcionando refúgios naturais suficientes para retardar a evolução de resistência. Além da disponibilidade de plantas hospedeiras não Bt, o pequeno tamanho das propriedades na China, juntamente com a elevada mobilidade de *H. armigera*, são apontados como fatores que contribuem para o sucesso da estratégia de refúgio natural para *H. armigera* (WU; GUO; GAO, 2002; BEHERE et al., 2008).

No Brasil, a incidência de *Helicoverpa* spp. em altas densidades tem resultado em perdas econômicas em diversas regiões e culturas (TAY et al., 2013). A espécie está associada a diversos hospedeiros, mas, principalmente, atinge as culturas dicotiledôneas, como soja, feijão e algodão, e, em menor intensidade, as culturas monocotiledôneas, como milho (LEITE et al., 2015). Padrões de populações de *H. armigera* do Brasil diferem de populações da Austrália, onde as culturas do sorgo e milho são preferidas pela espécie em relação à cultura do algodão (JALLOW; ZALUCKI, 1995, 1996). De maneira semelhante, indícios de preferência também entre populações de *H. zea* do Brasil, sendo encontradas quase que exclusivamente na cultura do milho (LEITE et al., 2015). Nos Estados Unidos da América, a espécie é uma praga importante para as culturas da soja e do algodão (GORE et al., 2000).

Neste contexto, o estudo dos parâmetros biológicos e demográficos de *H. armigera* e *H. zea* em diferentes hospedeiros é uma ferramenta imprescindível para o sucesso de programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP). Entender a contribuição de cada hospedeiro para a formação da população, bem como as principais culturas responsáveis pelos surtos populacionais que infestam outras culturas, torna possível o manejo em âmbito regional. Adicionalmente, estratégias visando o Manejo da Resistência de Insetos (MRI) a culturas Bt, em cenários onde existe dispersão temporal e espacial de pragas, tendem a serem mais complexos, visto que diferentes culturas expressam as mesmas proteínas (ou similares) para o controle das mesmas espécie polífagas espécies polífagas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta de *Helicoverpa* spp. em diferentes culturas e regiões

Os indivíduos utilizados nas identificações das espécies e no estabelecimento das colônias em laboratório foram coletados em áreas comerciais, de acordo com a autorização concedida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio) do Ministério do Meio Ambiente para as empresas contratadas SGS Gravena (Sisbio licença # 10018-1) e PROMIP (Sisbio licença # 40380 -2).

Coletas de *Helicoverpa* spp. foram realizadas nas safras 2013/14, 2014/15 e 2015/16, em regiões com expressiva produção de grãos e fibras do Brasil. O método consistiu na coleta direta de lagartas em áreas comerciais de cultivos não-Bt de soja,

milho, algodão e milheto (Tabela 3.1). As lagartas coletadas foram mantidas em dieta artificial até a fase de pupa (KASTEN et al., 1978). Após a emergência, os adultos foram armazenados em freezer para posterior identificação da espécie, cujas metodologias estão descritas a seguir.

Tabela 3.1 - Identificação das coletas de *Helicoverpa* spp. em diferentes regiões e culturas nas safras de 2013/14, 2014/15 e 2015/16

Safra	Cultura	Município	UF	Latitude	Longitude
2013/14	Milho	Casa Branca	SP	21°50'41.1"S	46°59'39.0"W
	Milho	Cascavel	PR	24°49'46.3"S	53°26'49.0"W
	Milho	Jaboticabal	SP	21°12'27.8"S	48°19'37.0"W
	Milho	Londrina	PR	23°26'38.2"S	51°06'04.8"W
	Milho	Monte Castelhano	RS	28°14'55.2"S	52°06'43.5"W
	Milho	Montividiu	GO	17°22'28.8"S	51°13'23.3"W
	Milho	Passo Fundo	RS	28°06'20.8"S	52°21'32.2"W
	Milho	Piraí do Sul	PR	24°29'54.5"S	49°54'12.1"W
	Milho	Primavera do Leste	MT	15°35'34.5"S	54°05'08.8"W
	Milho	Uberaba	MG	19°39'50.4"S	47°56'58.3"W
	Milho	Uberlândia	MG	19°06'27.8"S	48°06'42.5"W
	Milheto	Rosário	BA	12°51'42.4"S	45°29'05.4"W
	Algodão	Chapadão do Céu	GO	18°35'01.1"S	52°46'30.5"W
	Algodão	Ranchão das Neves	BA	11°40'15.3"S	45°40'10.2"W
	Algodão	Rondonópolis	MT	16°18'53.0"S	54°38'27.0"W
	Algodão	Sapezal	MT	12°49'05.5"S	58°46'02.7"W
	Soja	Chapadão do Sul	MS	19°04'25.6"S	52°51'27.9"W
	Soja	Luis Eduardo Magalhães	BA	11°52'05.5"S	46°10'39.1"W
	Soja	Primavera do Leste	MT	15°26'22.4"S	54°10'44.7"W
	Soja	Rolândia	PR	23°14'34.9"S	51°26'14.7"W
	Soja	Ponta Grossa	PR	25°15'02.6"S	50°07'21.7"W
2014/15	Algodão	São Desedério	BA	12°26'27.7"S	45°26'47.0"W
	Algodão	Correntina	BA	13°13'49.1"S	45°30'42.8"W
	Soja	Viradouro	SP	20°52'38.8"S	48°22'35.0"W
	Soja	Lucas do Rio Verde	GO	12°58'15.7"S	56°08'20.9"W
	Soja	Primavera do Leste	MT	15°36'15.4"S	54°03'42.2"W
	Soja	Luis Eduardo Magalhães	BA	12°11'27.9"S	45°46'28.5"W
	Milho	Rio Verde	GO	17°44'50.1"S	51°05'03.9"W
	Milho	Ponta Grossa	PR	25°14'31.3"S	50°06'17.4"W
2015/16	Milho	Londrina	PR	23°39'19,4"S	51°04'19,0"W
	Milho	Montividiu	GO	17°49'96,1"S	50°34'84"W
	Milho	Conchal	SP	22°24'10,8"S	47°06'54"W
	Milho	Paranavaí	PR	23°41'25,8"S	51°00'05,6"W
	Milho	Conchal	SP	21°15'19,6"S	48°22'0,5"W
	Milho	Sumaré	SP	22°53'23,73"S	47°15'53,21"W
	Milho	Tamarana	PR	29°44'10.5"S	53°28'58.1"W
	Milho	Restinga Seca	RS	29°44'10.5"S	53°28'58.1"W

3.2.2 Estabelecimento e criação de *H. armigera* e *H. zea* em laboratório

Para estudos comparativos de biologia, foram isoladas em laboratório colônias de *H. armigera* e *H. zea.* As colônias foram formadas a partir de coletas de lagartas em campo. Cerca de 1000 lagartas de *H. armigera* foram coletadas na cultura da soja no município de Montividiu (Goiás) durante as primeiras infestações da praga na safra 2013/14. A colônia de *H. zea* foi formada com a coleta do mesmo número de indivíduos na cultura do milho (estágio reprodutivo R3) no município de Casa Branca (São Paulo) na safra de 2013/14. Os indivíduos de cada coleta foram mantidos em dieta artificial até a fase de pupa (KASTEN et al., 1978). Após a emergência, adultos de cada coleta foram mantidos em gaiolas de acasalamento de tubos de PVC (20 cm de altura x 14,5 de diâmetro), com revestimento interno de papel jornal, e fechadas na parte superior com tecido do tipo voil. Após o acasalamento, todos os indivíduos adultos de cada colônia foram retirados das gaiolas e identificados, por meio de parâmetros morfológicos da genitália (BAMBRILA, 2009; POGUE, 2004). Este procedimento foi repetido a cada geração e as colônias foram consideradas puras diante da ausência de mistura de espécies. Para segunda confirmação, cerca de quinze indivíduos de cada colônia de *H. armigera* e de *H. zea* foram coletados não sistematicamente e identificados por meio da análise da sequência do gene *citocromo C oxidase* subunidade I (COI) (BEHERE et al., 2008).

3.2.3 Biologia de *Helicoverpa* spp. em diferentes hospedeiros

3.2.3.1 Produção de estruturas vegetativas e reprodutivas

As principais culturas hospedeiras de *Helicoverpa* spp. foram semeadas em casa de vegetação para a produção de tecidos (Tabela 3.2). Cada espécie hospedeira foi semeada em diferentes épocas e quantidades, certificando de que todos hospedeiros estivessem no estádio reprodutivo durante o início dos bioensaios. As culturas foram conduzidas de acordo com as boas práticas agrícolas com ausência, de aplicação de inseticidas durante o ciclo de desenvolvimento.

