**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Dominância funcional e monitoramento da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a tecnologias Bt no Brasil

Renato Jun Horikoshi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2016**

Renato Jun Horikoshi
Engenheiro Agrônomo

Dominância funcional e monitoramento da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a tecnologias Bt no Brasil

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2016

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

Horikoshi, Renato Jun

Dominância funcional e monitoramento da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a tecnologias Bt no Brasil / Renato Jun Horikoshi. - - Piracicaba, 2016.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Lagarta-do-cartucho 2. Milho Bt 3. Algodão Bt 4. Manejo da resistência a insetos
I. Título

CDD 632.78
H811d

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

Aos meus pais Shinsaku Horikoshi e Felicia Reiko Horikoshi pelo incentivo e apoio em minha formação pessoal e profissional.

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação, ensinamentos, confiança, amizade e oportunidade para realização deste trabalho.

A Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pelos conhecimentos adquiridos.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP), em especial, Mariana Regina Durigan, Oderlei Bernardi, Daniel Bernardi e Daniela Miyuki Okuma pelo convívio, companheirismo e ajuda na condução dos trabalhos.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP): Juliano Ricardo Farias, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Anderson Bolzan, Rogério Machado, Natália Alves Leite, Dayana Rosalina de Souza, Douglas Amado, Felipe Antônio Domingues, Osmar Arias, Patrick Marques Dourado, Rodrigo José Sorgatto, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva, Alex Sandro Poltronieri, Everaldo Batista Alves, José Bruno Malaquias, Rebeca da Silva Ribeiro, Dariane Sagasetta de Oliveira Souza, Pablo Fresia Coronel e Danielle Thomazoni pelo convívio, companheirismo e auxílios prestados.

Às funcionárias do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP), Eloisa Salmeron e Gislaine Aparecida Amâncio de Oliveira Campos, pelo convívio agradável e auxílios prestados.

Aos estagiários Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral, Leonardo Libardi Miraldo e Sandy Spinelí Silva pelo convívio, companheirismo e ajuda na condução dos trabalhos.

Aos estagiários que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP): Aline Pereira da Silva, Amanda Lemes, Renan Souza, Rodrigo Andrade Franciscatti, Mariana Valentin, Alessandra Tokarski, Fernando Amaral, Leonardo Miraldo, Alexandre Colli, Mariana Vicente, Guilherme Andrade Picarelli, Guilherme Giordano Paranhos, Luiz Victor Perazolo, Marcelo Mocheti, Suellen Campos, João Victor, Juliana Rodrigues, Mariana Colli, Natasha Umezu pelo convívio e companheirismo no laboratório.

À minha família, em especial aos meus pais Shinsaku e Felícia e ao meu irmão Humberto, pelo apoio e contribuição para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos com quem morei em Piracicaba: Odimar Zanuzo Zanardi e Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, pelo convívio agradável, apoio em todos os momentos, companheirismo e incentivo.

A todos os amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP) pelo agradável convívio e companheirismo.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela dedicação e aos serviços prestados.

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

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências	16
2 DOMINÂNCIA FUNCIONAL DA RESISTÊNCIA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A TECNOLOGIAS DE MILHO E ALGODÃO Bt: IMPLICAÇÕES PARA A EVOLUÇÃO E MANEJO DA RESISTÊNCIA	23
Resumo.....	23
Abstract	23
2.1 Introdução.....	24
2.2 Material e Métodos	26
2.2.1 Linhagens de <i>S. frugiperda</i>	26
2.2.1.1 Linhagem suscetível	26
2.2.1.2 Linhagem resistente ao milho Herculex®	26
2.2.1.3 Linhagens resistentes ao milho YieldGard VT PRO™ ao milho PowerCore™	27
2.2.1.4 Linhagem resistente ao milho Agrisure Viptera™	27
2.2.2 Plantas Bt.....	27
2.2.3 Bioensaios.....	28
2.2.4 Análise estatística.....	29
2.3 Resultados.....	29
2.3.1 Sobrevivência de linhagens de <i>S. frugiperda</i> em tecnologias de milho Bt	29
2.3 Sobrevivência de linhagens de <i>S. frugiperda</i> em tecnologias de algodão Bt.....	33
2.4 Discussão	37
2.5 Conclusão	40
Referências	40
3 MONITORAMENTO PRÁTICO DA RESISTÊNCIA A PLANTAS Bt EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	46
Resumo.....	46
Abstract	46
3.1 Introdução.....	47
3.2 Material e métodos.....	48
3.2.1 Populações de <i>S. frugiperda</i>	48
3.2.2 Plantas Bt.....	49

3.2.3 Bioensaios.....	50
3.2.4 Análise estatística.....	50
3.3 Resultados.....	51
3.3.1 Sobrevivência de <i>S. frugiperda</i> em tecnologias de milho Bt.....	51
3.3.2 Sobrevivência de <i>S. frugiperda</i> em tecnologias de algodão Bt	53
3.4 Discussão	55
3.5 Conclusões.....	59
Referências	59
4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE F ₁ SCREEN PARA O MONITORAMENTO DA FREQUÊNCIA DE ALELOS DA RESISTÊNCIA A VIP3Aa20 EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL	65
Resumo.....	65
Abstract	65
4.1 Introdução.....	66
4.2 Material e Métodos	68
4.2.1 Seleção e manutenção da população resistente.....	68
4.2.2 Estabelecimento de isofamílias para o F ₁ screen	68
4.2.3 Bioensaios.....	70
4.2.4 Análise estatística.....	71
4.3 Resultados.....	72
4.4 Discussão	73
4.5 Conclusões.....	75
Referências	76

RESUMO

Dominância funcional e monitoramento da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a tecnologias Bt no Brasil

Plantas transgênicas que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) têm sido amplamente utilizadas para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) no Brasil. Entretanto, a evolução da resistência é um dos maiores entraves para a continuidade do uso desta tecnologia. Para subsidiar programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI), foram conduzidos estudos para o aprimoramento dos programas de manejo da resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt. Foram realizados estudos para determinar a dominância funcional da resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt mediante a avaliação da sobrevivência de larvas neonatas provenientes das linhagens de *S. frugiperda* resistentes ao milho Herculex[®] que expressa a proteína Cry1F (HX-R), ao milho YieldGard VT PRO[™] que expressa as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT-R), ao milho PowerCore[™] que expressa as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F (PW-R), e ao milho Agrisure Viptera[™] que expressa a proteína Vip3Aa20 (Vip-R), além da linhagem suscetível (Sus) e de suas respectivas linhagens heterozigotas em diversas tecnologias de milho e algodão Bt. Posteriormente, um método prático para o monitoramento fenotípico da suscetibilidade a diferentes tecnologias de milho e algodão Bt foi testado a partir da avaliação da sobrevivência de larvas neonatas em folhas de plantas Bt em populações de *S. frugiperda* provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás e Bahia na safra agrícola 2014/15. E por último, a estimativa da frequência de alelos de resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 foi validada pelo método de F₁ screen. Em geral, observou-se alta mortalidade dos heterozigotos nas tecnologias Bt testadas, comprovando que a resistência de *S. frugiperda* a proteínas Bt é funcionalmente recessiva o que suporta a estratégia de refúgio em programas de MRI. Verificou-se também que linhagens resistentes a eventos que expressam proteínas Cry não sobrevivem em tecnologias que expressam proteína Vip. No monitoramento prático da suscetibilidade a tecnologias Bt, sobrevivência larval superior a 70% foi observada para populações de campo do Paraná, Goiás e Bahia no milho Herculex[®]. Em tecnologias de milho PowerCore[™] e YieldGard VT PRO[™] houve sobrevivência larval variando de 1,1 a 17,9%. Em contraste, não houve sobreviventes em tecnologias de milho Viptera[™]. Em algodão WideStrike[®] que expressa as proteínas Cry1Ac e Cry1F, sobrevivência acima de 41% foi observada para populações de campo de *S. frugiperda*. A sobrevivência larval em Bollgard II[®] que expressa as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 variou de 14 a 40%. No algodão TwinLink[®] que expressa as proteínas Cry1Ab e Cry2Ae, a sobrevivência larval das populações foi menor que 20%. O método de F₁ screen foi eficiente na detecção de alelos de resistência a Vip3Aa20 em populações de *S. frugiperda* provenientes de diferentes regiões produtoras de milho no Brasil na safra 2014/2015. De 263 isofamílias testadas, foram detectadas três isofamílias positivas oriundas do Paraná, Mato Grosso e Goiás. A frequência de resistência estimada a Vip3Aa20 variou de 0,0140 a 0,0367 nas populações avaliadas, sendo que a frequência total foi de 0,0076. Neste estudo, fornecemos informações para refinar as estratégias de MRI, além de introduzir novas técnicas para monitorar a resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Milho Bt; Algodão Bt; Manejo da resistência a insetos

ABSTRACT

Functional dominance and monitoring of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Bt technologies in Brazil

Transgenic plants expressing toxins from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) have been widely used to the control of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) in Brazil. However, the resistance evolution is one of the major threats to the continuous use of this technology. To subsidize Insect Resistance Management (IRM), studies were conducted to improve *S. frugiperda* resistance management programs to Bt technologies. Studies to determine functional dominance of resistance of *S. frugiperda* to Bt technologies were conducted by evaluating neonate larval survival of *S. frugiperda* strains resistant to Herculex[®] maize expressing Cry1F protein (HX-R), to YieldGard VT PRO[™] maize expressing Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins (VT-R), to PowerCore[™] maize expressing Cry1A.105, Cry2Ab2 and Cry1F proteins (PW-R) and to Agrisure Viptera[™] maize expressing Vip3Aa20 protein (Vip-R), in addition to susceptible strain (Sus) and the respective heterozygous strains in several Bt maize and cotton technologies cultivated in Brazil. Then, a practical method for phenotypic resistance monitoring of several Bt maize and cotton were tested, based on neonate larval survival on Bt leaf tissue in *S. frugiperda* populations collected from Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás and Bahia States. Finally, the F₁ screen method was validated to estimate the frequency of Vip3Aa20 resistance alleles in *S. frugiperda*. In general, high mortality of heterozygous individuals was observed on Bt technologies, confirming that resistance of *S. frugiperda* to Bt proteins is functionally recessive and supporting the importance of refuge areas in IRM programs. No larval survival on Vip expressing maize was found with strains of *S. frugiperda* resistant to maize expressing Cry toxins. In the practical resistance monitoring, more than 70% of larval survival in field populations of *S. frugiperda* from Paraná, Goiás and Bahia was detected in Herculex[®] maize. Larval survival on PowerCore[™] and YieldGard VT PRO[™] maize technologies ranged from 1.1 to 17.9%. In contrast, no larval survival of field populations was observed on Viptera[™] maize technologies. On WideStrike[®] cotton, more than 41% larval survival was observed in field populations of *S. frugiperda*. The larval survival was on Bollgard II[®] ranged from 14 to 40%. In TwinLink[®] the larval survival was lower than 20%. The F₁ screen method was efficient in detecting Vip3Aa20 resistance alleles in field populations of *S. frugiperda*. From a total of 263 isofamily lines tested, three positive isofamily lines from Paraná, Mato Grosso and Goiás were found. The frequency of Vip3Aa20 resistance alleles ranged from 0.0140 to 0.0367, with overall frequency of 0.0076. In this study, we provide valuable information to improve IRM strategies and propose new methods to monitor resistance of *S. frugiperda* to Bt technologies in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Bt maize; Bt cotton; Insect resistance management

1 INTRODUÇÃO

Plantas transgênicas que expressam proteínas inseticidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) têm sido amplamente utilizadas para o controle de insetos-praga no mundo (TABASHNIK; BREVAULT; CARRIÈRE, 2013). No Brasil, as plantas transgênicas Bt começaram a ser liberadas em 2005, com a aprovação comercial do algodão, *Gossypium hirsutum* L. que expressa a proteína Cry1Ac (CTNBIO; 2005). Inicialmente, as plantas liberadas expressavam uma única proteína Bt, entretanto, a partir de 2009, ocorreu a liberação comercial de algodão e milho, *Zea mays* L. que expressam duas ou mais proteínas Bt (CTNBIO, 2009). Entre os inúmeros benefícios desta tecnologia estão: o controle eficiente de algumas pragas-alvo e, conseqüentemente, maior retorno econômico (CARPENTER, 2010; HUTCHISON et al., 2010; EDGERTON et al., 2012; KATHAGE; QAIM, 2012); redução no uso de inseticidas (KOUSER; QAIM, 2011; KLÜMPER; QAIM, 2014), e a preservação de inimigos naturais (LU et al., 2012; COMAS et al., 2014). A área plantada com culturas Bt foi de aproximadamente 78,8 milhões de hectares no mundo em 2014 (JAMES, 2014). No Brasil, durante a safra 2014-2015, a área total cultivada com tecnologias de plantas Bt foi de 18,5 milhões de hectares, dos quais o milho Bt foi cultivado em aproximadamente 80% da área total ocupada por essa cultura, e o algodão Bt em 40% da área total de algodão (CÉLERES, 2015)

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga encontrada desde o Sul da América do Sul, como Uruguai e a Argentina, até ao sul dos Estados Unidos da América (EUA) (SPARKS, 1979; ASHLEY et al., 1989; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Trata-se do principal inseto-praga do milho nas América do Sul e Central (POGUE, 2002). Além do milho, no Brasil tem sido relatada também como uma das principais espécies desfolhadores do algodão (MARTINELLI et al., 2006). Alguns aspectos bioecológicos desta espécie e particularidades do sistema de produção de cultivos, tais como (i) polifagia (PASHLEY, 1988; NAGOSHI et al., 2007; NAGOSHI et al., 2015), (ii) elevada capacidade reprodutiva e dispersão de adultos (NAGOSHI; MEAGHER, 2008; NAGOSHI et al., 2015), (iii) múltiplas gerações por ano (FITT et al., 2006; FARIAS et al., 2014) (iv) sobreposição de cultivos de plantas hospedeiras (MARTINELLI et al., 2006; MARTINELLI et al., 2007; STORER et al., 2012), favorecem a ocorrência de severas infestações em qualquer época de cultivo e estágio fenológico do milho e algodão (FARIAS et al., 2014; BERNARDI, O. et al., 2015a).