Tabela 3.2 - Identificação das espécies hospedeiras e das estruturas utilizadas para o trabalho de biologia de lagartas de *Helicoverpa* spp

Cultura	Materiais	Estruturas oferecidas nos períodos larvais	
		0 a 4 dias	5 dias a pré-pupa
Soja	MG/BR 46	folhas	folhas e vagens
Algodão	Delta Opal	folhas	folhas, botões florais e maçãs
Milho	DKB390	estilos-estigmas	Estilos – estigma e espiga
Milheto	ADR300	inflorescência	panícula
Sorgo	AG1060	Inflorescência	panícula

3.2.3.2 Desenvolvimento e sobrevivência de *Helicoverpa* spp.

A avaliação dos parâmetros biológicos de *H. armigera* e *H. zea* em diferentes hospedeiros foi feita por meio de bioensaios em condições de laboratório. Adultos recém-emergidos foram colocados em gaiolas para acasalamento feitas com tubos de PVC (20 cm de altura x 14,5 de diâmetro) e alimentados com solução de mel a 10%. Quatro dias após a emergência dos adultos, 30 casais foram individualizadas em gaiolas do mesmo modelo para acasalamento e ovopisição. Ovos do quarto dia foram coletados e mantidos em câmara climatizada (temperatura: 27 ± 1 °C, umidade relativa: 60 ± 10%; fotoperíodo: 14 horas) até a eclosão. Placas de bioensaio contendo 128 células (BIO-BA-128 CD International Inc. Pitman, NJ) foram previamente preparadas com solução de ágar-água a 2,5% e discos de papel filtro. Para montagem das placas com os hospedeiros soja e algodão, foram retirados discos foliares de folhas não expandidas localizadas do terço superior das plantas. Para os hospedeiros milheto e sorgo, partes das inflorescências foram transferidas para as células, enquanto que, para o milho, foi utilizado o estilo-estigma para a alimentação das neonatas (Tabela 3.2). Cada célula foi infestada com uma neonata, as placas foram seladas com tampa adesiva (Bio-CV-16; CD International Inc., Pitman, NJ, EUA) e, em seguida, incubadas em uma câmara climatizada (temperatura 27 ± 2 ° C, 60 ± 10% de umidade relativa e 14 horas de fotoperíodo) por quatro dias.

Após o período de desenvolvimento inicial, de quatro dias, as lagartas sobreviventes foram transferidas para placas de 16 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) contendo solução agar-água a 2,5% e pedaço de papel filtro para a

manutenção da umidade. As placas de 16 células continham estruturas reprodutivas de plantas com a mesma idade das plantas das quais foram retirados os discos foliares. Para os tratamentos de soja e algodão, além de pedaços de folhas não expandidas, foram também oferecidas estruturas reprodutivas (Tabela 3.2). Folhas e estruturas reprodutivas foram substituídas a cada dois dias até o fim da fase larval de cada tratamento. Os parâmetros biológicos avaliados foram: duração e viabilidade de ovos, larvas, pupas e ciclo total (de ovo a adulto), peso de pupas, razão sexual, longevidade de fêmeas e duração do período de ovopisição. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo oito repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de 16 larvas neonatas, com total de 128 larvas testadas para cada hospedeiro e espécie de inseto praga. Para análise dos dados, foi utilizado o pacote estatístico JMP® (The SAS Institute, Cary, NC, USA). Os dados obtidos a partir do bioensaio em laboratório (x) foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$ e submetidos à análise de variância e as médias de cada parâmetro foram comparadas entre hospedeiros e espécies pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2.4 Identificações de *Helicoverpa* spp. coletadas em diferentes hospedeiros no campo

Os indivíduos de *Helicoverpa* spp. coletados em diferentes culturas foram identificados a partir de análises morfológicas e moleculares. Todos os indivíduos coletados durante as safras de 2013/14 e 2015/2016 foram identificados pela morfologia da genitália de machos adultos. O método consistiu na dissecação da genitália masculina e na montagem de lâminas para avaliação das estruturas que compõem o órgão masculino. Algumas estruturas presentes na genitália masculina foram importantes na diferenciação das duas espécies. Entretanto, a presença de três lobos na base da vesica de machos de *H. zea*, em contrapartida a um único lobo na base da vesica de machos de *H. armigera*, foi a característica mais evidente para a identificação (POGUE, 2004; SPECH et al., 2013).

Os demais indivíduos, coletados durante a safra de 2014/15, foram identificados por meio da análise do fragmento da sequência do gene mitocondrial *citocromo oxidase I* (COI) (BEHERE et al., 2008; TAY et al., 2013). Amostras de DNA genômico foram extraídas a partir do tórax macerado dos indivíduos coletados em campo, utilizando o kit de extração (STRATEC Molecular, Berlin, Gemany), de acordo

com as instruções do fabricante. O fragmento do gene COI foi amplificado por meio reações de PCR (Polymerase chain reaction) (FOLMER et al., 1994; BEHERE et al., 2008).

3.3 Resultados

3.3.1 Efeito do hospedeiro no desenvolvimento, na reprodução e nos parâmetros demográficos de *H. armigera* e *H. zea*

3.3.1.1 Desenvolvimento de estágios imaturos

Apesar de ambas as espécies serem conhecidas como pragas polífagas, diferentes níves de viabilidade e desenvolvimento foram observados entre *H. armigera* e *H. zea* de acordo com a planta h**o**spedeira. Neonatas de *H. armigera* foram capazes de se desenvolver com sucesso até a fase adulta em todos os hospedeiros avaliados (Tabela 3.3). Entretanto, os valores de viabilidade de lagartas (F = 21,1; gl = 4, 15; P <0,0001), pupas (F = 6,41; gl = 4, 12; P <0,0053) e total (ovo-adulto) (F = 14,2; gl = 4, 12; P <0,0002) diferiram significativamente de acordo com o hospedeiro de alimentação.

Tabela 3.3 - Viabilidade (porcentagem) dos estágios de *H. armigera* em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Viabilidade do estágio (%) (± erro padrão)[1]						
	n	Ovo	*n*	Lagarta	*n*	Pupa	Ovo-Adulto
Algodão	359	74,6 ± 3,3 a	128	64,0 ± 2,7 a	59	86,7 ± 6,4 a	41,6 ± 4,1 a
Milheto	236	67,6 ± 3,4 a	128	67,2 ± 2,1 a	46	54,9 ± 3,5 b	24,8 ± 1,3 b
Milho	131	72,9 ± 11,4 a	128	23,4 ± 6,0 c	27	92,6 ± 4,3 a	15,4 ± 3,4 b
Soja	180	77,2 ± 11,0 a	128	28,9 ± 4,7 bc	31	85,5 ± 6,2 a	18,8 ± 2,7 b
Sorgo	160	70,0 ± 7,3 a	128	43,7 ± 4,4 b	40	72,9 ± 10,4 ab	21,9 ± 3,2 b

[1] Valores representam médias ± EP. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna (médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferenciam significativamente entre si)

Lagartas alimentadas com folhas jovens e estruturas reprodutivas de algodão e milheto tiveram as maiores viabilidades em relação aos demais hospedeiros, diferindo dos demais tratamentos pelo teste de separação de médias. Milho e soja foram as culturas menos favoráveis ao desenvolvimento das lagartas, com cerca de 20 a 30% de viabilidade, respectivamente. Em termos gerais, pupas de *H. armigera* desenvolvidas a partir das gramíneas milheto e sorgo geraram menor número de adultos que os demais hospedeiros. Apesar da menor sobrevivência larval, as maiores viabilidades foram encontradas em pupas desenvolvidas em espigas de milho (92,6%). Com exceção da viabilidade de pupas desenvolvidas a partir de milheto, não houve diferenciação entre os valores de viabilidade dos demais hospedeiros pelo teste de separação de médias. Apesar das variações causadas pelos hospedeiros em diferentes fases imaturas, o algodão foi o hospedeiro que resultou na maior viabilidade para o ciclo total de *H. armigera* (41%) (ovo-adulto), diferindo dos demais hospedeiros pelo teste de separação de médias.

Tabela 3.4 - Duração (dias) dos estágios de *H. armigera* em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Duração do estágio (dias) (± erro padrão) [1]			
	Ovo	Lagarta	Pupa	Ovo-Adulto
Algodão	3,6 ± 0,1 a	15,9 ± 0,1 e	12,98 ± 0,2 a	31,9 ± 0,2 e
Milheto	3,4 ± 0,2 a	20,8 ± 0,2 c	13,3 ± 0,2 a	36,6 ± 0,3 c
Milho	3,4 ± 0,2 a	23,0 ± 0,1 a	12,6 ± 0,4 a	38,6 ± 0,4 a
Soja	3,2 ± 0,1 a	16,0 ± 0,1 d	13,8 ± 0,3 a	32,8 ± 0,3 d
Sorgo	2,7 ± 0,2 a	21,0 ± 0,2 b	13,4 ± 0,2 a	37,2 ± 0,3 b

[1] Valores representam médias ± erro padrão. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna (médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferenciam significativamente entre si)

Além de afetar a viabilidade das fases imaturas de *H. armigera*, a alimentação em diferentes hospedeiros resultou em variações significativas na duração de lagartas (F = 449,8; gl = 4, 186; P <0,0001). Houve grande diferença do período de desenvolvimento para cada hospedeiro, sendo a cultura do algodão resultando em menor tempo de desenvolvimento (cerca de 15 dias) e o milho teve o maior tempo (cerca de 23 dias). As variações no tempo de desenvolvimento de *H. armigera*

afetaram de forma significativa o período total de desenvolvimento (ovo-adulto) (*F* = 156,8; gl = 4, 131; *P* <0,0001).

Além de interferir diretamente na viabilidade, o alimento também foi fonte de variação no período de desenvolvimento de lagartas, com diferença significativa entre os resultados (Tabela 3.4, *F* = 0,0; gl = 0,0; *P* = 0,001). Lagartas de *H. armigera* que se alimentaram de estruturas de algodão e soja apresentaram período larval cerca de 4 dias menor em relação aos demais tratamentos. A viabilidade e o tempo de desenvolvimento de lagartas não tiveram relação com o peso de pupas de *H. armigera*; já pupas mais pesadas derivaram dos hospedeiros milho e milheto.