O uso de tecnologias de milho e algodão que expressam proteínas Bt tem sido eficiente no controle de *S. frugiperda* (OKUMURA et al., 2013; WAQUIL et al., 2013; BERNARDI, O. et al., 2015a; SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015). Apesar da disponibilidade de diversas tecnologias de milho e algodão Bt para cultivo comercial, a maioria expressa proteínas inseticidas do grupo Cry1 (CTNBIO, 2015). Várias proteínas desse grupo expressas em milho ou algodão Bt apresentam resistência cruzada, tais como Cry1F, Cry1A.105, Cry1Ac e Cry1Ab (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2013; VÉLEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014; BERNARDI, D. et al., 2015; SANTOS-AMAYA et al., 2015). Além disso, os plantios de milho e algodão são realizados na mesma região em alguns sistemas de produção de cultivos no Brasil e as mesmas populações de *S. frugiperda* infestam ambas as culturas (MARTINELLI et al., 2007). Neste contexto, a evolução da resistência de *S. frugiperda* é uma das maiores ameaças para a continuidade do uso destas tecnologias no Brasil. Casos de resistência a campo já foram reportados para *S. frugiperda* a proteína Cry1F em Porto Rico (STORER et al., 2010) e no Brasil (FARIAS et al., 2014) e para proteína Cry1Ab no Brasil (OMOTO et al., 2016). Além de *S. frugiperda*, a evolução da resistência a campo foi reportada para *Busseola fusca* (Füller) a Cry1Ab na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) a Cry1Ac na Índia (DHURUA; GUJAR, 2011) e *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte a Cry3Bb1 e mCry3A nos EUA (GASSMANN et al., 2011; GASSMANN et al., 2014).

Para o manejo da resistência de *S. frugiperda* a tecnologias de plantas Bt, a estratégia de alta-dose e refúgio tem sido utilizada. Esta estratégia combina o refúgio, que tem a função de gerar indivíduos suscetíveis para acasalamento com os raros resistentes que sobrevivem na área de cultivo Bt, com a expressão da(s) proteína(s) em alta dose, o que torna a resistência “funcionalmente” recessiva (ALSTAD; ANDOW, 1995; GOULD, 1998; TABASHNIK, 2008). Para o manejo da resistência, também estão sendo usadas plantas piramidadas que expressam duas ou mais proteínas Bt. A piramidação de genes consiste na expressão de duas ou mais proteínas Bt com elevada atividade inseticida contra a mesma praga-alvo (GHIMIRE et al., 2011; CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015). Nessa estratégia, apenas os indivíduos homozigotos resistentes a todas as proteínas expressas sobreviveriam na planta Bt (BREVAULT et al., 2013). Para que a estratégia de piramidação funcione efetivamente, há necessidade de disponibilidade de áreas de refúgio, baixa frequência de alelos de resistência e ausência de resistência cruzada entre as proteínas expressas na planta (CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015). Modelos matemáticos demonstram que o uso de plantas piramidadas é mais eficiente para retardar a evolução da resistência, se comparado

com plantas que expressam apenas uma proteína inseticida (ROUSH, 1998; ZHAO et al., 2003).

O monitoramento da resistência é essencial para subsidiar a mudança ou a manutenção destas estratégias antes que ocorram falhas generalizadas de controle no campo devido à resistência (ROUSH; MILLER, 1986; ANDOW; IVES, 2002; ANDOW, 2008). Atualmente, existem várias metodologias para se realizar o monitoramento, tanto por métodos fenotípicos quanto genotípicos (HUANG, 2006; SIEGFRIED et al., 2007; ANDOW, 2008).

Tradicionalmente, o método de bioensaio de concentração-resposta tem sido utilizado para a detecção e monitoramento fenotípico da resistência (HUANG, 2006; SIEGFRIED et al., 2007). Entretanto, devido à sua baixa capacidade de detecção de indivíduos resistentes, o método de bioensaio de concentração diagnóstica tem sido recomendado, e consiste em testar um grande número de insetos em uma concentração fixa (ROUSH; MILLER, 1986; HALLIDAY; BURNHAM, 1990). O maior fator limitante nestas metodologias é o alto custo das proteínas Bt (SIEGFRIED et al., 2007). Métodos práticos têm sido desenvolvidos para o monitoramento da resistência a inseticidas, visando principalmente à redução de custo, além da simplicidade, facilidade e agilidade de execução (DENNEHY et al., 1987; MAGARO; EDELSON, 1990; BISHOP; GRAFIUS, 1991). Neste sentido, o uso de folhas de plantas Bt para o monitoramento fenotípico poderia ser mais acessível, pois depende apenas da aquisição de semente e espaço em casa de vegetação ou campo.

Para estimativa da frequência de alelos de resistência em baixa frequência, métodos genotípicos como o F_1 e F_2 screen são mais recomendados (GOULD et al., 1997; ANDOW; ALSTAD, 1998). A técnica do F_2 screen exige alto custo com mão de obra e material de criação, devido à necessidade de criação dos insetos por duas gerações para que ocorra endogamia (ANDOW; ALSTAD, 1998; SIEGFRIED et al., 2007). O método de F_2 screen permite a seleção de populações resistentes, e a partir destas é possível validar e estimar a frequência de resistência pelo método de F_1 screen (GOULD et al., 1997; YUE et al., 2008). O método de F_1 screen tem a vantagem de apresentar menor custo, ser mais rápido e prático, bem como possibilita uma estimativa mais robusta da frequência de resistência (GOULD et al., 1997; MAHON et al., 2010). O F_1 screen tem sido utilizado para estimativa de frequência de alelos de resistência em diversas espécies de pragas, tais como: *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) a Cry1Ac (GOULD et al., 1997), *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) a Cry1Ab (YUE et al., 2008), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a Cry1Ac e Cry2Ab2 (LIU et al., 2008; MAHON et al., 2010;

ZHANG et al., 2012), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) a Cry1F (SIEGFRIED et al., 2014).

A expressão contínua de proteína Bt nos tecidos das plantas acarreta em elevada pressão de seleção sobre as pragas-alvo (MCGAUGHEY E WHALON, 1992). Este fato associado à agricultura intensiva podem comprometer as tecnologias Bt no Brasil. A evolução da resistência pode ser retardada, entretanto, depende de informações e ferramentas para a implementação e aprimoramento do Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Sendo assim, os objetivos da presente dissertação foram:

- Determinar a dominância funcional da resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt mediante a avaliação da sobrevivência de larvas neonatas provenientes das linhagens de *S. frugiperda* resistentes ao milho Herculex[®] que expressa a proteína Cry1F (HX-R), ao milho YieldGard VT PRO[™] que expressa as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT-R), ao milho PowerCore[™] que expressa as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F (PW-R), e ao milho Agrisure Viptera[™] que expressa a proteína Vip3Aa20 (Vip-R), além da linhagem suscetível (Sus) e de suas respectivas linhagens heterozigotas em diversas tecnologias de milho e algodão Bt.
- Avaliar o uso de folhas provenientes de plantas Bt para o monitoramento prático da resistência de *S. frugiperda* a eventos Bt.
- Avaliar o método de F₁ screen para o monitoramento genotípico da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 no Brasil.

Referências

- ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Sussex, v. 268, n. 5219, p. 1894-1896, 1995.
- ANDOW, D.A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.
- 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.
- ANDOW, D.A.; IVES, A.R. Monitoring and adaptive resistance management. **Ecological Applications**, Tempe, v. 12, p. 1378-1390, 2002.
- ASHLEY, T.R.; WISEMAN, B.R.; DAVIS, F.M.; ANDREWS, K.L. The fall armyworm: a bibliography. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 72, n. 1, p. 152-202, 1989.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. 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.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; AMADO, D.; SOUSA, R.S.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.; CONVILLE, J.; BURD, T.; OMOTO, C. Resistance risk assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 2015a.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R.S.; OKUMA, D.M.; SALMERON, E.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.L.; BURD, T.; OMOTO, C. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015b.

BISHOP, B.A.; GRAFIUS, E. An on-farm insecticide resistance test kit for colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **American Potato Journal**, Orono, v.68, n.1, p.53-64, 1991.

BREVAULT, T.; HEUBERGERB, S.; ZHANG, M.; ELLERS-KIRK, C.; NI, X.; MASSOND, L.; LIB, X.; TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 15, p. 5806-5811, 2013.

CARPENTER, J.E. Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 4, p. 319-321, 2010.

CARRIERE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B.E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 2, p. 161-168, 2015.

CÉLERES. **3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2014/15**. In: Informativo Biotecnologia. Disponível em: <http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501_150611.pdf>. Acesso em: 13 Out. 2015.

COMAS, C.; LUMBIERRES, B.; PONS, X.; ALBAJES, R. No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. **Transgenic Research**, London, v. 23, n. 1, p. 135-143, 2014.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberção Comercial de Algodão Geneticamente Modificado resistente a Insetos Evento 531**. In: Parecer Técnico nº 513/2005. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/10950.html>>. Acesso em: 13 Out. 2015.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberção Comercial de Milho Resistente a Insetos, Milho MON 89034**. In: Parecer Técnico nº 2052/2009. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14098.html>>. Acesso em: 13 Out. 2015.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Resumo Geral de Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14098.html>>. Acesso em: 13 Out. 2015.

DENNEHY, T.J.; GRAFTON-CARDWELL, E.E.; GRANETT, J.; BARBOUR, K. Practitioner-assessable bioassay for detection of dicofol resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 80, n. 5, p. 998-1003, 1987.

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**, Sussex, v. 67, n. 8, p. 898-903, 2011.

EDGERTON, M.D; FRIDGEN, J.; ANDERSON JR, J.R.; AHLGRIM, J.; CRISWELL, M.; DHUNGANA, P.; GOCKEN, T.; LI, Z.; MARIAPPAN, S.; PILCHER, C.D.; ROSIELLE, A.; STARK, S.B. Transgenic insect resistance traits increase corn yield and yield stability. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 493-496, 2012.

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, p. 150-158, 2014.

FITT, G.; OMOTO, C.; MAIA, A.H.; WAQUIL, J.M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; HUAN, N.H.; ANDOW, D.A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A.; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publishing, pp. 300-345, 2006.

GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; CLIFTON, E.H.; DUNBAR, M.W.; HOFFMANN, A.M.; INGBER, D.A.; KEWESHAN, R.S. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 14, p. 5141-5146, 2014.

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.

GHIMIRE, M.N.; GHIMIRE, M.N.; HUANG, F.; LEONARD, R.; HEAD, G.P.; YANG, Y. Susceptibility of Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 74-81, 2011.

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

GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARD, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3519–3523, 1997.

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

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C.S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A, 105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 8, n. 7, p. e68164, 2013.

HUANG, F. Detection and monitoring of insect resistance to transgenic Bt crops. **Insect Science**, Beijing, v. 13, n. 2, p. 73-84, 2006.

HUANG, F.; QURESHI, J.A.; MEAGHER JR. R.L.; REISIG, D.D.; HEAD, G.P.; ANDOW, D.A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G.D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F Resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e112958, 2014.

HUTCHISON, W.D.; BURKNESS, E.C.; MITCHELL, P.D.; MOON, R.D.; LESLIE, T.W.; FLEISCHER, S.J.; ABRAHAMSON, M.; HAMILTON, K.L.; STEFFEY, K.L.; GRAY, M.E.; HELLMICH, R.L.; KASTER, L.V.; HUNT, T.E.; WRIGHT, R.J.; PECINOVSKY, K.; RABAEY, T.L.; FLOOD, B.R.; RAUN, E.S. Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science**, Washington, v. 330, p. 222–225, 2010.

JAMES C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**: 2014. ISAAA Brief No. 49, International Service for the Acquisition of Ag-biotech Applications, Ithaca, New York. 2013.

KATHAGE, J.; QAIM, M. Economic impacts and impact dynamics of Bt (*Bacillus thuringiensis*) cotton in India. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 29, p. 11652-11656, 2012.

KLÜMPER, W.; QAIM, M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e111629, 2014.

KOUSER, S.; QAIM, M. Impact of Bt cotton on pesticide poisoning in smallholder agriculture: A panel data analysis. **Ecological Economics**, v. 70, n. 11, p. 2105-2113, 2011.

LIU, F.; XU, Z.; CHANG, J.; CHEN, J.; MENG, F.; ZHU, Y.C.; SHEN, J. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in china. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 3, p. 933-943, 2008.

LU, Y.; WU, K.; JIANG, Y.; GUO, Y.; DESNEUX, N. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. **Nature**, New York, v. 487, n. 7407, p. 362-365, 2012.

MAGARO, J.J.; EDELSON, J.V. Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in South Texas: A technique for resistance monitoring in the field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 4, p. 1201-1206, 1990.

MAHON, R.J.; DOWNES, S.; JAMES, W.; PARKER, T. Why Do F1 screens estimate higher frequencies of Cry2Ab resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) than do F2 screens? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 2, p. 472-481, 2010.

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. 2, 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**, Farnham Royal, v. 97, n. 3, p. 225-231, 2007.

McGAUGHEY, W.H.; WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science**, Washington, v. 258, n. 5087, p. 1451-1555, 1992.

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, p. 546-554, 2008.

NAGOSHI, R.N.; ROSAS-GARCÍA, N.M.; MEAGHER, R.L.; FLEISCHER, S.J.; WESTBROOK, J.K.; SAPPINGTON, T.W.; HAY-ROE, M.; THOMAS, J.M.G.; MURÚA, G.M. Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 108, n. 1, p. 135-144, 2015.