Apesar da similaridade em diversos parâmetros morfológicos e genéticos com *H. armigera*, lagartas de *H. zea* não foram capazes de completar o período larval em todos as plantas hospedeiras avaliadas. Neonatas de *H. zea* foram capazes de se alimentar inicialmente de estruturas de soja, algodão e sorgo. No entanto, altos níves de mortalidade, logo nos primeiros dias da fase larval, demonstraram que estas culturas não foram apropriadas para a alimentação da espécie (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Viabilidade (porcentagem) dos estágios de *H. zea* em milho e milheto

Hospedeiro	Viabilidade do estágio (%) (± erro padrão)[1]						
	n	Ovo	*n*	Lagarta*	*n*	Pupa	Ovo – Adulto
Milheto	60	55,0 ± 5,8	128	16,4 ± 2,6	19	79,8 ± 8,1	7,3 ± 1,47
Milho	100	57,0 ± 12,4	128	18,7 ± 4,9	19	85,4 ± 8,5	8,46 ± 1,52

[1] Valores representam médias ± EP. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna. *Houve diferença significativa (teste de t a P≤ 0,05) entre os tratamentos

Neonatas de *H. zea* completaram o dsenvolvimente em milho e milheto, gerando adultos férteis. No entanto, foi observada diferença significativa na viabilidade de lagartas alimentadas em diferentes hospedeiros (*F* = 16,0; gl = 1, 12; *P* <0,0001). O período para o desenvolvimento larval foi reduzido em cerca de cinco dias para lagartas que se alimentaram em milho (*F* = 88.3; gl = 1, 42; *P* <0,0001) e, consequentemente, com redução no período de desenvolvimento total (ovo-adulto) (*F* = 93,8; gl = 1,31; *P* <0,0001) (Tabela 3.6).

Tabela 3.6 - Duração (dias) dos estágios de *H. zea* em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Duração do estágio (dias) (± erro padrão) [1]			
	Ovo	Larva*	Pupa	Ovo-Adulto*
Milheto	3,3 ± 0,3	25,0 ± 0,1	12,4 ± 0,3	40,4 ± 0,3
Milho	3,6 ± 0,2	20,7 ± 0,4	11,5 ± 0,4	35,4 ± 0,4

[1] Valores representam médias ± EP. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna. *Houve diferença significativa (teste de t a P≤ 0,05) entre os tratamentos

Outro parâmetro importante de desenvolimento de *H. armigera* afetado significativamente pelo hospedeiro foi o peso de pupas (F = 115,9; gl = 1, 281; P <0,0001) (Figura 3.1). Pupas de *H. armigera* apresentaram maior peso quando tiveram milho e milheto como hospedeiros. Apesar de mais pesadas em relação à espécie anterior, pupas de *H. zea* não diferiram significativamente em relação ao peso (F = 115,9; gl = 1, 281; P <0,0001).

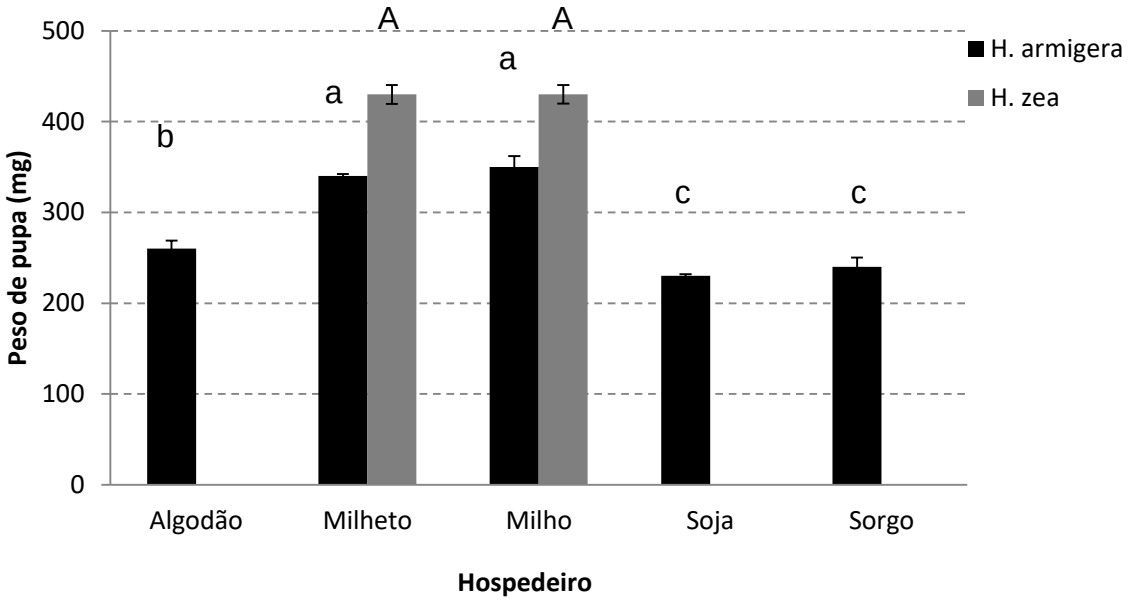

Figura 3.1 - Peso de pupa (mg) de *H. armigera* e *H. zea* obtidas a partir de diferentes hospedeiros. Valores representam médias ± erro padrão. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada espécie. Houve diferença significativa (Teste de Tukey a P≤ 0,05) apenas para o peso de pupas de *H. armigera* (médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferenciam significativamente entre si)

3.3.1.2 Parâmetros da fase adulta

A razão sexual elogenvidade de machos e fêmeas são apresentados na Tabela 3.7. Em comparação aos imaturos, a fase adulta não foi afetada significativamente pelo hospedeiro de alimentação para os parâmetros de razão sexual e longevidade (macho e fêmea) em *H. armigera* (F = 0,058; gl = 4, 206; P = 0,6767) e em *H. zea* (F = 0,060; gl = 1, 32; P = 0.806). Adultos de *H. zea* sobreviveram por cerca de 8 dias, enquanto adultos e *H. armigera* sobreviveram por cerca de 13 dias.

Tabela 3.7 - Comparação dos parâmetros biológicos de adultos de *H. armigera* e *H. zea* em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Parâmetros biológicos [1]					
	H. armigera			*H. zea*		
	Razão sexual	Longevidade (dias)		Razão sexual	Longevidade (dias)	
		Fêmea	Macho		Fêmea	Macho
Algodão	0,6 ± 0,1 a	13,5 ± 0,6 a	13,8 ± 0,9 a	-	-	-
Milheto	0,5 ± 0,0 a	12,0 ± 1,2 a	12,8 ± 0,8 ab	0,6 ± 0,1	8,6 ± 2,0	8,2 ± 2,0
Milho	0,5 ± 0,1 a	12,4 ± 1,4 a	11,4 ± 1,1 ab	0,7 ± 0,1	8,0 ± 1,0	10,6 ± 0,9
Soja	0,5 ± 0,1 a	14,5 ± 1,4 a	9,2 ± 0,83 b	-	-	-
Sorgo	0,5 ± 0,1 a	12,5 ± 1,5 a	15,2 ± 1,4 a	-	-	-

[1] Valores representam médias ± EP. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna (médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferenciam significativamente entre si)

Os valores de fertilidade de fêmeas de *H. armigera* e *H. zea* são apresentados na Tabelas 3.8 e 3.9. Ambas as espécies, *H. armigera* e *H. zea*, geraram descendentes férteis nos hospedeiros que sustentaram as fases imaturas. No entanto, o número total e o número diário de ovos variou significativamente, de acordo com o hospedeiro de alimentação das lagartas de *H. armigera* (F = 7,61; gl = 4,69; P <0,0001) e não variando para *H. zea* (F = 0,890; gl = 1, 8; P = 0,3718).

Fêmeas de *H. armigera* tiveram, em média, produção total de 426,43 ovos (Erro Padrão ± 46,0), similar ao número de *H. zea* média de 512,2 (Erro Padrão ± 56,2).

Tabela 3.8 - Comparação dos parâmetros biológicos de *H. armigera* em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Parâmetros reprodutivos[1] (± erro padrão) [1]		
	Total de ovos / Fêmea	Ovos dia / Fêmea	% Eclosão
Algodão	773,3 ± 96,8 a	132,5 ± 17,6 a	74,5 ± 3,3 a
Milheto	253,7 ± 57,3 b	64,7 ± 10,7 b	67,6 ± 3,3 a
Milho	255,2 ± 67,1 b	47,1 ± 10,2 b	72,9 ± 11,4 a
Soja	408,6 ± 120,4 b	89,8 ± 21,2 ab	77,2 ± 11,0 a
Sorgo	296,8 ± 78,54 b	65,4 ± 9,6 ab	70,0 ± 7,3 a

[1] Valores representam médias ± EP. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna (médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não se diferenciam significativamente entre si)

Fêmeas de *H. armigera* produziram as maiores quantidades de ovos quando derivadas de algodão, diferindo dos demais tratamentos pelo teste de separação de médias. A quantidade de ovos depositados por dia também foi afetada significativamente pelo hospediro (F = 4,86; gl = 4, 57; P = 0,0019). Os parâmetros de reprodução em adultos de *H. zea* não foram afetados pelo hospedeiro, como o total de ovos por fêmea (F = 0,890; gl = 4,8; P = 0,3718), número de ovos por dia (F = 1,55; gl = 1,4; P = 0,2798) e porcentagem de eclosão (F = 0,013; gl = 1,6; P = 0,9106) (Tabela 3.9). Fêmeas de *H. zea* depositaram maiores números de ovos por dia, o que compensou a menor longevidade de fêmeas para o número total de ovos. Para *H. armigera*, a eclosão também não foi significativamente em relação ao hospedeiro, tendo os tratamentos não diferido pelo teste de separação de médias (F = 0,303; gl = 1,49; P = 0,8742).