NAGOSHI, R.N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R.L.; LOPEZ, J.; MACHADO, V. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 100, n. 3, p. 394-402, 2007.

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**, Sussex, 2016. In press.

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; DALLACORT, R.; ZORZENONI, T.O.; ZACCHEO, P.V.C.; NETO, C.F.O.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; LOBATO, A.K.S. Agronomic efficiency of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize hybrids in pests control on Lucas do Rio Verde city, State of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural**, Pretoria, v. 8, n. 19, p. 2232-2239, 2013.

PASHLEY, D.P. Current status of fall armyworm host strains. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 71, n. 3, p. 227-234, 1988.

POGUE, M.G. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p.1-202, 2002.

ROUSH, R.T. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, London, v. 353, n. 3, p. 1777-1786, 1998.

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.

SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; WANG, H.; SPENCER, T.; HARIDAS, C.V.; TENHUMBERG, B.; SUMERFORD, D.V.; STORER, N. P. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, n. 5, p. 725-733, 2014.

SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; CRESPO, A.L.; STORER, N.P.; HEAD, G.P.; OWENS, E.D.; GUYER, D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. **American Entomologist**, Lanham, v. 53, p. 208-214, 2007.

SORGATTO, R. J.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Survival and development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt cotton and implications for resistance management strategies in Brazil. **Environmental Entomology**, College Park, v. 44, n.1, p. 186-192, 2015.

SANTOS-AMAYA, O.F.; RODRIGUES, J.V.; SOUZA, T.C.; TAVARES, C.S.; CAMPOS, S.O.; GUEDES, R.N.; PEREIRA, E.J. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific reports**, London, v. 5, n. 18243, 2015.

SPARKS, A.N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 62, n. 2, p. 82-87, 1979.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

STORER, N. P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.E.; THOMPSON, G.D.; SANTOS, A.C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.

TABASHNIK, B.E. Delaying insect resistance to transgenic crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 49, p. 19029-19030, 2008.

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

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

VÉLEZ, A.; SPENCER, T.A.; ALVES, A.P.; MOELLENBECK, D.; MEAGHER, R.L.; CHIRAKKAL, H.; SIEGFRIED, B.D. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 103, n. 6, p. 700-713, 2013.

WAQUIL, J. M.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.D.; OLIVEIRA, W.S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; MARTINELLI, S. Management of Lepidopteran pests in maize crop using the Bt pyramided event Cry1A. 105 and Cry2Ab2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 12, p. 1529-1537, 2013.

YUE, B.; HUANG, F.; LEONARD, B.R.; MOORE, S.; PARKER, R.; ANDOW, D.A.; COOK, D.; EMFINGER, K.; LEE, D.R. Verifying an F1 screen for identification and quantification of rare *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in field populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 129, n. 2, p. 172-180, 2008.

ZHANG, H.; TIAN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, J.; LIU, C.; YANG, Y.; WU, S.; WU, K.; CUI, J.; TABASHNIK, B.E.; WU, Y. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 26, p. 10275-10280, 2012.

ZHAO, J.Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H.L.; ROUSH, R.T.; EARLE, E.D.; SHELTON, A.M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 12, p. 1493-1497, 2003.

2 DOMINÂNCIA FUNCIONAL DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A TECNOLOGIAS DE MILHO E ALGODÃO Bt: IMPLICAÇÕES PARA A EVOLUÇÃO E MANEJO DA RESISTÊNCIA

Resumo

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é uma das principais pragas-alvo de tecnologias de milho e algodão Bt que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) no Brasil. Foram conduzidos estudos para determinar a dominância funcional da resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt mediante a avaliação da sobrevivência de larvas neonatas provenientes das linhagens de *S. frugiperda* resistentes ao milho Herculex[®] que expressa a proteína Cry1F (HX-R), ao milho YieldGard VT PRO[™] que expressa as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT-R), ao milho PowerCore[™] que expressa as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F (PW-R), e ao milho Agrisure Viptera[™] que expressa a proteína Vip3Aa20 (Vip-R), além da linhagem suscetível (Sus) e de suas respectivas linhagens heterozigotas em diversas tecnologias de milho e algodão Bt. Em geral, observou-se alta mortalidade dos heterozigotos nas tecnologias testadas, comprovando que a resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt é funcionalmente recessiva o que suporta a estratégia de refúgio em programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). No milho Herculex[®], as linhagens HX-R, VT-R, PW-R e Vip-R apresentaram alta sobrevivência (> 64%), enquanto que os heterozigotos de HX-R × Sus e Vip-R × Sus apresentaram baixa sobrevivência, 1,6 e 7,8%, respectivamente. Em contraste, os heterozigotos VT-R × Sus e PW-R × Sus não sobrevivem nesta tecnologia de milho Bt. Nos eventos de milho YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™], a sobrevivência dos indivíduos das linhagens VT-R, PW-R e HX-R variou entre 7,8 a 99,2%; no entanto, as linhagens Vip-R e todos os heterozigotos não apresentaram sobrevivência. Em tecnologias de milho Agrisure Viptera[™] e Agrisure Viptera[™] 3, apenas a linhagem Vip-R apresentou sobreviventes (>83%), enquanto que todas as outras linhagens apresentaram 100% de mortalidade nestas tecnologias. Em tecnologias de algodão Bt, a sobrevivência larval das linhagens HX-R, VT-R, PW-R e Vip-R variou entre 1,6 a 85,2% nos eventos de algodão Bollgard II[®] e Widestrike[®]. Em algodão Widestrike[®], apenas os heterozigotos Vip-R × Sus sobreviveram; enquanto que HX-R × Sus e VT-R × Sus sobreviveram em Bollgard II[®]. Em algodão TwinLink[®], apenas as linhagens PW-R e Vip-R × Sus sobreviveram, sendo que as demais linhagens testadas apresentaram 100% de mortalidade. A linhagem Sus apresentou mortalidade completa em todas as tecnologias de milho e algodão Bt avaliadas. Os resultados deste estudo fornecem informações para programas de MRI destinadas a prevenir ou retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* a proteínas Bt expressas em tecnologias de milho e algodão Bt.

Palavras chave: Lagarta-do-cartucho; Proteínas Bt; Resistência cruzada; Manejo da resistência de insetos

Abstract

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), is one of the major target pests of Bt maize and cotton technologies expressing insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) in Brazil. In this study, we determined the functional dominance of *S. frugiperda*

resistance to Bt technologies by evaluating neonate larval survival of *S. frugiperda* strains resistant to Herculex[®] maize expressing Cry1F protein (HX-R), to YieldGard VT PRO[™] maize expressing Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins (VT-R), to PowerCore[™] maize expressing Cry1A.105, Cry2Ab2 and Cry1F proteins (PW-R), and to Agrisure Viptera[™] maize expressing Vip3Aa20 protein (Vip-R), in addition to the susceptible strain (Sus) and the respective heterozygous strains in several Bt maize and cotton technologies. In general, high mortality of heterozygotes was observed in the Bt technologies tested, confirming that resistance of *S. frugiperda* to Bt technologies is functionally recessive and supporting the use of refuge in Insect Resistance Management (IRM) programs. In Herculex[®] maize, HX-R, VT-R, PW-R and Vip-R strains showed high survival (> 64%), and heterozygous larvae from HX-R × Sus and Vip-R × Sus present some survival, 1.6 and 7.8%, respectively. In contrast, heterozygous from VT-R × Sus and PW-R × Sus do not survive in this Bt maize technology. In YieldGard VT PRO[™] and PowerCore[™] maize events, survival of larvae from VT-R, PW-R and HX-R ranged from 7.8 to 99.2%; however, Vip-R strain and all heterozygous do not survived. In Agrisure Viptera[™] and Agrisure Viptera[™] 3 maize technologies only Vip-R strain showed survivors larvae (>83%), while all other strains showed 100% mortality in these technologies. In Bt cotton technologies, HX-R, VT-R, PW-R and Vip-R strains showed larval survival ranging from 1.6 to 85.2% on WideStrike[®] and Bollgard II[®] cotton events. In WideStrike[®] cotton, only heterozygous larvae from Vip-R × Sus survived; while, HX-R × Sus and VT-R × Sus survived in Bollgard II[®]. In TwinLink[®] cotton only PW-R and Vip-R × Sus strains showed survivors larvae, the other strains showed 100% mortality in this cotton technology. The Sus strain present complete mortality in all Bt maize and cotton technologies evaluated. Our results provide useful information for IRM programs designed to prevent or delay resistance evolution to Bt proteins expressed on Bt maize and cotton technologies in *S. frugiperda*.

Keywords: Fall armyworm; Bt proteins; Cross resistance; Insect resistance management

2.1 Introdução

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada um dos principais insetos-praga do milho na América do Sul e Central (POGUE, 2002). Além do milho, no Brasil tem sido relatada também como uma das principais espécies desfolhadores do algodão (MARTINELLI et al., 2006). Alguns aspectos bioecológicos desta espécie e particularidades do sistema de produção de cultivos no Brasil, tais como (i) polifagia (BARROS et al., 2010), (ii) elevada capacidade reprodutiva e dispersão de adultos (NAGOSHI et al., 2015), (iii) múltiplas gerações por ano (FITT et al., 2006; FARIAS et al., 2014) e (iv) sobreposição de cultivos de plantas hospedeiras (MARTINELLI et al., 2007) favorecem a ocorrência de severas infestações em qualquer época de cultivo e estágio fenológico do milho e algodão.

O uso de tecnologias de milho e algodão que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) tem sido eficiente no controle de *S. frugiperda* (OKUMURA et al., 2013; WAQUIL et al., 2013; BERNARDI, O. et al., 2015a; SORGATTO; BERNARDI;

OMOTO, 2015). No Brasil, durante a safra 2014-2015, o milho Bt foi cultivado em aproximadamente 80% da área total ocupada por essa cultura, e o algodão Bt em 40% da área total de algodão (CÉLERES, 2015). Apesar da disponibilidade de diversas tecnologias de milho e algodão Bt para cultivo comercial, a maioria expressa proteínas inseticidas do grupo Cry1 (CTNBIO, 2015). Várias proteínas desse grupo expressas em milho ou algodão Bt apresentam resistência cruzada como Cry1F, Cry1A.105, Cry1Ac e Cry1Ab (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2013; VÉLEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014; BERNARDI, D. et al., 2015; SANTOS-AMAYA et al., 2015). Além disso, no atual sistema de produção de cultivos, em algumas regiões brasileiras o milho e algodão são cultivados em áreas adjacentes, onde as mesmas populações de *S. frugiperda* infestam ambas as culturas (MARTINELLI et al., 2007).

Nesse cenário, a possibilidade de evolução da resistência em populações de *S. frugiperda* é a principal ameaça à sustentabilidade das tecnologias de milho e algodão Bt no Brasil. Um exemplo disso foi a evolução de resistência a campo de *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa em milho Herculex[®] (TC1507) (FARIAS et al., 2014) e à proteína Cry1Ab expressa em milho MON810 (OMOTO et al., 2016). Essa mesma espécie também evoluiu para resistência ao milho que expressa Cry1F em Porto Rico (STORER et al., 2010). Além da resistência a Cry1F, estudos recentes reportaram a seleção em laboratório a partir de populações de campo, e caracterização da resistência de linhagens de *S. frugiperda* ao milho YieldGard VT PRO[™] que expressa Cry1A.105/Cry2Ab2 (BERNARDI, D. et al., 2015; SANTOS-AMAYA et al., 2015), PowerCore[™] que expressa Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F (BERNARDI, 2015) e Agrisure Viptera[™] e Agrisure Viptera[™] 3 expressando Vip3Aa20 e Vip3Aa20/Cry1Ab, respectivamente (BERNARDI et al., 2016). Isso demonstra a existência de alelos da resistência a essas tecnologias de milho em populações de campo de *S. frugiperda* e a possibilidade de evolução de resistência, caso estratégias de manejo sejam negligenciadas.

Para o manejo da resistência de *S. frugiperda* a plantas Bt, a estratégia de alta-dose e refúgio tem sido utilizada (TABASHNIK, 2008; BERNARDI, O. et al., 2015b). Esta estratégia combina o refúgio, que tem a função de gerar indivíduos suscetíveis para acasalamento com os raros resistentes que sobrevivem na área de cultivo Bt, com a expressão da(s) proteína(s) em alta dose, o que torna a resistência “funcionalmente” recessiva (ALSTAD; ANDOW, 1995; GOULD, 1998; TABASHNIK, 2008). Para o manejo da resistência, também estão sendo usadas plantas piramidadas que expressam duas ou mais proteínas Bt. A piramidação de genes consiste na expressão de duas ou mais proteínas Bt com elevada atividade inseticida contra a mesma praga-alvo (GHIMIRE et al., 2011; CARRIÈRE;

CRICKMORE; TABASHNIK, 2015). Nessa estratégia, apenas os indivíduos homozigotos resistentes a proteínas piramidadas sobreviveriam na planta Bt (BREVAULT et al., 2013). Modelos matemáticos mostram que o uso de plantas piramidadas é mais eficiente para retardar a evolução da resistência, se comparado com plantas que expressam apenas uma proteína inseticida (ROUSH, 1998; ZHAO *et al.*, 2003). Nesse contexto, para entender a evolução da resistência de *S. frugiperda* a tecnologias de milho e algodão Bt e subsidiar programas de manejo da resistência, foi determinada a dominância funcional da resistência de *S. frugiperda* a tecnologias Bt, mediante a avaliação da sobrevivência de indivíduos resistentes, heterozigotos e suscetíveis de *S. frugiperda* em cinco tecnologias de milho Bt e três de algodão Bt usadas comercialmente no Brasil.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Linhagens de *S. frugiperda*

2.2.1.1 Linhagem suscetível

A linhagem suscetível de referência de *S. frugiperda* (Sus) foi proveniente da Embrapa Milho e Sorgo e tem sido mantida em laboratório em dieta artificial (KASTEN JR; PRECETTI; PARRA, 1978) por mais de 10 anos, livre da pressão de seleção por inseticidas ou proteínas Bt. Essa linhagem foi utilizada em cruzamentos recíprocos com todas as linhagens resistentes avaliadas no presente estudo, para obtenção dos indivíduos heterozigotos.