Tabela 3.9 - Comparação dos parâmetros biológicos de *H. zea* em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Parâmetros reprodutivos[1] (± erro padrão) [1]		
	Total de ovos / Fêmea	Ovos dia / Fêmea	% Eclosão
Milheto	425,4 ± 155,3	79,0 ± 14,4	55,0 ± 5,7
Milho	599,0 ± 97,8	103,0 ± 16,9	57,0 ± 12,4

[1] Valores representam médias ± erro padrão. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna. Não houve diferença significativa (teste de t a P≤ 0,05) entre os tratamentos

3.3.1.3 Tabela de vida de *H. armigera* em diferentes hospedeiros

Os resultados dos parâmetros de tabela de vida estimados para *H. armigera* são apresentados nas Tabela 3.10. A taxa liquida de reprodução R_0 variou significativamente de acordo com hospedeiro de alimentação. O maior valor de taxa liquida de reprodução (R_0) foi observado para algodão (194,9 ± 24,4), que foi em média cerca de quatro vezes maior que os demais hospedeiros. Dentre estes, o milho afetou o valor de R_0 negativamente em relação aos demais hospedeiros (17,8 ± 4,32). A maior taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) (0,143 ± 0,003) e de razão finita de aumento populacional (λ) (1,154 ± 0,004) também foi observada para algodão, diferindo significativamente dos demais tratamentos. O tempo médio para uma geração (T) de *H. armigera* foi cerca nove dias menor (36,9 ± 0,4) em algodão comparado com o maior tempo para o desenvolvimento de uma geração em milho (46,3 ± 0,6). Soja e algodão diferiram dos demais tratamentos.

Tabela 3.10 - Parâmetros de crescimento populacional (média ± erro padrão) de *H. armigera* em diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Parâmetros de crescimento populacional [a, b]			
	R_o	r_m	λ	T
Algodão	194,9 ± 24,4 a	0,143 ± 0,003 a	1,154 ± 0,004 a	36,9 ± 0,4 a
Milheto	48,7 ± 7,5 b	0,087 ± 0,003 b	1,09 ± 0,004 b	44,8 ± 0,2 d
Milho	17,8 ± 4,32 c	0,061 ± 0,005 c	1,06 ± 0,004 c	46,3 ± 0,6 e
Soja	46,6 ± 12,3 b	0,097 ± 0,007 b	1,10 ± 0,003 b	39,2 ± 0,3 c
Sorgo	48,9 ± 7,5 b	0,090 ± 0,007 b	1,09 ± 0,003 b	42,1 ± 0,3 b

[a] *Ro* — taxa líquida de reprodução (fêmeas por fêmea por geração); r_m— taxa intrínseca de crescimento populacional (por dia); λ— razão finita de aumento da população e *T*— tempo médio de uma geração (dias)

[b] Valores representam médias ± erro padrão. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna (médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não se diferenciam significativamente entre si)

Os resultados dos parâmetros de tabela de vida estimados para *H. zea* são apresentados na Tabela 3.11. Os dois hospedeiros foram capazes de sustentar *H. zea* até a fase reprodutiva não diferiram para os parâmetros de razão finita de aumento populacional (λ) e tempo médio para uma geração (*T*). No entanto, valores de taxa líquida de reprodução R_0 e taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) em milho foram significativamente maiores quando *H. zea* foi alimentada em milho, diferindo estatisticamente de milheto.

Tabela 3.11 - Parâmetros de crescimento populacional (média ± EP) de *H. zea* em milho e milheto

Hospedeiro	Parâmetros de crecimento populacional [a,b]			
	R_o*	r_m*	λ	T*
Milheto	23,5 ± 5,5	0,067 ± 0,004	1,06 ± 0,005	46,6 ± 0,1
Milho	33,5 ± 5,47	0,075 ± 0,003	1,07 ± 0,005	46,2 ± 0,4

[a] *Ro* — taxa líquida de reprodução (fêmeas por fêmea por geração); r_m— taxa intrínseca de crescimento populacional (por dia); λ— razão finita de aumento da população e *T*— tempo médio de uma geração (dias)

[b] Valores representam médias ± EP. Uma ANOVA foi conduzida entre os tratamentos para cada coluna. *Houve diferença significativa (Teste de *t,* $P \leq 0,05$) entre os valores de *Ro* — taxa líquida de reprodução (fêmeas por fêmea por geração) e r_m— taxa intrínseca de crescimento populacional (por dia)

3.3.1.4 Ocorrência de *Helicoverpa* spp. em diferentes plantas hospedeiras no campo

Foram identificados com sucesso 960 indivíduos oriundos de trinta e seis amostragens realizadas nas safras de 2013/14, 2014/15 e 2015/16. Os resultados das identificações mostraram que ambos os métodos foram eficientes para diferenciação de adultos de *H. armigera* e *H. zea.* No entanto a identificação por meio de parâmetros morfológicos da genitália de adultos se mostrou mais viável economicamente e com resultados mais rápidos em comparação com a identificação molecular (safra 2014/15). No entanto, a eficiência de identificações utilizando parâmetros morfológicos depende da integridade física de amostras recebidas do campo e do laboratório. Outra desvantagem é se basear em estruturas presentes apenas em machos, consequentemente, sendo descartadas cerca de 50% das amostras recebidas (fêmeas). Do total de 989 indivíduos, 596 foram identificados como *H. armigera* (60,3%) e 393 como *H. zea* (39,7%). *H. zea* foi encontrada apenas na cultura do milho, com exceção de um único indivíduo coletado na cultura do algodão e outro na soja (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 - Safra de coleta, cultura, localização e número de indivíduos de *H. armigera* e *H. zea* identificados em cada amostragem

Safra	Cultura	Município	Estado	Espécie	
				H. armigera	*H. zea*
2013/14	Milho	Casa Branca	SP	0	19
	Milho	Cascavel	PR	0	39
	Milho	Jaboticabal	SP	0	46
	Milho	Londrina	PR	0	29
	Milho	Monte Castelhano	RS	1	18
	Milho	Montividiu	GO	4	27
	Milho	Passo Fundo	RS	1	17
	Milho	Piraí do Sul	PR	0	21
	Milho	Uberaba	MG	0	14
	Milho	Uberlândia	MG	0	25
	Milheto	Rosário	BA	60	0
	Algodão	Chapadão do Céu	GO	58	0
	Algodão	Ranchão das Neves	BA	44	0
	Algodão	Rondonópolis	MT	104	1
	Algodão	Sapezal	MT	12	0
	Soja	Chapadão do Sul	MS	46	0
	Soja	Luis Eduardo Magalhães	BA	55	0
	Soja	Primavera do Leste	MT	24	0
	Soja	Rolândia	PR	25	0
	Soja	Ponta Grossa	PR	43	0
2014/15	Algodão	São Desedério	BA	10	0
	Algodão	Correntina	BA	24	0
	Soja	Viradouro	SP	20	0
	Soja	Lucas do Rio Verde	GO	14	0
	Soja	Primavera do Leste	MT	12	0
	Soja	Luiz Eduardo Magalhães	BA	10	1
	Milho	Rio Verde	GO	0	26
	Milho	Ponta Grossa	PR	0	10
2015/16	Milho	Londrina	PR	0	10
	Milho	Montividiu	GO	0	20
	Milho	Conchal	SP	0	10
	Milho	Paranavaí	PR	0	10
	Milho	Conchal	SP	0	10
	Milho	Sumaré	SP	0	10
	Milho	Tamarana	PR	0	10
	Milho	Restinga Seca	RS	0	20

O grande número de indivíduos de *H. zea* identificados foi consequência do maior número de amostragens feitas na cultura do milho durante as três safras (21 amostragens). Outro fator importante foi a uniformidade das infestações de *Helicoverpa* spp. em milho, o que resultou em coletas durante as três safras, ao contrário das menores infestações nas demais culturas. Após os surtos populacionais de *Helicoverpa* spp. durante a safra 2013/14, infestações menos frequentes foram observadas na safra seguinte, principalmente na cultura da soja e algodão, sendo que, na safra 2015/16, nenhuma coleta foi feita devido às baixas infestações (Figuras 3.2, 3.3 e 3.4).