2.2.1.2 Linhagem resistente ao milho Herculex®

A linhagem de *S. frugiperda* resistente ao milho Herculex® (evento TC1507) que expressa a proteína Cry1F (HX-R) foi selecionada de uma população de campo oriunda de Barreiras, Bahia, Brasil, conforme descrito por Farias et al. (2014). Essa linhagem foi usada em sucessivos retrocruzamentos, autocruzamentos para a obtenção de uma linhagem isogênica (HORIKOSHI et al., 2016). Antes dos bioensaios, a linhagem isogênica foi exposta, novamente, a uma concentração discriminatória de Cry1F (2000 ng/cm² de deita). A razão de resistência para a proteína Cry1F foi superior a 5500 vezes. A herança da resistência foi caracterizada como autossômica e recessiva (FARIAS et al., 2014). Também foram avaliados os indivíduos heterozigotos resultantes do cruzamento recíproco HX-R♀ × Sus♂.

2.2.1.3 Linhagens resistentes ao milho YieldGard VT PRO™ ao milho PowerCore™

As linhagens de *S. frugiperda* resistentes ao milho YieldGard VT PRO™ que expressa as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 (evento MON89034) (VT-R) e ao milho PowerCore™ que expressa as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F (evento MON89034 × TC1507) (PW-R) foram selecionadas via F₂ screen de uma população oriunda de São Desidério, Bahia, Brasil (BERNARDI, D. et al., 2015). Após seleção, e durante nove gerações consecutivas, as lagartas foram criadas exclusivamente em folhas dos respectivos eventos de milho Bt. Nas gerações seguintes, as lagartas foram mantidas até o terceiro ínstar nos respectivos eventos de milho Bt e, posteriormente transferidas para dieta artificial, onde completaram o ciclo biológico. A razão de resistência da linhagem VT-R foi superior a 3300 e 10 vezes para Cry1A.105 e Cry2Ab2, respectivamente (BERNARDI, D. et al., 2015). O padrão de herança da resistência para as duas linhagens foi caracterizada como autossômica e recessiva (BERNARDI, 2015; BERNARDI, D. et al., 2015). A partir das linhagens resistentes foram obtidos os indivíduos heterozigotos dos cruzamentos recíprocos VT-R♀ × Sus♂ e PW-R♀ × Sus♂, os quais também foram avaliados no presente estudo.

2.2.1.4 Linhagem resistente ao milho Agrisure Viptera™

A linhagem resistente de *S. frugiperda* ao milho Agrisure Viptera™ que expressa a proteína Vip3Aa20 (evento MIR162) (Vip-R) foi selecionada via F₂ screen a partir de isofamílias positivas de uma população de campo de Correntina, Bahia, Brasil (BERNARDI, O. et al., 2015b). Após seleção, em cada geração a linhagem Vip-R foi criada em milho MIR162 até o terceiro ínstar larval quando foram transferidas para dieta artificial, onde permaneceram até a fase de pupa. A herança de resistência foi caracterizada como autossômica, monogênica e recessiva (BERNARDI et al., 2016). A razão de resistência a Vip3Aa20 foi superior a 3200 vezes na linhagem Vip-R (BERNARDI et al., 2016). Além da linhagem resistente, os heterozigotos obtidos do cruzamento recíproco Vip-R♀ × Sus♂ também foram testados neste estudo.

2.2.2 Plantas Bt

A sobrevivência das linhagens resistentes, heterozigotos e suscetível de *S. frugiperda* foi avaliada em cinco tecnologias de milho Bt e três de algodão Bt cultivadas comercialmente no Brasil (Tabela 1). O tratamento controle foi constituído de plantas de milho e algodão não-Bt. O cultivo de milho e algodão foi realizado a campo, na densidade de 10 plantas por metro linear e espaçamento entre linhas de 0.5 m. Antes de bioensaios, todas as plantas foram

testadas quanto à expressão de proteínas inseticidas, mediante uso de kits de detecção de proteína Bt (Envirologix, Quick Stix).

Tabela 2.1 - Tecnologias de milho e algodão Bt utilizadas no estudo

Variedade/Híbrido	Nome comercial	Evento	Proteína Bt
Algodão			
FM 975	WideStrike®	281-24-236 + 3006-210-23	Cry1Ac/Cry1F
DP 1228	Bollgard II®	MON15985	Cry2Ab2/Cry1Ac
FM 940	TwinLink®	T304-40 + GHB119	Cry1Ab/Cry2Ae
FM 993	Não-Bt	-	-
Milho			
2B587	Herculex®	TC1507	Cry1F
2B587	PowerCore™	MON89034 + TC1507	Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F
DKB 390	YieldGard VT PRO™	MON89034	Cry1A.105/Cry2Ab2
Maximus	Agrisure Viptera™ 3	Bt11 + MIR162	Cry1Ab/Vip3Aa20
Maximus	Agrisure Viptera™	MIR162	Vip3Aa20
2B587	Não-Bt	-	-

2.2.3 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados com plantas nos estádios fenológicos V₄ a V₈ (milho) e B₁ a B₄ (algodão). Nos bioensaios com plantas de milho, as folhas completamente expandidas foram retiradas da região do “cartucho”, e nos bioensaios com plantas de algodão, as folhas foram removidas do terço superior das plantas. Em laboratório, as folhas foram lavadas e, após secagem, cortadas em pedaços de ~4 cm². Em seguida, as folhas foram acondicionadas sobre uma mistura gelificada de ágar-água a 2% em placas plásticas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil). Posteriormente, em cada célula foi infestada uma neonata (< 24 h de idade). Em seguida, as placas foram vedadas com as respectivas tampas plásticas e acondicionadas em sala climatizada a 27 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase 14 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 128 lagartas (4 repetições com 32 neonatas/repetição). As folhas foram substituídas pelo respectivo material vegetal fresco após 3 dias. A sobrevivência larval e o peso dos sobreviventes foram avaliados após 7 dias da infestação das lagartas.

2.2.4 Análise estatística

Modelo linear generalizado com distribuição do tipo binomial foi utilizado para a análise dos dados de sobrevivência, com evento e genótipo do inseto como fatores de efeito fixo. Os dados de milho e algodão foram separados para a análise. A verificação da qualidade do ajuste foi feita pelo gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (DEMÉTRIO; HINDE; MORAL, 2014). Quando houve diferença significativa na análise de variância, as médias foram comparadas pela sobreposição dos intervalos de confiança IC 95%, os dados previstos e respectivos intervalos de confiança foram obtidos mediante PROC GENMOD (SAS Institute, 2010). A análise de peso foi feita considerando-se apenas o genótipo do inseto como fator. Os dados de peso foram transformados via Box-cox e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($P = 0,05$) utilizando o procedimento PROC GLM no SAS 9.3 (SAS Institute, 2010).

2.3 Resultados

2.3.1 Sobrevivência de linhagens de *S. frugiperda* em tecnologias de milho Bt

Houve interação significativa entre os fatores eventos de milho Bt e a linhagens de *S. frugiperda* ($df= 40$; Deviance = 1905,00; $Pr > \chi^2 < 0,0001$). O efeito foi significativo para eventos de milho Bt ($df= 5$; Deviance = 3536,80; $Pr > \chi^2 < 0,0001$) e linhagem ($df = 8$; Deviance = 1103,70; $Pr > \chi^2 < 0,0001$). A maior sobrevivência larval (96,8%) foi encontrada na linhagem HX-R quando alimentada de milho Herculex® (Figura 1). Nessa tecnologia de milho, a sobrevivência das linhagens VT-R, PW-R e Vip-R foi similar, variando de 64 a 80%. Em contraste, uma baixa sobrevivência larval, variando de 1,6 e 7,8%, foi detectada para os heterozigotos oriundos dos cruzamentos recíprocos HX-R $\times$ Sus e Vip-R $\times$ Sus, respectivamente. Para a linhagem Sus e heterozigotos VT-R $\times$ Sus e PW-R $\times$ Sus não houve sobrevivência larval em milho Herculex®. Em milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, a sobrevivência larval das linhagens VT-R e PW-R foi superior a 75% (Figura 1). A linhagem HX-R apresentou sobrevivência significativamente menor em milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ (< 11%) (Figura 1). Em contraste, as linhagens Sus, Vip-R e heterozigotos não sobreviveram nessas tecnologias de milho Bt. Em milho Agrisure Viptera™ e Agrisure Viptera™ 3, apenas a linhagem Vip-R apresentou sobrevivência larval, variando de 83 a 86%, respectivamente (Figura 1). Em milho não-Bt a sobrevivência de resistentes, heterozigotos e suscetíveis foi superior a 80% (Figura 1).

Figura 2.1 - Sobrevivência de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes, heterozigotos e suscetível a Bt em folhas de milho Bt e não-Bt aos 7 dias. Colunas representam a média de sobrevivência. Barras de erro ($\pm$ EP) com as mesmas letras não diferem significativamente pela sobreposição dos intervalos de confiança (95% IC). *IC não estimado devido à ausência de variabilidade

A sobrevivência larval da linhagem HX-R foi semelhante quando mantida em milho Herculex[®] e não-Bt (96%) (Tabela 2). A sobrevivência em milho YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™] foi significativamente menor, variando de 7 a 10%, respectivamente. Em contraste, a linhagem HX-R não apresentou sobrevivência larval em milho Viptera[™]. O peso larval dos sobreviventes da linhagem HX-R foi similar em milho Herculex[®], YieldGard VT PRO[™] e não-Bt (5,3 a 5,9 mg/larva), mas significativamente menor em milho PowerCore[™] (3,8 mg/larva) (Tabela 3). A linhagem VT-R apresentou sobrevivência larval superior a 99% em milho YieldGard VT PRO[™], não diferindo da sobrevivência em milho não-Bt (Tabela 2). Em contraste, apresentou sobrevivência significativamente menor em milho Herculex[®] e PowerCore[™], variando de 64 a 75%, respectivamente. A linhagem VT-R também não sobreviveu em milho Viptera[™]. O peso larval dos sobreviventes da linhagem VT-R foi similar em milho Herculex[®], YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™] (~7,0 mg/larva), mas foi significativamente superior em milho não-Bt, 5,8 mg/larva (Tabela 3). A linhagem PW-R apresentou similar sobrevivência larval em milho Herculex[®], YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™], variando de 78 a ~83% (Tabela 2). Em tecnologias de milho Viptera[™] não houve sobreviventes da linhagem PW-R. O peso larval da linhagem PW-R foi significativamente menor em milho YieldGard VT PRO[™], quando comparado ao milho não-Bt, Herculex[®] e PowerCore[™], os quais não diferiram entre si (Tabela 3). A linhagem Vip-R apresentou sobrevivência larval superior a 83% em milho Agrisure Viptera[™] e Agrisure Viptera[™] 3, não diferindo da sobrevivência em milho não-Bt e Herculex[®], 73 a 82%, respectivamente (Tabela 2). Em contraste, a linhagem Vip-R não sobreviveu em milho YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™]. Dos insetos sobreviventes, o peso larval foi similar em eventos de milho Viptera[™] e não-Bt (8 a 9,6 mg/larva), mas significativamente maior daquele em milho Herculex[®], 6,2 mg/larva (Tabela 3). Dos indivíduos heterozigotos, somente aqueles oriundos dos cruzamentos recíprocos HX-R × Sus e Vip-R × Sus apresentaram sobrevivência 1,6 a 7,8% em milho Herculex[®] (Tabela 2). Em contraste, não houve sobreviventes da linhagem Sus e heterozigotos VT-R × Sus e PW-R × Sus em qualquer evento de milho Bt avaliado. Em contraste, em milho não-Bt a sobrevivência de heterozigotos e da linhagem Sus foi superior a 82% (Tabela 2). O peso dos heterozigotos não foi contabilizado, pois a porcentagem de sobrevivência foi baixa, não permitindo uma estimativa precisa do peso.

Tabela 2.2 - Sobrevivência larval de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes, heterozigotos e suscetível a Bt em folhas de milho Bt e não-Bt aos 7 dias

Milho Bt ¹	Linhagens resistentes				Linhagens heterozigotas				Linhagem suscetível
	HX-R	VT-R	PW-R	Vip-R	HX-R × Sus	VT-R × Sus	PW-R × Sus	Vip-R × Sus	Sus
Herculex [®]	96,9 ± 1,8 a	64,1 ± 2,0 b	80,5 ± 6,3 b	73,4 ± 3,3 a	1,6 ± 0,9 b	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	7,8 ± 2,7 b	0,0 ± 0,0*
YieldGard VT PRO [™]	10,2 ± 0,8 c	99,2 ± 0,8 a	78,1 ± 6,5 b	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
PowerCore [™]	7,8 ± 3,3 d	75,0 ± 5,6 b	82,8 ± 4,3 b	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
Agrisure Viptera [™]	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	83,6 ± 4,8 a	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
Agrisure Viptera [™] 3	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	85,9 ± 2,7 a	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
Não-Bt	92,2 ± 3,0 b	98,4 ± 0,9 a	96,1 ± 1,5 a	82,0 ± 2,9 a	98,4 ± 1,6 a	94,5 ± 2,7 a	87,5 ± 5,6 a	86,7 ± 2,3 a	82,0 ± 6,0 a

*IC não estimado devido a ausência de variabilidade.

¹Médias (± EP) seguidos de mesma letra na coluna não diferem devido a sobreposição dos intervalos de confiança (95% IC).

Tabela 2.3 - Peso larval de linhagens resistentes de *Spodoptera frugiperda* sobreviventes em folha de milho Bt e não-Bt aos 7 dias

Milho Bt	Peso larval por linhagem (mg) ¹			
	HX-R	VT-R	PW-R	Vip-R
Herculex [®]	5,8 ± 0,3 a	9,3 ± 0,6 a	9,6 ± 0,2 a	6,2 ± 0,3 b
YieldGard VT PRO [™]	5,3 ± 0,2 a	7,3 ± 0,2 a	5,9 ± 0,2 b	-*
PowerCore [™]	3,8 ± 0,9 b	7,5 ± 0,6 a	7,5 ± 0,6 a	-*
Agrisure Viptera [™]	-*	-*	-*	9,6 ± 0,4 a
Agrisure Viptera [™] 3	-*	-*	-*	8,0 ± 0,4 a
Não-Bt	5,9 ± 0,2 a	5,8 ± 0,2 b	10,3 ± 0,1 a	8,8 ± 0,5 a

*Dados não considerados na análise devido a ausência de resposta.

¹Médias (± EP) seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente (Teste Tukey, $P > 0,05$).

2.3 Sobrevivência de linhagens de *S. frugiperda* em tecnologias de algodão Bt

A sobrevivência de *S. frugiperda* diferiu entre os eventos de algodão Bt ($df = 3$; Deviance = 2255,18; $P > \chi^2 < 0,0001$) e suas linhagens ($df = 8$; Deviance = 427,92; $P > \chi^2 < 0,0001$). Além disso, houve interação significativa entre esses dois fatores ($df = 24$; Deviance = 602,86; $P > \chi^2 < 0,0001$). Em Bollgard II[®], a linhagem HX-R, VT-R e PW-R apresentaram similar sobrevivência larval, variando de 41 a 46% (Figura 2). Em contraste, sobrevivência significativamente menor, de 1,5 a 3,9% foi constatada para a linhagem Vip-R e heterozigotos HX-R × Sus e VT-R × Sus (Figura 2). A linhagem Sus e os heterozigotos PW-R × Sus e Vip-R × Sus não sobreviveram em Bollgard II[®]. Em WideStrike[®], as linhagens HX-R, VT-R e PW-R apresentaram sobrevivência larval superior a 70%, não diferindo entre si. A sobrevivência para a linhagem Vip-R e Vip-R × Sus foi de 33 a 43%, respectivamente (Figura 2). Em contraste, a linhagem Sus e heterozigotos HX-R × Sus, VT-R × Sus, PW-R × Sus não sobreviveram em WideStrike[®]. Em TwinLink[®], somente as linhagens PW-R e Vip-R × Sus apresentaram sobrevivência larval de 28 e ~1%, respectivamente (Figura 2). Por outro lado, em algodão não-Bt a sobrevivência larval foi superior a 63% para todas as linhagens avaliadas.

Figura 2.2 - Sobrevivência de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes, heterozigotos e suscetível a Bt em folhas de algodão Bt e não-Bt aos 7 dias. Colunas representam a média de sobrevivência. Barras de erro ($\pm$ EP) com as mesmas letras não diferem significativamente pela sobreposição dos intervalos de confiança (95% IC). *IC não estimado devido à ausência de variabilidade

A linhagem HX-R apresentou elevada sobrevivência larval em WideStrike® (>70%), não diferindo daquela em algodão não-Bt (~65%) (Tabela 4). A sobrevivência dessa linhagem foi ~40% em Bollgard II® e sem sobreviventes em TwinLink®. O peso dos sobreviventes foi similar em tecnologias de algodão-Bt e não-Bt (Tabela 5). A linhagem VT-R teve sobrevivência superior a 83% em WideStrike® e não-Bt. Em Bollgard II® a sobrevivência foi de 42% (Tabela 4). Em TwinLink® não houve sobreviventes da linhagem VT-R. O peso das lagartas sobreviventes da linhagem VT-R foi similar em WideStrike® e não-Bt e, significativamente menor em Bollgard II® (Tabela 5). Diferentemente das demais linhagens avaliadas, a linhagem PW-R sobreviveu em todas as tecnologias de algodão Bt

avaliadas (Tabela 4). A sobrevivência da linhagem PW-R foi similar em WideStrike® e não-Bt (78%) e, significativamente maior daquela em Bollgard II® e Twinlink®, de 45 e 28%, respectivamente (Tabela 4). O peso larval da linhagem PW-R também variou significativamente, sendo superior em WideStrike® e não-Bt (9 a ~12 mg/larva) e inferior em Bollgard II® e Twinlink® (1,7 a 3,2 mg/larva) (Tabela 5). A linhagem Vip-R foi aquela que apresentou menor sobrevivência em eventos de algodão Bt (Tabela 4). Sobrevivência larval de 43 e 1,6% foi detectada somente em WideStrike® e Bollgard II®, respectivamente, sendo significativamente inferior daquela em algodão não-Bt (~64%) (Tabela 4). O peso dos sobreviventes da linhagem Vip-R foi similar em algodão Bt e não-Bt (Tabela 5). Dos indivíduos heterozigotos, a maior sobrevivência larval foi detectada para os descendentes dos cruzamentos recíprocos Vip-R × Sus e VT-R × Sus, com ~34 e 4% de sobrevivência em WideStrike® e Bollgard II®, respectivamente (Tabela 4). Em contraste, menos de 2% dos indivíduos oriundos do cruzamento Vip-R × Sus sobreviveram em Bollgard II®. Não houve sobreviventes da linhagem Sus em qualquer tecnologia de algodão Bt; no entanto, houve mais de 86% de sobrevivência em algodão não-Bt (Tabela 4). O peso larval dos heterozigotos sobreviventes em algodão Bt não foi contabilizado, pois a sobrevivência foi relativamente baixa, não permitindo uma estimativa precisa do peso.

Tabela 2.4 - Sobrevivência larval de linhagens de *Spodoptera frugiperda* resistentes, heterozigotos e suscetível a Bt em folhas de algodão Bt e não-Bt aos 7 dias

Algodão Bt ¹	Linhagens resistentes				Linhagens heterozigotas				Linhagem suscetível
	HX-R	VT-R	PW-R	Vip-R	HX-R × Sus	VT-R × Sus	PW-R × Sus	Vip-R × Sus	Sus
WideStrike®	70,3 ± 4,5 a	85,2 ± 2,3 a	78,9 ± 2,3 a	42,9 ± 2,7 b	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	33,6 ± 7,2 b	0,0 ± 0,0*
Bollgard II®	41,4 ± 5,2 b	42,2 ± 3,0 b	45,3 ± 5,3 b	1,6 ± 0,9 c	1,6 ± 1,2 b	3,9 ± 2,3 b	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
TwinLink®	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	28,1 ± 4,6 c	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,8 ± 0,7 c	0,0 ± 0,0*
Não-Bt	64,8 ± 5,3 a	83,6 ± 3,7 a	88,3 ± 3,5 a	63,7 ± 3,3 a	85,8 ± 2,7 a	83,6 ± 2,3 a	73,4 ± 3,7 a	94,2 ± 0,9 a	86,7 ± 2,9 a

*IC não estimado devido a ausência de variabilidade.

¹Médias (± EP) seguidos de mesma letra na coluna não diferem devido a sobreposição dos intervalos de confiança (95% IC).

Tabela 2.5 - Peso larval de linhagens resistentes de *Spodoptera frugiperda* sobreviventes em folha de algodão Bt e não-Bt aos 7 dias

Algodão Bt	Peso larval por linhagem (mg) ¹			
	HX-R	VT-R	PW-R	Vip-R
WideStrike [®]	1,8 ± 0,1 a	2,2 ± 0,2 a	9,1 ± 0,9 a	1,9 ± 0,2 a
Bollgard II [®]	1,6 ± 0,2 a	1,2 ± 0,1 b	3,2 ± 0,3 b	-*
TwinLink [®]	-*	-*	1,7 ± 0,2 c	-*
Não-Bt	1,9 ± 0,1 a	2,2 ± 0,1 a	11,7 ± 0,2 a	2,2 ± 0,3 a

*Dados não considerados na análise devido a ausência de resposta.

¹Médias (± EP) seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente (Teste Tukey, $P > 0,05$).

2.4 Discussão

No atual sistema de produção de cultivos do Brasil ocorre uma sobreposição espacial e temporal de cultivos de milho e algodão Bt com infestação constante de populações de *S. frugiperda*. Nesse cenário, garantir a mortalidade dos indivíduos de genótipo heterozigotos é um dos principais aspectos a serem considerados no manejo da resistência de insetos (GOULD, 1998; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIERE, 2009). No presente estudo, as tecnologias de milho YieldGard VT PRO[™], PowerCore[™], Agrisure Viptera[™] e Agrisure Viptera[™] 3 ocasionaram mortalidade completa de todos os heterozigotos de *S. frugiperda* testados (HX-R × Sus, VT-R × Sus, PW-R × Sus, Vip-R × Sus), demonstrando que a expressão *in-planta* das proteínas inseticidas atende ao conceito de alta dose. Sobrevivência acima de 5% para heterozigotos foi observada apenas para Vip-R × Sus nos eventos Herculex[®] e WideStrike[®]. A elevada mortalidade dos heterozigotos nas tecnologias de milho e algodão Bt suporta a importância da adoção de áreas de refúgio estruturado dentro da estratégia de alta-dose e refúgio do manejo da resistência de insetos.

A elevada sobrevivência larval das linhagens de *S. frugiperda* resistentes nos diferentes eventos Bt (Tabela 2.1) confirmam a resistência a esses eventos que foram previamente caracterizados para as linhagens HX-R em milho Herculex[®] (FARIAS et al., 2014), VT-R em milho YieldGard VT PRO[™] (BERNARDI, D. et al., 2015) PW-R em milho Powercore[™] (BERNARDI, 2015) e Vip-R em milho Agrisure Viptera[™] e Agrisure Viptera[™] 3 (BERNARDI et al., 2016). Neste estudo, fica evidente que a resistência ao milho que expressa Cry1A.105

possibilita a sobrevivência em milho que expressa a proteína Cry1F, e vice versa, pois houve elevada sobrevivência larval das linhagens HX-R, VT-R e PW-R nas tecnologias de milho Herculex[®], YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™]. Isso foi reportado em estudos prévios entre proteínas do grupo Cry1, tais como Cry1F, Cry1A.105, Cry1Ab, Cry1Ac (VÉLEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014; BERNARDI, D. et al., 2015; SANTOS-AMAYA et al., 2015). As proteínas inseticidas do grupo Cry1 apresentam similaridade da sequência de aminoácidos, como por exemplo, Cry1F e Cry1A.105 cuja similaridade é de 72% (CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015). Além disso, Cry1F, Cry1A.105, Cry1Ac e Cry1Ab competem pelo mesmo sítio de ligação (FERRE, VAN RIE, 2002; HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2013). Em contraste, Cry2Ab2 presente nos eventos YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™] apresenta aproximadamente 35 e 34% de similaridade com Cry1F e Cry1A.105, e não utiliza o mesmo sítio de ligação de proteínas do grupo Cry1 (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2013; CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015). Nesse contexto, nas tecnologias de milho YieldGard VT PRO[™] e PowerCore[™], a proteína Cry2Ab2 é aquela que tem papel fundamental na mortalidade de indivíduos resistentes a Cry1F (STORER et al., 2012; VÉLEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014; BERNARDI, D. et al., 2015). No entanto, devido à baixa expressão desta proteína na planta, Cry2Ab2 isoladamente tem baixo efeito tóxico contra *S. frugiperda* resistentes a Cry1F e/ou Cry1A.105 (NIU et al., 2013).

Neste estudo, a linhagem resistente Vip-R apresentou elevada sobrevivência larval em milho Agrisure Viptera[™] e Agrisure Viptera[™] 3, enquanto as demais linhagens (HX-R, VT-R, PW-R, HX-R × Sus, VT-R × Sus, PW-R × Sus, Vip-R × Sus e Sus) não sobreviveram. A proteína Vip não compete pelo mesmo sítio de ligação com proteínas do grupo Cry1 ou Cry2 (De MAAGD et al., 2003; SENA; HERNANDEZ-RODRIGUEZ; FERRE, 2009; GOUFFON et al., 2011; CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015). Nossos resultados confirmam que não há resistência cruzada entre proteínas Cry com Vip3 em *S. frugiperda* devido à mortalidade completa das linhagens resistente HX-R, VT-R e PW-R nas tecnologias de milho Viptera[™]. Ausência de resistência cruzada entre Vip3A e Cry1Ac também foi reportada em *Heliothis virescens* (JACKSON et al., 2007) e Vip3A e Cry1F em *S. frugiperda* (NIU et al., 2013; VÉLEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014; NIU et al., 2014). A mortalidade completa da linhagem HX-R em milho Viptera[™] e a alta sobrevivência da linhagem Vip-R em milho Herculex[®] evidenciam a possibilidade de resistência múltipla na linhagem Vip-R. Em outras palavras, a alta frequência de

resistência a Cry1F no Brasil (FARIAS et al., 2014), possibilitou a seleção de indivíduos contendo o gene de resistência a Vip3Aa20 e Cry1F.