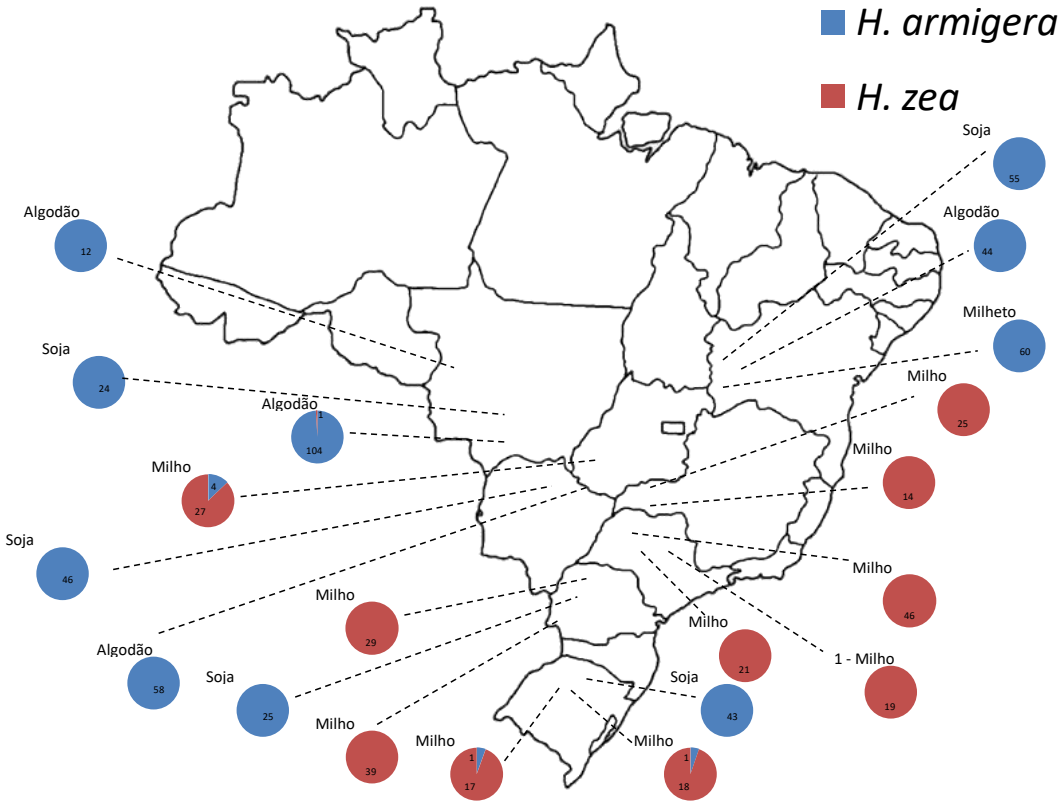

Figura 3.2 - Distribuição geográfica de *H. armigera* e *H. zea* em soja, milho, algodão e milheto na safra de 2013/14

Indivíduos de *H. armigera* foram identificados em amostras de milho, soja, algodão e milheto nas safras 2013/14 e 2014/15. No entanto, dos 596 indivíduos identificados, mais de 80% foram coletados nas culturas da soja e do algodão, e apenas 35 indivíduos (5,9%) em milho. Destes 35 indivíduos de *H. amigera* originados de coletas em milho, 33 foram coletados durante o período de safrinha na região de Primavera do Leste (Mato Grosso) Amostras compostas por grandes números de *H.*

armigera foram identificadas no mesmo município, na cultura da soja, e em área próxima (Rondonópolis-MT) na cultura do algodão. Outra presença não comum foi observada nesta mesma região, onde um indivíduo de *H. zea* foi identificado em algodão em meio a uma amostra de outros 104 indivíduos de *H. armigera.* A amostragem em milheto Oeste da Bahia resultou em grande número de adultos. Dos 60 machos obtidos desta amostragem, todos foram identificados como *H. armigera*.

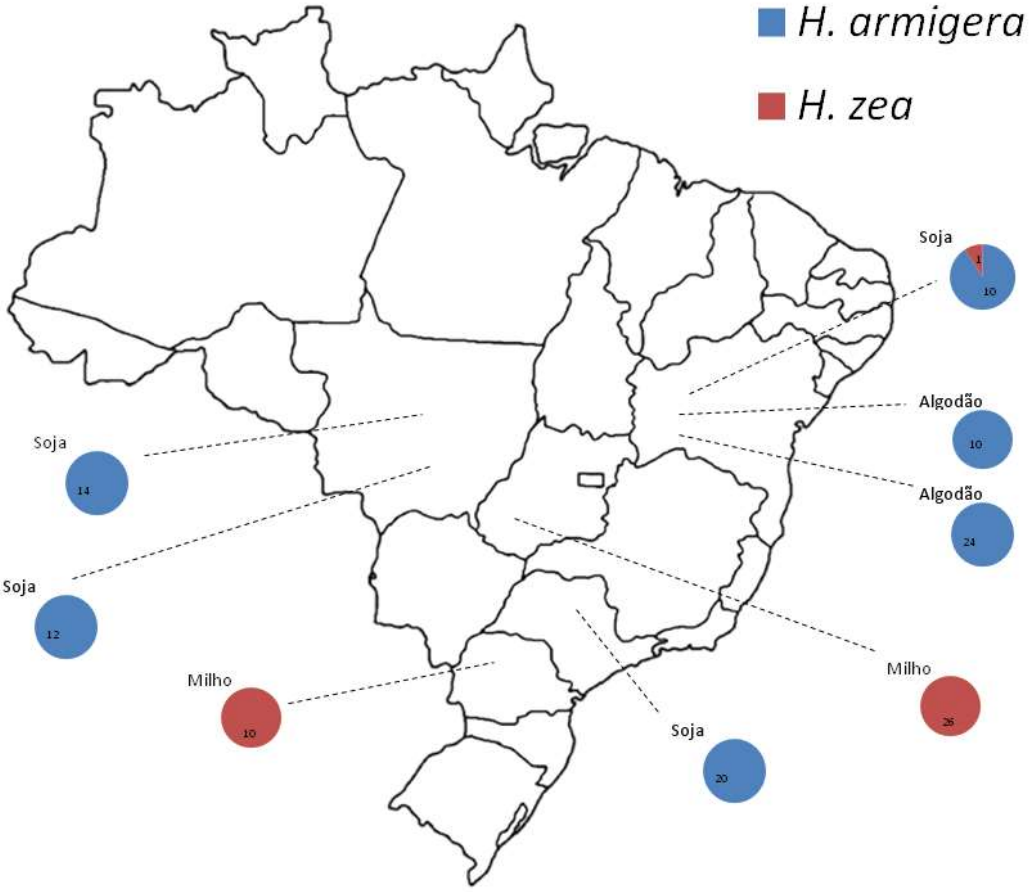

Figura 3.3 - Distribuição geográfica de *H. armigera* e *H. zea* em soja, milho e algodão na safra de 2014/15

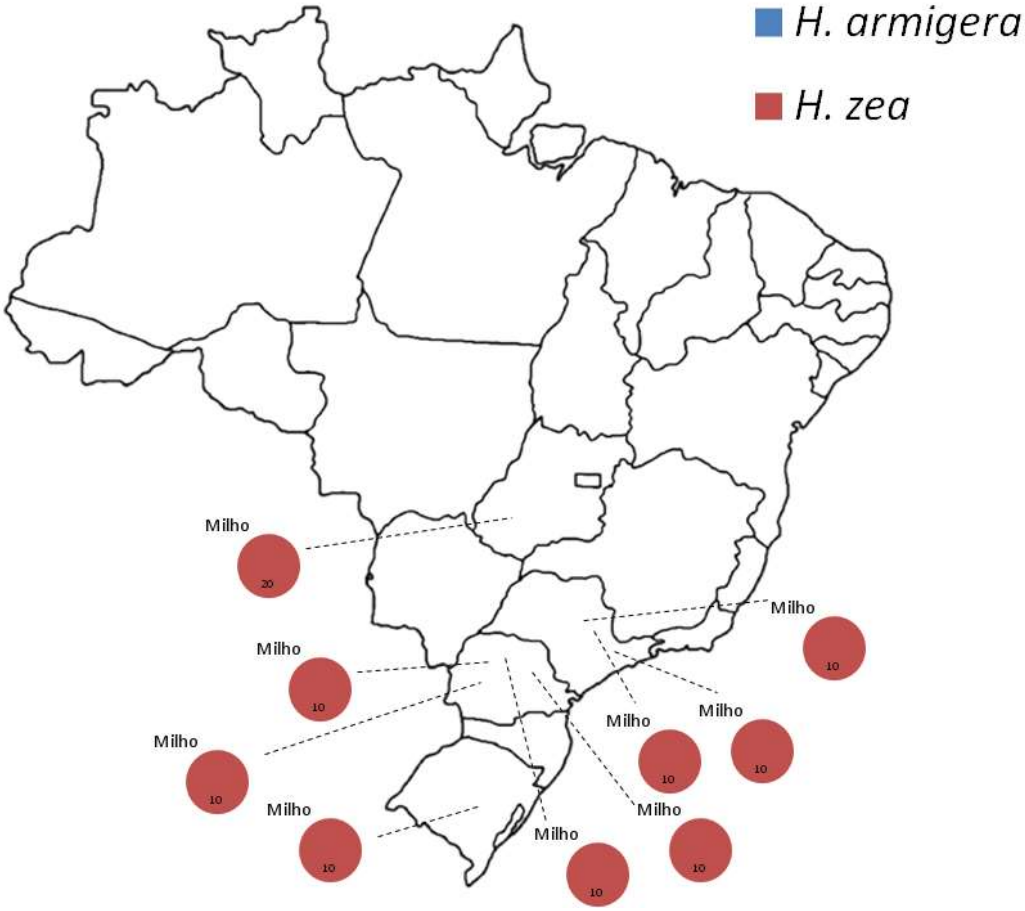

Figura 3.4 Distribuição geográfica de *H. armigera* e *H. zea* em milho safra de 2015/16

3.4 Discussão

No Brasil, culturas geneticamente modificadas têm se tornado ferramenta fundamental para o controle de insetos pragas nas culturas de soja, milho e algodão, sendo a manutenção da suscetibilidade das pragas alvo o principal desafio para o uso sustentável destas tecnologias (CELERES, 2016). Estratégias para manejo da resistência de pragas polífagas a culturas Bt devem ser definidas com base na dinâmica populacional na paisagem agrícola, bem como nos aspectos bioecológicos que definem padrões de migração, dispersão e preferência por determinado hospedeiro (KENNEDY; STORER, 2000). *H. armigera* possui grande similaridade genética e fisiológica com *H. zea*, havendo inclusive compatibilidade de acasalamento em condições de laboratório (TAY et al., 2013; LEITE et al., 2015). Apesar dessas semelhanças, grandes diferenças no grau de polifagia e no uso de hospedeiros distinguem ecologicamente *H. armigera* de *H. zea*. Todas as culturas avaliadas neste estudo são descritas na literatura como hospedeiros naturalmente utilizados por *H.*

armigera (ZALUCKI et al., 1986, 2005) e *H. zea* (BLANCO et al., 2007). No entanto, a presença dos estágios imaturos de insetos em uma determinada planta não necessariamente confirma que esta é um hospedeiro (KITCHING; ZALUCKI, 1983). Esta afirmação pode ser feita caso os imaturos se desenvolvam até a fase adulta, utilizando apenas a planta como alimento, e sejam capazes de se reproduzir (KITCHING; ZALUCKI 1983; ZALUCKI, 1986).