Em eventos de algodão Bt, as linhagens HX-R, VT-R e PW-R apresentaram elevada sobrevivência em algodão Bollgard II[®] e WideStrike[®]. Apesar das tecnologias Bollgard II[®] e WideStrike[®] expressarem duas proteínas inseticidas, ambas não atendem uma das pressuposições básicas da piramidação de genes, que é a elevada toxicidade de cada toxina sobre a mesma praga (IVES et al., 2011; CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015; SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015). A baixa toxicidade da proteína Cry1Ac para *S. frugiperda* (ADAMCZYK et al., 2008; SIVASUPRAMANIAM et al., 2008; SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015), em associação com a evolução da resistência de *S. frugiperda* a Cry1F (FARIAS et al., 2014) impactaram negativamente a eficiência do algodão WideStrike[®] para o controle de *S. frugiperda* no Brasil. Em algodão Bollgard II[®] ambas as proteínas tem relativa baixa eficácia para *S. frugiperda* (ADAMCZYK et al., 2008; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011; SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015). Na tecnologia de algodão TwinLink[®], com exceção da linhagem PW-R e Vip-R × Sus, houve mortalidade completa dos demais genótipos de *S. frugiperda*. Neste caso, a sobrevivência da Vip-R × Sus foi baixa (<1%), e possivelmente os indivíduos não chegariam à fase adulta, entretanto, na linhagem PW-R, a resistência a múltiplas proteínas Bt permitiu a sobrevivência na tecnologia TwinLink[®]. Embora *S. frugiperda* apresente suscetibilidade moderada a Cry1Ab (ADAMCZYK; MAHAFFEY, 2008; NIU et al., 2014; BERNARDI, O. et al., 2015a; OMOTO et al. 2016), a expressão da proteína Cry2Ae em algodão TwinLink[®] mostrou-se eficiente no controle das linhagens resistentes HX-R, VT-R e Vip-R de *S. frugiperda*. A proteína Cry2Ae compartilha sítio de ligação com Cry2Ab, mas não compete pelo mesmo sítio de ligação das proteínas do grupo Cry1 ou Vip3 (GOUFFON et al., 2011).

Em resumo, os dados deste estudo demonstram que a dominância funcional da resistência de *S. frugiperda* a proteínas Bt é recessiva, devido a alta mortalidade dos heterozigotos observado nas tecnologias de milho e algodão Bt testadas. Esta recessividade suporta a importância da adoção de áreas de refúgio estruturado, uma vez que a maioria dos indivíduos de genótipo heterozigoto pode ser efetivamente controlada com as plantas Bt usadas para o controle de *S. frugiperda* no Brasil.

2.5 Conclusão

- A resistência das linhagens HX-R, VT-R, PW-R e Vip-R de *S. frugiperda* é funcionalmente recessiva para proteínas Bt expressas em tecnologias de milho e algodão Bt.

Referências

ADAMCZYK JR., J.J.; GREENBERG, S.; ARMSTRONG, J.S.; MULLINS, W.J.; BRAXTON, L.B.; LASSITER, R.B.; SIEBERT, M.W. Evaluations of Bollgard[®], Bollgard II[®], and Widestrike[®] technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae).

Florida Entomologist, Gainesville, v. 91, n. 3, p. 531-536, 2008.

ADAMCZYK JR.; J.J.; MAHAFFEY, J.S. Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various lepidopteran pests. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 4, p. 570-575, 2008.

ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Sussex, v. 268, n. 5219, p. 1894-1896, 1995.

ARMSTRONG, J.S.; ADAMCZYK JR, J.J.; GREENBERG, S.M. Efficacy of single and dual gene cotton *Gossypium hirsutum* events on neonate and third instar fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* development based on tissue and meridic diet assays. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 94, n. 2, p. 262-271, 2011.

BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R.; OLIVEIRA, M.D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p. 237-245, 2010.

BERNARDI, D. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a eventos "piramidados" de milho que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner.** 2015. 120 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-28042015-105744/>>. Acesso em: 25 Nov. 2015.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. 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.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; AMADO, D.; SOUSA, R.S.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.; CONVILLE, J.; BURD, T.; OMOTO, C. Resistance risk assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 108, n. 6, p. 2711-2719, 2015a.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OKUMA, D.M.; MIRALDO, L.L.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.; BURD, T.; OMOTO, C. Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, 2016. In press.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R.S.; OKUMA, D.M.; SALMERON, E.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.L.; BURD, T.; OMOTO, C. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015b.

BREVAULT, T.; HEUBERGERB, S.; ZHANG, M.; ELLERS-KIRK, C.; NI, X.; MASSOND, L.; LIB, X.; TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 15, p. 5806-5811, 2013.

CARRIERE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B.E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 2, p. 161-168, 2015.

CÉLERES. **3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2014/15**. In: Informativo biotecnologia. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/>>. Acesso em: 15 Out. 2015.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Resumo Geral de Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14098.html>>. Acesso em: 15 Out. 2015.

DEMÉTRIO, C.G.; HINDE, J.; MORAL, R.A. Models for overdispersed data in entomology. In: FERREIRA, C.P.; GODOY, W.A. (Ed.). **Ecological Modelling Applied to Entomology**. Switzerland: Springer, 2014. chap. 9, p. 219-259.

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, 150-158, 2014.

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

FITT, G.; OMOTO, C.; MAIA, A.H.; WAQUIL, J.M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; HUAN, N.H.; ANDOW, D.A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A.; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental Risk Assessment of**

Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil. Cambridge: CABI Publishing, 2006. p. 300-345.

GHIMIRE, M.N.; GHIMIRE, M.N.; HUANG, F.; LEONARD, R.; HEAD, G.P.; YANG, Y. Susceptibility of Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 74-81, 2011

GOUFFON, C.; VAN VLIET, A.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; JURAT-FUENTES, J.L. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A Toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n.10, p. 3182-3188, 2011.

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

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C.S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A, 105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 8, n. 7, p. e68164, 2013.

HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; OKUMA, D.; FARIAS, J.R.; MIRALDO, L.L.; AMARAL, F.S.A.; OMOTO, C. Near-Isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 2016. In press.

HUANG, F.; QURESHI, J.A.; MEAGHER JR. R.L.; REISIG, D.D.; HEAD, G.P.; ANDOW, D.A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G.D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F Resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e112958, 2014.

IVES, A.R.; GLAUM, P.R.; ZIEBARTH, N.L.; ANDOW, D.A. The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. **Ecological Applications**, Tempe, v. 21, n. 2, p. 503-515, 2011.

JACKSON, R.E.; MARCUS, M.A.; GOULD, F.; BRADLEY, J.R.; VAN DUYN, J.W. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 1, p. 180-186, 2007.

KASTEN Jr, P.; PRECETI, 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. 1/2, p. 68-78, 1978.

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

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; CASTROSILVA-FILHO, M.; 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. 2, 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**, Farnham Royal, v. 97, n. 3, p. 225-231, 2007.

NAGOSHI, R.N.; ROSAS-GARCÍA, N.M.; MEAGHER, R.L.; FLEISCHER, S.J.; WESTBROOK, J.K.; SAPPINGTON, T.W.; HAY-ROE, M.; THOMAS, J.M.G.; MURÚA, G.M. Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 108, n. 1, p. 135-144, 2015.

NIU, Y.; MEAGHER JR., R.L.; YANG, F.; HUANG, F. Susceptibility of field populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to purified Cry1F protein and corn leaf tissue containing single and pyramided Bt genes. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 96, n. 3, p. 701-713, 2013.

NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V.; HUANG, F. Larval survival and plant injury of Cry1 F-susceptible, -resistant, and -heterozygous fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt corn containing single or pyramided genes. **Crop Protection**, Guildford, v. 59, p. 22-28, 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**, Sussex, 2016. In press.

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; DALLACORT, R.; ZORZENONI, T.O.; ZACCHEO, P.V.C.; NETO, C.F.O.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; LOBATO, A.K.S. Agronomic efficiency of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize hybrids in pests control on Lucas do Rio Verde city, State of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural**, Pretoria, v. 8, n. 19, p. 2232-2239, 2013.

POGUE, M.G. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p.1-202, 2002.

ROUSH, R.T. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, London, v. 353, n. 3, p. 1777-1786, 1998.

SANTOS-AMAYA, O.F.; RODRIGUES, J.V.; SOUZA, T.C.; TAVARES, C.S.; CAMPOS, S.O.; GUEDES, R.N.; PEREIRA, E.J. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 18243, 2015.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT**: 9.3 User's. 3rd. ed. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2010.

SENA, J.A.D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

SIVASUPRAMANIAM, S.; MOAR, W.J.; RUSCHKE, L.G.; OSBORN, J.A.; JIANG, C.; SEBAUGH, J.L.; BROWN, G.R.; SHAPPLEY, Z.W.; OPPENHUIZEN, M.E.; MULLINS, J.W.; GREENPLATE, J.T. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 2, p. 546-554, 2008.

SORGATTO, R.J.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Survival and development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt cotton and implications for resistance management strategies in Brazil. **Environmental Entomology**, College Park, v. 44, n.1, p. 186-192, 2015.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

STORER, N.P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.E.; THOMPSON, G.D.; SANTOS, A.C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.

TABASHNIK, B.E. Delaying insect resistance to transgenic crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 49, p. 19029-19030, 2008.

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

VÉLEZ, A.; SPENCER, T.A.; ALVES, A.P.; MOELLENBECK, D.; MEAGHER, R.L.; CHIRAKKAL, H.; SIEGFRIED, B.D. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 103, n. 6, p. 700-713, 2013.

WAQUIL, J.M.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.D.; OLIVEIRA, W.S.; BERGER, G.U., HEAD, G.P.; MARTINELLI, S. Management of Lepidopteran pests in maize crop using the Bt

pyramided event Cry1A. 105 and Cry2Ab2. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 12, p. 1529-1537, 2013.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H.L.; ROUSH, R.T.; EARLE, E.D.; SHELTON, A.M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 12, p. 1493-1497, 2003.

3 MONITORAMENTO PRÁTICO DA RESISTÊNCIA A PLANTAS Bt EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Resumo

O desenvolvimento de métodos práticos de monitoramento da resistência de insetos a inseticidas é de grande valia para a implementação de programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Atualmente, o monitoramento da resistência a *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) tem sido baseado na utilização de proteína Bt purificada, entretanto, estes métodos são caros e dependem de estrutura e técnicos especializados. Neste estudo, foi avaliado um método prático para o monitoramento da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) a diferentes tecnologias de milho e algodão Bt, a partir da avaliação da sobrevivência de larvas neonatas em folhas de plantas Bt em populações de *S. frugiperda* provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás e Bahia na safra agrícola 2014/15. Mais de 70% de sobrevivência larval foi observada no milho Herculex® para populações de campo provenientes do Paraná, Goiás e Bahia. Em tecnologias de milho PowerCore™ e YieldGard VT PRO™ houve sobrevivência larval variando de 1,1 a 17,9%. Em contraste, não houve sobreviventes em tecnologias de milho Viptera™. Em algodão WideStrike®, sobrevivência acima de 41% foi observada para populações de campo de *S. frugiperda*. Menor sobrevivência foi observada em Bollgard II®, variando de 14 a 40%. No algodão TwinLink®, a sobrevivência larval foi menor que 20%. O método de bioensaio em folha demonstrou ser prático para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a tecnologias de milho e algodão Bt no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Milho Bt; Algodão Bt; Manejo da resistência

Abstract

The development of practical methods for monitoring insect resistance to insecticides is crucial for implementing Insect Resistance Management (IRM) programs. Currently, resistance monitoring methods to *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) are based on the use of purified Bt proteins, but this method requires specialized facilities and laboratory technicians. In this study, we developed a practical method for monitoring the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) to Bt maize and cotton technologies by evaluating the neonate larval survival on Bt leaf tissue in *S. frugiperda* populations collected from Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás and Bahia on 2014/15 growing season. More than 70% larval survival was observed in Herculex® maize in field populations of *S. frugiperda* from Paraná, Goiás and Bahia. In PowerCore™ and YieldGard VT PRO™ maize technologies, larval survival ranged from 1.1 to 17.9%. In contrast, no larval survival was observed on Viptera™ maize technologies. In Bt cotton technologies, more than 41% of neonates from field populations of *S. frugiperda* survived on WideStrike®. The larval survival in Bollgard II® ranged from 14 to 40%. In TwinLink® the larval survival was lower than 20%. The leaf bioassay method demonstrated to be practical for susceptibility monitoring of *S. frugiperda* to Bt maize and cotton in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Bt maize; Bt corn; Resistance management

3.1 Introdução

Para avaliar a efetividade das estratégias de manejo da resistência de insetos a inseticidas em retardar ou evitar a evolução da resistência tem sido comumente utilizadas técnicas de monitoramento fenotípico e genotípico da resistência. Especificamente para proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) expressas em plantas geneticamente modificadas, diversos métodos de bioensaio para o monitoramento da resistência têm sido utilizados, tais como: bioensaios de linha-básica de suscetibilidade com incorporação da proteína Bt na dieta artificial (LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999) ou aplicação na superfície da dieta (MARÇON et al., 1999; FARIAS et al., 2014b; BERNARDI et al., 2014a); bioensaios com concentração diagnóstica de proteínas Bt em dieta (MARÇON et al., 2000; BERNARDI, O. et al., 2015b); F₂ screen com proteína Bt em dieta artificial ou expressas em folhas de plantas Bt (ANDOW and ALSTAD, 1998; BERNARDI, D. et al., 2015; BERNARDI, O. et al., 2015b); F₁ screen (GOULD et al, 1997); parcelas sentinelas (VENETTE et al., 2000) e marcadores moleculares (MORIN et al., 2004). O uso de técnicas de monitoramento da resistência possibilita identificar potenciais decréscimos de base genética na suscetibilidade de populações de campo e subsidiar as estratégias de manejo e mitigação da resistência (ROUSH; MILLER, 1986; ANDOW; IVES, 2002; ANDOW, 2008). Entretanto, a maioria destes métodos depende de estrutura de laboratório e métodos complexos. Métodos práticos têm sido desenvolvidos para o monitoramento da resistência a inseticidas, visando principalmente à redução de custo, além da simplicidade, facilidade e agilidade de execução (DENNEHY et al., 1987; MAGARO; EDELSON, 1990; BISHOP; GRAFIUS, 1991).

No Brasil, plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas Bt tem sido amplamente utilizadas para o controle de insetos-praga. A área total com tecnologias Bt durante 2014-2015 foi de 18,5 milhões de hectares, dos quais 64,1; 33,8 e 2,1% cultivados com milho, soja e algodão, respectivamente (CÉLERES, 2015). A maioria das tecnologias de milho e algodão Bt tem como praga-alvo de controle *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Essa espécie é considerada a mais destrutiva do milho, podendo ocasionar perdas de até 60% na produção (BARROS et al., 2010). Além do milho, tem sido um dos principais insetos-praga desfolhador do algodão (MARTINELLI et al., 2006). Além da

desfolha, *S. frugiperda* também ataca as estruturas reprodutivas do algodão (ALI; LUTTRELL, 1990, LUTTRELL; MINK, 1999).

No Brasil, tecnologias de milho e algodão Bt têm sido amplamente utilizadas no controle de *S. frugiperda* (OKUMURA et al., 2013; WAQUIL et al., 2013; BERNARDI, O. et al., 2015a; SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015). Entretanto, a alta adoção de plantas Bt e a expressão contínua de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* impõem elevada pressão de seleção nas populações das pragas-alvo, favorecendo a evolução da resistência (McGAUGHEY; WHALON, 1992). No Brasil, a evolução da resistência a campo de *S. frugiperda* foi reportada às proteínas Cry1F e Cry1Ab (FARIAS et al., 2014a; OMOTO et al., 2016). Resistência a campo de *S. frugiperda* também foi reportada para o milho Cry1F em Porto Rico (STORER et al., 2010). Diante da rápida evolução da resistência a Cry1F e decréscimo da suscetibilidade de *S. frugiperda* a outras tecnologias Bt utilizadas no Brasil se faz necessário o refinamento das estratégias de manejo da resistência. Sendo assim, o uso de técnicas de monitoramento que resultem em dados diretos da suscetibilidade de populações de campo de *S. frugiperda* podem auxiliar no direcionamento destas estratégias. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar um método prático de monitoramento da suscetibilidade de populações de campo de *S. frugiperda* a tecnologias de milho e algodão Bt no Brasil, baseando-se na sobrevivência de lagartas neonatas em bioensaios com folhas de plantas Bt em laboratório.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Populações de *S. frugiperda*

Para avaliar a suscetibilidade de *S. frugiperda* a plantas Bt disponíveis comercialmente no Brasil, populações de campo desta espécie praga foram coletadas em regiões geográficas distintas (Tabela 1). Todas as populações foram coletadas em plantios comerciais de milho não-Bt (700-1000 lagartas/localidade). Após a coleta, as lagartas de *S. frugiperda* foram mantidas em bandejas plásticas de 16 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil), contendo a dieta artificial proposta por Kasten, Preceti e Parra (1978), onde permaneceram até a fase de pupa (1 lagarta por célula). As pupas foram acondicionadas em gaiolas de PVC (policloreto de vinila, de 24 cm de altura × 14,5 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior e inferior com pratos de acrílico, sendo que o prato inferior foi forrado com papel filtro umedecido.

Após a emergência, os adultos foram agrupados em aproximadamente 20 casais nas mesmas gaiolas de PVC e alimentados com uma solução aquosa de mel a 10% fornecida em algodão. Os ovos foram recolhidos a cada 2 dias e mantidos em copos plásticos (100 ml) contendo papel filtro umedecido. Após a eclosão, as neonatas foram transferidas para copos plásticos (100 ml) contendo dieta artificial até atingirem o terceiro ínstar larval. Aproximadamente 350 lagartas de terceiro ínstar foram individualizadas em copos plástico de 50 ml contendo dieta artificial e fechadas com tampa acrílica, onde permaneceram até a fase de pupa. Os procedimentos foram repetidos até se obter ovos da geração F₂, as quais foram utilizados nos bioensaios. Os insetos foram mantidos a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h.

A população suscetível de referência (Sus) foi obtida da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, e mantida em laboratório sobre dieta artificial por mais de 10 anos, livre da pressão de seleção de inseticidas e proteínas Bt.

Tabela 3.1 - Populações de campo de *S. frugiperda* utilizados no estudo de monitoramento prático

População	Cidade, Estado	Fazenda	Latitude	Longitude	Data de coleta
Sus	Sete Lagoas, MG	EMBRAPA	-	-	-
RS	Não-Me-Toque, RS	Granja Resse	28°16'19" S	52°27'44" W	Nov. 2014
SP	Casa Branca, SP	Cocais do Rio Verde	21°30'02" S	47°00'34" W	Nov. 2014
PR	Palotina, PR	Estância Garbin	24°07'26" S	53°30'21" W	Nov. 2014
GO	Água Fria de Goiás, GO	Água Fria	15°00'18" S	47°47'58" W	Dez. 2014
BA	Correntina, BA	Sementes Talismã	13°40'37" S	45°40'40" W	Dez. 2014

3.2.2 Plantas Bt

A sobrevivência larval de populações *S. frugiperda* foi avaliada em cinco tecnologias de milho Bt e três de algodão Bt cultivadas comercialmente no Brasil (Tabela 2). O tratamento controle foi constituído de plantas de milho e algodão não-Bt. O cultivo das plantas foi realizado a campo, na densidade de 10 plantas por metro linear e espaçamento entre linhas de 0.5 m. Antes de bioensaios, todas as plantas foram avaliadas quanto à expressão de proteínas inseticidas mediante uso de kits de detecção de proteína Bt (Envirologix, Quick Stix).

Tabela 3.2 - Tecnologias de milho e algodão Bt utilizadas no estudo

Planta	Nome comercial	Abreviação	Evento	Proteína Bt
Tecnologias de milho				
2B587	Herculex®	HX	TC1507	Cry1F
2B587	PowerCore™	PW	MON89034 + TC1507	Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F
DKB 390	YieldGard VT PRO™	VT	MON89034	Cry1A.105/Cry2Ab2
MAXIMUS	Agrisure Viptera™ 3	VIP3	Bt11 + MIR162	Cry1Ab/VIP3Aa20
MAXIMUS	Agrisure Viptera™	VIP	MIR162	VIP3Aa20
2B587	Não-Bt	N-Bt	-	-
Tecnologias de algodão				
FM 975	WideStrike®	WS	281-24-236 + 3006-210-23	Cry1Ac/Cry1F
DP 1228	Bollgard II®	BGII	MON15985	Cry2Ab2/Cry1Ac
FM 940	TwinLink®	TL	T304-40 + GHB119	Cry1Ab/Cry2Ae
FM 993	Não-Bt	N-Bt	-	-

3.2.3 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados com plantas nos estádios fenológicos V₄ a V₈ (milho) e B₁ a B₄ (algodão). Nos bioensaios com plantas milho, as folhas completamente expandidas foram retiradas da região do “cartucho” do milho, e nos bioensaios com plantas de algodão, as folhas foram removidas do terço superior das plantas. Em laboratório, as folhas foram lavadas com água e, após secagem, cortadas em pedaços de ~4 cm². Em seguida, as folhas foram acondicionadas sobre uma mistura gelificada de ágar-água a 2% em placas plásticas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil). Em cada célula foram infestadas três neonatas (<24 h de idade). Em seguida, as placas foram vedadas com as respectivas tampas plásticas e acondicionadas em sala climatizada a 27 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase 14 h. Para cada população de *S. frugiperda* e planta Bt foram utilizadas 10 repetições (placas), com 96 lagartas/repetição. A sobrevivência larval foi avaliada aos 4 dias.

3.2.4 Análise estatística

Um modelo linear generalizado com distribuição do tipo binomial foi utilizado para a análise dos dados de sobrevivência, com evento e população como fatores de efeito fixo. As sobrevivências de populações de campo de *S. frugiperda* em milho e algodão Bt foram analisadas separadamente. O número de indivíduos testados em plantas Bt foi agrupado e a proporção de

sobreviventes foi utilizada para a entrada de dados, de forma que todos os tratamentos tivessem mesmo número de repetições (quatro) para a análise. A verificação da qualidade do ajuste foi feita pelo gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação conforme proposto por Demétrio et al. (2014). Quando houve diferença significativa na análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P = 0,05$), por meio da função "glht" do pacote "multcomp" no software estatístico R, versão 3.1.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3.3 Resultados

3.3.1 Sobrevivência de *S. frugiperda* em tecnologias de milho Bt

Houve interação significativa entre a tecnologia de milho Bt e população de *S. frugiperda* ($df = 25$, 14364; $Pr > \chi^2 < 0,0001$). O efeito foi significativo para a tecnologia de milho Bt ($df = 5$, 14389; $Pr > \chi^2 < 0,0001$) e população ($df = 5$, 14394; $Pr > \chi^2 < 0,0001$). Em milho Herculex[®], as populações PR, GO e BA de *S. frugiperda* apresentaram alta sobrevivência larval, variando de 70 a 80% (Figura 1). Em contraste, a sobrevivência das populações oriundas do RS e SP foi significativamente menor, 60,3 e 44,3%, respectivamente. Em milho PowerCore[™], as populações PR e BA tiveram sobrevivência superior a 14% (Figura 1). Nessa tecnologia de milho Bt, as populações RS, SP e GO apresentaram sobrevivência inferior a 5%, não diferindo entre si. Em milho YieldGard VT PRO[™], a sobrevivência da população BA (13,4%) não diferiu daquela da população RS (10,0%); em contraste, as populações SP, PR e GO apresentaram sobrevivência inferior a 7%. Em milho Agrisure Viptera[™] 3 e Agrisure Viptera[™] não houve sobreviventes de populações de campo de *S. frugiperda* (Figura 1). Em milho não-Bt, a sobrevivência foi superior a 64% para todas as populações.

Figura 3.1 - Sobrevivência de populações de *Spodoptera frugiperda* em folhas de milho Bt e não-Bt aos quatro dias. Colunas representam a média de sobrevivência. Barras de erro ($\pm$ EP) com as mesmas letras dentro de evento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). *Dados excluído da análise devido à ausência de variabilidade

As populações de campo RS, SP, PR, GO e BA de *S. frugiperda* apresentaram sobrevivência larval em milho Herculex® variando de 44% (população RS) a 79,5% (população BA) (Tabela 3). A sobrevivência dessas populações em milho Herculex® foi sempre superior daquela em milho PowerCore™ (1,1 a 14,8%), YieldGard VT PRO™ (3,5 a 13,4%), Agrisure Viptera™ e Agrisure Viptera™ 3 (sem sobreviventes) (Tabela 3). As populações RS, SP, GO e BA tiveram similar sobrevivência larval em milho PowerCore™ e YieldGard VT PRO™. Por outro lado, a sobrevivência da população PR foi significativamente maior em milho PowerCore™ do que em YieldGard VT PRO™. Em contraste, a população Sus não sobreviveu em qualquer tecnologia de milho Bt. Para todas as populações de campo e população Sus a sobrevivência larval foi superior a 64% em milho não-Bt (Tabela 3). As populações RS e BA apresentaram sobrevivência similar em milho não-Bt e Herculex®.

Tabela 3.3 - Sobrevivência ($\pm$ EP) larval de populações de *S. frugiperda* em folhas de milho Bt e não-Bt aos quatro dias

Milho Bt	População de <i>S. frugiperda</i> ¹					
	RS	SP	PR	GO	BA	Sus
Herculex [®]	60,3 $\pm$ 2,7 a	44,3 $\pm$ 1,8 b	70,8 $\pm$ 1,0 b	77,7 $\pm$ 4,8 b	79,5 $\pm$ 2,6 a	0,0 $\pm$ 0,0*
PowerCore [™]	4,9 $\pm$ 1,7 b	3,8 $\pm$ 1,0 c	17,9 $\pm$ 1,7 c	1,1 $\pm$ 0,8 c	14,8 $\pm$ 1,7 b	0,0 $\pm$ 0,0*
YieldGard VT PRO [™]	10,0 $\pm$ 1,5 b	6,8 $\pm$ 1,6 c	3,5 $\pm$ 1,0 d	4,4 $\pm$ 1,9 c	13,4 $\pm$ 1,8 b	0,0 $\pm$ 0,0*
Agrisure Viptera [™]	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*
Agrisure Viptera [™] 3	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,0 $\pm$ 0,0*
Não-Bt	68,5 $\pm$ 3,7 a	64,8 $\pm$ 5,6 a	79,7 $\pm$ 3,7 a	87,1 $\pm$ 2,0 a	79,9 $\pm$ 3,4 a	99,5 $\pm$ 0,3 a

* Dados excluído da análise devido a ausência de variabilidade.

¹Médias ($\pm$ EP) seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

3.3.2 Sobrevivência de *S. frugiperda* em tecnologias de algodão Bt

Houve interação significativa entre a tecnologia de algodão Bt e população de campo de *S. frugiperda* ($df = 15$, 9576; $Pr > \chi^2 < 0,0001$). O efeito foi significativo para tecnologia de algodão Bt ($df = 3$, 9591; $Pr > \chi^2 < 0,0001$) e população ($df = 5$, 9594; $Pr > \chi^2 < 0,0001$). Em WideStrike[®], a população BA (90% de sobrevivência) apresentou sobrevivência significativamente maior das demais populações de campo (Figura 2). Nesta tecnologia de algodão Bt, as populações SP, PR e GO apresentaram sobrevivência variando de 59 a 65%. Em contraste, em WideStrike[®] a população RS foi aquela que apresentou a menor sobrevivência (inferior a 42%) (Figura 2). Em Bollgard II[®], a população RS apresentou a maior sobrevivência larval (40%) (Figura 2). Nessa tecnologia de algodão Bt, as demais populações apresentaram sobrevivência larval variando de 14 a 40% (Fig. 2). Em TwinLink[®], as populações RS, PR e BA apresentaram sobrevivência variando de 13,6 a 20,2 (Figura 2). Em contraste, a sobrevivência das populações SP e GO foi inferior a 8,7%. A sobrevivência de todas as populações de campo em algodão não-Bt foi superior a 71% (Figura 2).