Os resultados demonstram que populações de *H. zea* do Brasil apresentaram baixo grau de polifagia em comparação com populações de outros países do continente americano (NEUNZIG, 1963; STADELBACHER, 1981). Em laboratório, lagartas de *H. zea* não foram capazes de se desenvolver até a fase adulta em plantas dicotiledôneas, soja e algodão, e até mesmo em sorgo (monocotiledônea). A análise das amostras coletadas no Brasil durante três safras corroboramvai com os dados de laboratório, na qual apenas dois indivíduos de *H. zea* foram identificados nas culturas de soja e algodão, sendo a cultura do milho o principal hospedeiro para a espécie em todas as regiões do Brasil (Tabela 3.12). Apesar de reconhecida como polífaga, *H. zea* demonstra preferência por plantas da família Poacea (BERGVINSON 2005). Nos Estados Unidos, foi demostrado, com o uso de isótopos de carbono, que plantas C_3 são as principais fontes de adultos de *H. zea* no início da safra, sendo hospedeiros C_4 (como algodão e soja) menos atrativos durante estes períodos do ano (HEAD et al., 2010). Entretanto, no decorrer da safra, as culturas C_3 (soja e algodão) passam a ser fonte de grande parte dos indivíduos de *H. zea* que formam as populações locais (HEAD et al., 2010). Amostras de *Helicoverpa* spp. foram coletadas na cultura do algodão em épocas de plantio com ausência ou baixa disponibilidade da cultura do milho. A ausência de *H. zea* na maior parte destas amostras e a presença adventícia demonstram que estas culturas não são utilizadas pela espécie como hospedeiros preferenciais. No Brasil, *H. zea* é reconhecida como lagarta da espiga e está associada, na maior parte das ocorrências, à cultura do milho (DEGRANDE; OMOTO, 2013; LEITE et al., 2015).

Diferente de *H.zea*, lagartas de *H. armigera* se desenvolveram até a fase adulta e tiveram êxito em reproduzir em todos os hospedeiros avaliados. Entretanto, parâmetros biológicos de *H. amigera* variaram de acordo com o hospedeiro de alimentação das lagartas. A cultura do algodão foi o hospedeiro mais adequado para o desenvolvimento da espécie, com viabilidade de ovo a adulto acima de 40%. Os valores de viabilidade para os demais hospedeiros não diferiram pelo teste de

separação de médias, com exceção do milho, que apresentou apenas 15% de viabilidade, sendo o hospedeiro menos adequado para *H. armigera*. Os maiores valores de crescimento populacional associados ao menor tempo para o desenvolvimento indicaram maior adequação de algodão para o desenvolvimento de *H. armigera* (VAN LENTEREN; NOLDUS, 1990). Valores similares são reportados na China para a taxa líquida de reprodução (R_0) de *H. armigera* em algodão (117,6) e milho (44.5) (LIU et al., 2004). Outros trabalhos de biologia com populações de *H. armigera* coletadas no Brasil também demosntraram a melhor adapatação da espécie por dicotiledôneas, principalmente as culturas da soja e algodão (REIGADA; GUIMARÃES; PARRA, 2016).

A amostragem de *Helicoverpa* spp. em diferentes hospedeiros no campo confirmaram os resultados obtidos em laboratório, a maior parte das lagartas de *H. armigera* coletada nas culturas de soja, algodão e milheto. Apenas 10% dos indivíduos coletados em milho foram identificados como *H. armigera*. A presença da espécie na cultura do milho foi associada a áreas com plantios de milho safrinha, principalmente na região dos Cerrados, onde foram coletadas essas amostras em Primavera do Leste (MT). Resultados obtidos em laboratório e campo no Brasil demonstraram diferenças entre populações brasileiras e da Austrália, onde sorgo e milho, em particular, são os hospedeiros preferenciais para *H. armigera* em relação ao algodão (JALLOW; ZALUCKI, 1995, 1996). A identificação das amostras de *Helicoverpa* spp. coletadas durante os primeiros surtos de *H. armigera* no Brasil também mostrou a presença de *H. armigera* preferencialmente em culturas dicotiledôneas, e como observado nesse trabalho (LEITE et al., 2014).

Os dados apresentados evidenciam diferenças no uso de hospedeiros entre *H. armigera* e *H. zea* e resultam na necessidade de diferentes abordagens para programas de manejo integrado de pragas, principalmente de estratégias visando o manejo da resistência destas espécies a culturas Bt. Na China, o alto grau de polifagia de *H. armigera* em um mosaico de hospedeiros alternativos tem sido suficiente para gerar indivíduos suscetíveis para o manejo da resistência em áreas de algodão Bt (WU; GUO, 2005; WU; GUO; GAO, 2002; BEHERE et al., 2008). Apesar de se tratar da mesma espécie, no Brasil, a contribuição de hospedeiros alternativos para as populações de *H. armigera* precisa ser mais bem avaliada. A paisagem agrícola do Brasil tem passado por mudanças nas últimas décadas, principalmente, pela

intensificação da agricultura e pela ocupação novas de fronteiras agrícolas nas regiões Centro-Oeste e Norte do país. Como resultado da intensificação de processos agrícolas, pode haver a simplificação da paisagem e a drástica redução da diversidade de hospedeiros cultivados e não cultivados (ROSENHEIM; SEGOLI, 2012). Nestas condições, espécies extremamente polífagas, como *H. armigera,* podem ser funcionalmente monófagas na paisagem. Na safra de 2015/16, a área ocupada por grãos foi de aproximadamente 55 milhões de hectares, sendo 85% da área composta por duas culturas principais, 58% de soja e 27% de milho. Também importante para a composição da paisagem, a produção de algodão concentra-se especialmente nos estados de Mato Grosso e Bahia, que responderam, em 2014/15, por 86,2% da produção do país. Mato Grosso tem a liderança, com 57,4% da produção nacional, seguido pelo estado da Bahia, com 28,8% da produção brasileira (CÉLERES, 2016). Os resultados de tabela de vida e parâmetros de crescimento populacional estimados para *H. armigera* nesse trabalho explicam, em grande parte, os surtos populacionais da praga em regiões produtoras de algodão, como o oeste da Bahia. Economicamente, algodão é a principal cultura que compõe o sistema de produção dessa região. E a cultura da soja, com uma área aproximadamente 3 vezes maior, geralmente é semeada antes da cultura do algodão. Assim, a disposição espacial e temporal destas culturas oferece à praga hospedeiros de alta qualidade e condições para a manutenção de altas populações durante toda a safra.

Nestas condições, as culturas geneticamente modificadas expressando proteínas Bt já ocupam mais de 90% das áreas produtoras de grãos (soja e milho) e fibras no Brasil e tem sido uma ferramenta efetiva dentro do MIP para o manejo de *Helicoverpa* spp. (CELERES, 2016). Caso a presença de *H. armigera* seja intensa nas culturas de soja e algodão, pode haver um maior potencial de acelerar o processo de evolução da resistência a determinadas proteínas Bt caso não sejam cumpridas as estratégias de MRI como a adoção das áreas de refúgio. Contudo, outras práticas de MIP. Por outro lado, a presença esporádica de *H. armigera* em milho reduz a pressão de seleção dessa espécies às proteínas Bt no milho e, consequentemente, o risco de resistência cruzada entre diferentes culturas Bt. Já a *H. zea*, funcionalmente monófaga em ambientes agrícolas, tem a cultura do milho como seu principal hospedeiro na paisagem. Portanto, a alta adoção de milho Bt em todas as regiões do país e a baixa adoção de áreas de refúgio podem acarretar em intenso processo de seleção, com risco de evolução da resistência.

3.5 Conclusões

- As culturas de soja, algodão, milho, milheto e sorgo são potenciais hospedeiros de *H. armigera* na paisagem agrícola, enquanto *H. zea* apresentou viabilidade apenas para cultura de milho e milheto em condições de laboratório.

- *H. zea* apresenta preferencia apenas à cultura do milho em condições de campo, enquanto *H. armigera* apresenta preferência para as culturas de soja, algodão, milheto e sorgo.

Referências

ALBERNAZ, K.C.; SILVA-BRANDAO, K.L.; FRESIA, P.; CONSOLI, F.L.; OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 102, n. 1, p. 333-343, 2012.

BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A.; HECKEL, D.G.; APPLETON, B.R.; KRANTHI, K.R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 117, 2007.

BERGVINSON, D.J.; Heliothis/Helicoverpa problem in the Americas: Biology and Management. In: SHARMA, H.C. (Ed.). **Heliothis/Helicoverpa management:** emerging trends and strategies for future research. Plymouth: Science Publ., 2005. p. 7–37.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. **PLoS One**, Berkeley, v. 10, n. 10, p. e0140130, 2015.

BIANCHI, F.J.J.A.; VAN DER WERF, W. The effect of the area and configuration of hibernation sites on the control of aphids by *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in agricultural landscapes: a simulation study. **Environmental Entomology**, Linthicum, v. 32, n. 1, p. 1290–1304, 2003.

BIANCHI, F.J.J.A.; BOOIJ, C.J.H.; TSCHARNTKE, T. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. **Proceedings of the Royal Society. B: Biological Sciences**, London, v. 273, n. 1, p. 1715–1727, 2006.

BLANCO, C.A.; ANDOW, D.A,; ABEL, C.A.; SUMERFORD, D.V.; HERNANDEZ, G.; LÓPEZ, J.D. J.R.; ADAMS, L.; GROOT, A.; LEONARD, R.; PARKER, R.; PAYNE, G.; PERERA, O.P.; TERÁN-VARGAS, A.P.; AZUARA-DOMÍNGUEZ, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance frequency in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 1, p. 381-387, 2009.

BRAMBILLA, J. **Instructions for dissecting male genitalia of Helicoverpa (Lepidoptera: Noctuidae) to separate *H. zea* from *H. armigera*.** 2009. 16 p. Disponível em: <https://caps.ceris.purdue.edu/screening/h_armigera_vs_h_zea_dissect_instruction>. Acesso em: 01 ago. 2014.

CÉLERES. **Informativo biotecnologia:** IB16.01. Disponível em: http://www.celeres.com.br/1o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/ Acesso em: 30 ago 2016.

CTNBIO. **Aprovações comerciais.** Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>. Acesso em: 20 ago. 2016.

CUNNINGHAM, J.P.; ZALUCKI, M.P. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 3, p. 881-896, 2014.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n. 1, p.110-113, 2013.

DEGRANDE, E.; OMOTO, C. Estancar prejuízos. Revista Cultivar, abril 2013. **Cultivar Grandes Culturas**, p. 32–35.

DOMINGUES, F.A.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; ABREU, A,G.; PERERA, O.P.; BLANCO, C.A. Genetic structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 1, p. 2136–2146, 2012.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, n. 1, p. 150-158, 2014.

FITT, G.P. The ecology of Heliothis species in relation to agroecossystems. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 17-52, 1989.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Cambridge, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

GORE, J.; LEONARD, B.R.; CHURCH, C.E.; COOK, D.R. Behavior of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on genetically engineered cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 1, p. 763–769, 2002.

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

HEAD, G.; JACKSON, R.E.; ADAMCZYK, J.; BRADLEY, J.R.; VAN DUYN, J. Spatial and temporal variability in host use by *Helicoverpa zea* as measured by analyses of sTabela carbon isotope ratios and gossypol residues. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 583–592, 2010.

HUANG, F.; ANDOW, D.A.; BUSCHMAN, L.L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 1-16, 2011.

JALLOW, M.F.A.; ZALUCKI, M.P. A technique for measuring intra-speciÞc variation in oviposition preference of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Australian Journal of Entomology**, Queensland, v. 34, n. 1, p. 281-288, 1995.

JALLOW, M.F.A.; ZALUCKI, M.P. Within and between- population variation in host-plant preference and specificity in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Australian Journal Zoology**, Queensland, v. 44, n. 1, p. 503-519, 1996.

KASTEN, P.J.R.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura,** Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 69–78, 1978.

KENNEDY, G.G,; STORER, N.P. Life systems of polyphagous arthropod pests in temporally unsTabela cropping systems**. Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 467–493, 2000.

KITCHING, R.L.; ZALUCKI, M.P. A cautionary note on the use of oviposition records as host plant records. **Australian Entomology**, Queensland, v.10, n. 1, p. 64–66, 1983.

KOGAN, M.; HELM, C.G.; KOGAN, J.; BREWER, E. Distribution and economic importance of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* in North, Central, and South America and of their natural enemies and host plants. In: WORKSHOP ON BIOLOGICAL CONTROL OF HELIOTHIS: INCREASING EFFECTIVENESS OF NATURAL ENEMIES, 1989, New Delhi. **Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis,** New Delhi: USDA, Far Eastern Regional Research Office, 1989. p. 241-297.

KRITICOS, D.J.; OTA, N.; HUTCHISON, W.D.; BEDDOW, J.; WALSH, T.; TAY, W.T. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? **PLoS One**, Berkeley, v.10, n. 3, p. e0119618, 2015.

LEITE N.AP.; ZUCCHI M.I.; OMOTO C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS One**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e113286, 2014.

LIU, Y.L.; SALZMAN, R.A., PANKIW, T.; ZHU-SALZMAN, K. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Riverside, v. 34, n. 1, p. 1069–1077, 2004.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA FILHO, M.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n.1, p. 519-526, 2006.

MARTINELLI, S.; CLARK, P.L.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; FOSTER, J.E.; OMOTO, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 97, n. 1, p. 225–231, 2007.

MATSON, P.A.; PARTON, W.J.; POWER, A.G.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification and ecosystem properties. **Science,** Washington, v. 277, n. 1, p. 504–509, 1997.

MITTER, C.; POOLE, R.W.; MATTHEWS, M. Biosystematics of the Heliothinae (Lepidoptera:Noctuidae). **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, n. 1, p. 207–225, 1993.

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L.; FLANDERS, K.; GORE, J.; JACKSON, R. Using haplotypes to monitor the migration of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas and Florida. **Journal of Economic Entomology,** Lanham, v. 101, n. 1, p. 742–749, 2008.

NEUNZIG, H.H. Wild host plants of the corn earworm and the tobacco budworm in eastern North Carolina. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 56, n. 1, p. 135–39, 1963.

NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **Detection of old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico.** Phytosanitary Alert System Official Pest Report. 2014. Disponível em: <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID/600>. Acesso em: 05 ago. 2015.

OMOTO, C.; BERNARDI O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.A.; WILLSE, A.; MARTINELLI S.; HEAD, G.P.Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Susex, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.

OERTEL, A.; ZALUCKI, M.P.; MAELZER, D.A.; FITT, G.P.; SUTHERST, R. Size of the first spring generation of *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) and winter rain in central Australia. **Australian Journal of Entomology,** Queensland, v. 38, p. 99–103, 1999.

PASHLEY, D.P. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm. **Evolution,** Cambridge, v. 42, p. 93-102, 1988.

POGUE, M.G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

SEGOLI, M.; ROSENHEIM, J.A. Should increasing the field size of monocultural crops be expected to exacerbate pest damage? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 38–44, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S.V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, A.C.; MICHELI, A.; MORAIS, G.F.; GALLO, P.; PEREIRA, V.S.; SALVADORI, J.R.; BOTTON, M.; ZENKER, M.; AZEVEDO-FILHO, W.S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 101-104, 2015.

SPECHT, A.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PAULA-MORAES, S.V.; YANO, S.A. Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, p. 689–692, 2013.

STADELBACHER, E.A. Role of early season wild and naturalized host plants in the build-up of the F1 generation of *Heliothis zea* and *H. virescens* in the delta of Mississippi. **Environmental Entomology**, College Park, v.10, n. 1, p. 776–770, 1981.

TABASHNIK, B.E.; GOULD, F.; CARRIÈRE, Y. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. **Journal of Evolutionary Biology**, Centre, v. 17, n. 1, p. 904–912, 2004.

TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One,** Berkeley, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013.

VAN LENTEREN, J.C.; NOLDUS, J.J. Whitey plant relationship: behavioral and ecological aspects. In: GERLING, D. (Ed.). **Whitey:** their bionomics, pest status and management. Andover: Intercept, 1990. p. 47-89.

WALTER, G.H.; BENFIELD, M.D. Temporal host plant use in three polyphagous Heliothinae, with special reference to *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Noctuidae: Lepidoptera). **Australian Journal of Ecology**, Queensland, v. 19, n. 1, p. 458–465, 1994.

WU, K.; GUO, Y.; GAO, S. Evaluation of the natural refuge function for *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) within *Bacillus thuringiensis* transgenic cotton growing areas in north China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 4, p. 832-837, 2002.

WU, K.M.; GUO, Y.Y. The evolution of cotton pest management practices in China. **Annual Review of Entomology**, Palo alto, v. 50, n. 1, p. 31-52, 2005.

ZALUCKI, M.P.; FURLONG, M.J. Forecasting Helicoverpa populations in Australia: a comparison of regression based models and a bioclimatic based modelling approach. **Insect Science**, Malden, v. 12, n. 1, p. 45-56, 2005.

ZALUCKI, M.; DAGLISH, G.; FIREMPONG, S.; TWINE, P. The biology and ecology of *Heliothis-armigera* (Hubner) and *Heliothis-punctigera* Wallengren (Lepidoptera, Noctuidae) in Australia: what do we know. **Australian Journal of Zoology**, Queensland, v. 34, n. 6, p. 779-814, 1986.

4 DISCUSSÃO GERAL

A introdução de *H. armigera* no Brasil estimulou debates de diferentes partes da sociedade sobre conceitos básicos de Manejo Integrado de Pragas (MIP) e, por, consequência, sobre o manejo da resistência de insetos (MRI) a culturas Bt e inseticidas. A repercursão do tema dentro da mídia convencional e, principalmente, no meio agrícola foi impulsionada, em parte, pelos impactos econômicos causados pelas altas infestações da praga principalmente na cultura da soja e algodão, com perdas estimadas em mais de um bilhão de dólares (MAPA, 2015). Entretanto, a falta de informações básicas necessárias para a estruturação de qualquer programa de MIP também pode ser um dos principais fatores para a repercursão do tema. Em resposta a este cenário, a científica tem contribuído com diversas publicações sobre ferramentas para auxiliar a identificação de espécies do gênero Helicoverpa, estrutura genética e perspectivas de expansão da espécie no continente americano (CZEPAK et al., 2013; SPECH et al., 2013; TAY et al., 2013; MASTRANGELO et al., 2014; LEITE et al., 2014; MORÚA et al., 2014; SENAVE, 2014; SOSA-GÓMEZ et al., 2016).

As informações apresentadas nesta análise de risco incrementam base de dados e podem contribuir para implementar programas de manejo integrado de *Helicoverpa* spp. mais assertivo. Importantes aspectos bioecológicos de *H. armigera* e *H.zea* em paisagens agrícolas podem ser discutidos com base nos resultados apresentados sobre o uso de hospedeiros no campo, bem como o potencial impacto de cada hospedeiro para a composição de populações na paisagem. Os resultados de laboratório apresentados confirmam os altos níveis de polifagia de *H. armigera* reportados em todo o mundo. Apesar da espécie ter grande variedade de culturas como potenciais hospedeirostem maior capacidade de aumento populacional quando alimentada com a cultura do algodão. Outros aspectos a serem mencionados são a grande incidência de *H. armigera* em algodão e soja, principalmente, e a presença esporádica na cultura de milho. A melhor adaptação e a preferência de *H. armigera* por essas culturas podem resultar em explosões populacionais em determinadas regiões, que, além de causarem danos regionais, também são fontes de indivíduos que irão invadir outros ambientes.

O Brasil apresenta histórico recente no uso de culturas transgênicas para o controle de insetos em comparação com outros países, como os Estados Unidos, que já utilizam estas tecnologias desde 1996 (CTNBIO, 2016). A expressão de

proteínas inseticidas em culturas por transgenia traz uma nova abordagem à resistência de plantas a insetos. Culturas Bt possuem altos níveis de resistência a inseto e quando predominam na paisagem temporal e espacialmente, como vem ocorrendo no Brasil, deixam de exercer o papel de principal multiplicador para a população e passa a ter uma função de cultura armadilha. Ocupando mais de 30 milhões de hectares, a cultura da soja teria o potencial de se tornar a principal fonte de pragas presentes na paisagem agrícola. Entretanto, a alta eficácia da soja MON 87701 × MON 89788 contra *H. armigera* e sua rápida adoção pelos agricultores pode reduzir drasticamente o tamanho populacional desta espécie na paisagem. Este efeito foi observado na China, onde altos níveis de supressão populacional de *H. armigera* na paisagem foram observados em decorrência do aumento da adoção de algodão Bt, o que acabou resultando em redução de pressão populacional da espécie em culturas não-Bt (WU et al., 2008). Apesar de polífagas, a maioria das espécies apresenta preferência por determinados hospedeiros e tem nestes a principal fonte de indivíduos que compõem uma população. Nos Estados Unidos, a broca européia do milho *Ostrinia nubilalis* (Hübner) está associada a mais de 200 espécies vegetais; no entanto, a praga tem o milho como o principal hospedeiro na paisagem (MASON et al., 1996). Neste caso, a introdução de milho Bt resultou em drástica redução populacional, gerando benefícios para áreas de milho não-Bt e ainda para outras culturas que compõem a paisagem (HUTCHISON et al., 2010).

Apesar de todos os benefícios, a alta adoção de culturas geneticamente modificadas expressando proteínas Bt nestas paisagens tem resultado em intenso processo de seleção e evolução de populações resistentes (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011; FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2015). Em muitos casos, diversos fatores se somam para o insucesso da manutenção da suscetibilidade de insetos a culturas Bt; no entanto, a ausência de hospedeiros não-Bt, que contribuam para a diluição dos alelos de resistência, e a sobrevivência total ou parcial do heterozigoto são apontados como as principais causas (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013; FARIAS et al., 2014). O Brasil é o único país do mundo que utiliza em larga escala soja, milho e algodão Bt para o controle de pragas. Este cenário traz desafios adicionais para o manejo da resistência de insetos, por reduzir a fonte de hospedeiros não-Bt para geração de indivíduos suscetíveis, de acordo com o aumento da adoção das tecnologias, e aumentando o número de gerações da praga sob pressão de seleção a determinadas proteínas Bt presentes em mais de uma cultura.

Um bom exemplo da resistência de uma espécie a uma cultura impactar outra cultura Bt ocorreu nos Estados Unidos e no Brasil, onde a eficácia de eventos de algodão Bt que expressam proteínas Cry1 foi afetada pela seleção da resistência de *S. frugiperda* em milho Bt expressando a mesma proteína, Cry1F (YANG et al., 2016; HORIKOSHI, 2016).

Dadas a extensão das áreas de soja no Brasil e as projeções no aumento da adoção da tecnologia de soja MON 87701 × MON 89788, espera-se um crescente e intenso processo de seleção e risco para evolução da resistência em populações de *H. armigera* e de outras espécies-alvo da tecnologia (GOULD, 1998; BERNARDI et al., 2012, 2014). Dentre as estratégias de manejo da resistência de insetos à culturas Bt, a estratégia de alta dose/refúgio, têm se mostrado eficiente na manutenção da suscetibilidade de pragas às culturas Bt em situações de: expressão de altas concentrações de proteína e de alta mortalidade na população de espécies-alvo (≥99,99%), fazendo com que a resistência seja funcionalmente recessiva; baixa frequência inicial de alelos que conferem resistência; e disponibilidade de refúgios não-Bt em quantidade e distâncias apropriadas (TABASHNIK; BREVAULT; CARRIERE, 2013; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIERE, 2009). Os parâmetros toxicológicos da soja MON 87701 × MON 89788 bem como a baixa frequência inicial de alelos que conferem resistência em populações de *H. armigera* do Brasil, indicam que, apesar do alto risco imposto pelo cenário, o uso da tecnologia, associado ao plantio de áreas de refúgio, pode retardar a evolução da resistência no Brasil. Adicionalmente, a manutenção de áreas de refúgio na cultura do algodão será igualmente importante para reduzir a pressão de seleção sobre o grupo de *H. armigera* à proteínas Cry1, presentes em ambas as culturas. Em longo prazo, o desenvolvimento de novas tecnologias que expressam mais de uma proteína Bt, com mecanismos de ação distintos dentro de cada cultura, pode auxiliar o manejo da resistência de pragas como *H. armigera*.

Referências

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**, Susex, v. 70, n. 4, p. 588-594, Apr. 2014.

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 gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science,** Susex, v. 68, n. 7, p. 1083-1091, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produtos de combate à *Helicoveroa armigera* têm seu uso prorrogado**. 2015. Disponivel em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/produtos-de-combate-a-helicoverpa-armigera-tem-seu-uso-prorrogado>. Acesso em: 28 jul. 2015.

CZEPAK, C; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

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

HORIKOSHI, R.J. **Dominância funcional e monitoramento da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a tecnologias Bt no Brasil.** 2016. 79 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

HUTCHISON, W.; BURKNESS, E.; MITCHELL, P.; MOON, R.; LESLIE, T. Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science**, Washington, v. 330, n. 1, p. 222–225, 2010.

LEITE, N.A.; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I.; OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS One**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e113286, 2014.

MASON, C.E.; RICE, M.E.; CALVIN, D.D.; VAN DUYN, J.W.; SHOWERS, W.B.; HUTCHISON, W.D.; WITKOWSKI, J.F.; HIGGINS, R.A. ONSTAD, D.W.; DIVELY, G.P. **European corn borer:** ecology and management. Ames: State University, 1996. 48 p. (Bulletin, NC-327).

MASTRANGELO, T.; PAULO, D.F.; BERGAMO, L.W.; MORAIS, E.G.F.; SILVA, M.; BEZERRA-SILVA, G.; AZEREDO-ESPIN, A. Detection and genetic diversity of a *Heliothine invader* (Lepidoptera: Noctuidae) from North and Northeast of Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 3, p. 970-980, 2014.

MURÚA, M.G.; SCALORA, F.S.; NAVARRO, F.R.; CAZADO, L.E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M.E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist**, Miami, v. 97, n. 1, p. 854–856, 2014.

REIGADA, C.; GUIMARÃES, K.F.; PARRA, J.R. Relative fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seven host plants: a perspective for IPM in Brazil. **Journal of Insect Science**, Tucson, v.16, n. 1, p. 1–5, 2016.

SENAVE. Alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola. **ABC Color**, Oct. 2013. Disponível em: <http://www.abc.com.py/edicion-impresa/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html>. Acesso em: 20 ago. 2016.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S.V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, A.C.; MICHELI, A.; MORAIS, G.F.; GALLO, P.; PEREIRA, V.S.; SALVADORI, J.R.; BOTTON, M.; ZENKER, M.; AZEVEDO-FILHO, W.S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 101-104, 2015.

SPECHT, A.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PAULA-MORAES, S.V.; YANO, S.A. Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Sete Lagoas, v. 48, p. 689–692, 2013.

TABASHNIK, B.E.; BREVAULT, T.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 6, p. 510-521, 2013.

TABASHNIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.; CARRIERE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 6, p. 2011-25, 2009.

TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, Berkeley, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013.

WU, K.M.; LU, Y.H.; FENG, H.Q.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. **Science,** New York, v. 321, n. 5896, p. 1676-1678, 2008.

YANG, F.; KERNS, D.L.; BROWN, S. Performance and cross-crop resistance of Cry1F-maize selected *Spodoptera frugiperda* on transgenic Bt cotton: implications for resistance management. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 1, p. 28059, 2016.