Figura 3.2 - Sobrevivência de populações de *Spodoptera frugiperda* em folhas de algodão Bt e não-Bt aos quatro dias. Colunas representam a média de sobrevivência. Barras de erro ($\pm$ EP) com as mesmas letras dentro de evento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). *Dado excluído da análise devido à ausência de variabilidade

As populações de campo SP, PR, GO, BA de *S. frugiperda* apresentaram sobrevivência significativamente superior (>59%) em WideStrike®, quando comparado a sobrevivência nas demais tecnologias de algodão Bt (Tabela 4). A população RS em WideStrike® e Bollgard II® teve similar sobrevivência (~40%). Enquanto que a sobrevivência das demais populações foi inferior a 30% em Bollgard II® (Tabela 4). A sobrevivência das populações RS, SP, GO e BA em Bollgard II® foi significativamente maior do que em TwinLink®. Por outro lado, a população PR apresentou similar sobrevivência em Bollgard II® e TwinLink® (20 a 26%). A população Sus apresentou sobrevivência larval inferior a 9% em WideStrike® e Bollgard II®, e não houve sobreviventes em TwinLink®. Em contraste, em algodão não-Bt a sobrevivência foi superior a 80% em todas as populações de campo e população Sus.

Tabela 3.4 - Sobrevivência ($\pm$ EP) larval de populações de *S. frugiperda* em folhas de algodão Bt e não-Bt aos quatro dias

Algodão Bt	População de <i>S. frugiperda</i> ¹					
	RS	SP	PR	GO	BA	Sus
WideStrike®	41,3 $\pm$ 1,9 b	64,3 $\pm$ 2,9 b	62,7 $\pm$ 2,2 a	59,9 $\pm$ 2,8 b	92,6 $\pm$ 1,4 a	2,1 $\pm$ 1,2 c
Bollgard II®	40,2 $\pm$ 3,5 b	14,7 $\pm$ 3,6 c	26,0 $\pm$ 3,5 b	20,3 $\pm$ 3,1 c	29,2 $\pm$ 3,3 c	8,3 $\pm$ 3,8 b
TwinLink®	13,6 $\pm$ 1,7 c	8,7 $\pm$ 1,8 d	20,2 $\pm$ 3,2 b	3,1 $\pm$ 0,6 d	16,5 $\pm$ 2,0 d	0,0 $\pm$ 0,0*
Não-Bt	87,2 $\pm$ 2,2 a	77,4 $\pm$ 4,6 a	71,5 $\pm$ 4,5 a	81,8 $\pm$ 1,9 a	80,2 $\pm$ 3,6 b	95,8 $\pm$ 4,2 a

* Dados excluído da análise devido a ausência de variabilidade.

¹Médias ($\pm$ EP) seguidos de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

3.4 Discussão

O uso de bioensaios com folhas de milho e algodão Bt foi eficaz para a avaliação da suscetibilidade de populações de campo de *S. frugiperda* a tecnologias Bt. Em diversos estudos, folhas de plantas Bt têm sido usadas para o monitoramento genotípico da frequência dos alelos de resistência (BOURGUET et al., 2003; WENES et al., 2006; HUANG et al., 2008; LIU et al., 2008; YUE et al., 2008; HUANG et al., 2009; ENGELS et al., 2010; HUANG et al., 2014; BERNARDI, O. et al., 2015b). No entanto, para o monitoramento fenotípico da frequência de resistência ainda tem sido pouco usados (STORER et al., 2012; BERNARDI, D. et al., 2015). Bioensaios com folhas tem a vantagem de ser mais práticos, pois independe de proteínas Bt purificadas de alto custo e disponibilidade limitada (SIEGFRIED et al., 2007), sendo necessário apenas a aquisição de sementes e o cultivo das plantas. Além disso, este método fornece a sobrevivência dos insetos próxima aquela esperada sobre determinada cultura Bt em condições de campo. Atualmente, o monitoramento da resistência tem sido realizado isoladamente com apenas uma proteína, entretanto, estudos recentes mostram que há interação entre proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* (LEMES et al., 2014; LI; BOUWER, 2014). Neste sentido, levando em consideração o sinergismo ou antagonismo entre as proteínas expressas na planta, a avaliação da sobrevivência em folha Bt nos fornece resultados mais realísticos. Além disso, o monitoramento deve fornecer informações para subsidiar a mudança ou a manutenção das estratégias de MRI antes ocorram falhas generalizadas de controle no campo devido à resistência (ROUSH; MILLER, 1986; ANDOW; IVES, 2002; ANDOW, 2008). Frequentemente, o aumento da

sobrevivência é percebido tardiamente, quando a frequência do alelo da resistência aumentou em populações de campo (ANDOW, 2002). Em conjunto com o monitoramento em laboratório, o uso de parcelas sentinelas no campo (VENNETE et al., 2010) pode ser implementado, dispondo dos mesmos benefícios de praticidade e simplicidade do monitoramento em folha para fornecer resultados diretos da suscetibilidade das populações no campo, acrescentando-se como ferramenta auxiliar no monitoramento da frequência de resistência.

Nos bioensaios com folhas foi detectada uma alta sobrevivência de populações de campo de *S. frugiperda* em milho Herculex[®]. Esse resultado corrobora a elevada frequência de resistência detectada nos bioensaios com uso de concentração discriminatória de Cry1F aplicada na superfície da dieta, durante as safras 2012/13 (FARIAS et al., 2014b). De modo similar, uma estabilidade na frequência da resistência também foi reportada para populações de *S. frugiperda* de Porto Rico (STORER et al., 2012). Em milho Herculex[®], além da sobrevivência de indivíduos de genótipo homozigoto resistente, espera-se também a sobrevivência de uma fração dos indivíduos de genótipo heterozigoto. Isso se deve a expressão *in-planta* da proteína Cry1F em baixa dose, o que permite a sobrevivência de heterozigotos (FARIAS et al., 2015). Sem dúvida, esse aspecto foi um dos principais responsáveis pela rápida evolução da resistência em populações de campo de *S. frugiperda* a proteína Cry1F em Porto Rico (STORER et al., 2012) e no Brasil (FARIAS et al., 2014a). Além disso, outros fatores como: baixa adoção de áreas de refúgio, elevado número de gerações da praga e alta adoção do milho Herculex[®] também favoreceram para a evolução da resistência em *S. frugiperda*.

Em milho PowerCore[™] e YieldGard VT PRO[™] a sobrevivência de populações de campo de *S. frugiperda* foi menor daquela em milho Herculex[®]. No entanto, o fato de haver sobreviventes é preocupante, pois esses indivíduos são aqueles de genótipo homozigoto resistente, pois ambas as tecnologias tem expressão *in-planta* das proteínas Bt em níveis que constituem alta dose contra *S. frugiperda* (BERNARDI, O. et al., 2015a). Essa sobrevivência se deve a existência de resistência cruzada entre Cry1F e Cry1A.105 presentes em milho PowerCore[™] (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; VÉLEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014; BERNARD, D. et al., 2015). Além disso, mesmo não havendo resistência cruzada com a proteína Cry2Ab2 presente em milho PowerCore[™] e YieldGard VT PRO[™], a expressão dessa proteína Bt não é alta o suficiente para ocasionar alta mortalidade dos indivíduos resistentes (NIU et al., 2013). Os resultados deste estudo confirmam os dados reportados recentemente por

Bernardi, D. et al. (2015), os quais detectaram uma elevada frequência fenotípica da resistência ao milho YieldGard VT PRO™ em populações de campo *S. frugiperda* no Brasil, especialmente aquelas oriundas da Bahia e Goiás. Esses resultados demonstram que as estratégias de manejo da resistência tem tido pouco sucesso em retardar ou evitar a evolução de resistência a tecnologias de milho Bt nas condições de cultivo do Brasil.

Nas tecnologias de milho Agrisure Viptera™ e Agrisure Viptera™ 3, nenhuma população de campo *S. frugiperda* apresentou larvas sobreviventes. Esses resultados confirmam a baixa frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 observada entre 2013 a 2015 por Bernardi, O. et al. (2015b). Além disso, diversos estudos demonstram que não há resistência cruzada entre Vip3A e proteínas do grupo Cry1 (NIU et al., 2013; VÉLEZ, et al., 2013; NIU, et al., 2014; HUANG et al., 2014). Nesse contexto, a elevada frequência de resistência de *S. frugiperda* a Cry1F no Brasil não tem afetado a eficácia das tecnologias de milho Viptera™ em controlar essa espécie. No contexto de manejo da resistência, a proteína Vip3Aa20 é fundamental para reduzir a frequência de resistência a proteínas do grupo Cry1 em populações de *S. frugiperda*, e vice-versa.

Os resultados observados para as populações refletem o número de pulverizações que são realizadas na cultura do milho. Quanto maior a sobrevivência de *S. frugiperda* nos bioensaios em folha, maior o número de pulverizações realizadas no campo. Na região oeste da Bahia, são realizadas em média, 6 pulverizações de inseticidas em milho Herculex® para o controle de *S. frugiperda*, sendo que o milho convencional recebe o mesmo número de pulverizações (OMOTO, C., informação verbal). Em tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, são realizadas de 2 a 4 pulverizações, enquanto que em milho Viptera™ não é necessário o uso de inseticidas para o controle de *S. frugiperda* (OMOTO, C., informação verbal).

De modo similar a tecnologias de milho Bt, na maioria das tecnologias de algodão Bt também houve sobrevivência de populações de campo de *S. frugiperda*. Em algodão WideStrike® que expressa Cry1F/Cry1Ac a sobrevivência de neonatas de *S. frugiperda* foi superior a 41%. Isso se deve, em parte, a evolução da resistência dessa espécie a Cry1F expressa em milho Herculex®. Um exemplo disso pode ser percebido em nosso estudo, no qual a população oriunda da Bahia foi aquela que apresentou maior sobrevivência em algodão WideStrike® e também em milho Herculex®. Este resultado evidencia que a sobrevivência de populações de *S. frugiperda* no

milho Bt afeta negativamente a eficiência das tecnologias de algodão Bt. Além disso, a baixa toxicidade de Cry1Ac não tem potencial ocasionar elevada mortalidade para de *S. frugiperda* (SIVASUPRAMANIAM et al., 2008; ARMSTRONG; ADAMCZYK JR.; GREENBERG, 2011; BERNARDI et al., 2014b; SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015). Soma-se a isso o fato de ocorrer resistência cruzada entre Cry1F e Cry1Ac (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013).

Nas tecnologias de algodão Bollgard II[®] (Cry1Ac/Cry2Ab2) e TwinLink[®] (Cry1Ab/Cry2Ae), as proteínas Cry1Ac e Cry1Ab apresentam baixa atividade biológica contra *S. frugiperda*, além de resistência cruzada com Cry1F (ADAMCZYK et al., 2008; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; VÉLEZ et al., 2013; JAKKA et al., 2014). Sendo assim, as proteínas Cry2Ab2 e Cry2Ae são as que principais responsáveis pela mortalidade de *S. frugiperda*. Entretanto, a expressão de Cry2Ab2 em algodão Bollgard II[®] parece não ser suficientemente alta para ocasionar mortalidade completa de *S. frugiperda* (ARMSTRONG; ADAMCZYK JR.; GREENBERG, et al., 2011; SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015). Embora não haja estudos de suscetibilidade de *S. frugiperda* a Cry2Ae, esta parece apresentar elevada toxicidade contra essa espécie. Em nosso estudo, o algodão TwinLink[®] foi aquele que ocasionou relativamente a maior mortalidade de populações de campo de *S. frugiperda*.

Em resumo, uma alta sobrevivência das populações de *S. frugiperda* oriundas de diferentes estados do Brasil foi detectada em laboratório para diversas tecnologias de milho e algodão Bt. Isso é um indicativo que as estratégias de manejo da resistência não estão sendo efetivas em retardar ou evitar a evolução da resistência. A alta sobrevivência de populações de *S. frugiperda* em milho Bt está ocasionando redução da eficiência de tecnologias de algodão Bt. Nesse cenário, várias tecnologias de milho e algodão Bt disponíveis para cultivo comercial estão e podem se tornar ineficientes no controle de *S. frugiperda* em curto prazo, e o aumento do uso de inseticidas é consequência deste fato. Nesse contexto, o uso efetivo de estratégias de manejo de resistência, especialmente o aumento na adoção de áreas de refúgio é urgente no atual sistema de produção de cultivos do Brasil. Paralelamente, o contínuo monitoramento da resistência é parte essencial de programas de manejo da resistência para avaliar a efetividade das estratégias de manejo usadas manejo da resistência. Nesse sentido, bioensaio com folhas de plantas Bt podem ser uma opção viável de monitoramento, pois é um método rápido, prático de fácil execução permitindo que seja realizado em nível de propriedade rural (fazenda) pelo próprio agricultor.

3.5 Conclusões

- O monitoramento prático da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a tecnologias Bt mediante uso de folhas de plantas Bt é eficiente.
- A maior sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* para as tecnologias de milho Bt é observada para Herculex® na safra agrícola 2014/2015, seguidas das tecnologias PowerCore™ e YieldGard VT PRO™. Não há sobreviventes em Viptera™.
- A maior sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* para as tecnologias de algodão Bt é observada para WideStrike®, seguidas pelas tecnologias Bollgard II® e TwinLink® na safra agrícola 2014/2015.

Referências

- ADAMCZYK JR., J.J.; GREENBERG, S.; ARMSTRONG, J.S.; MULLINS, W.J.; BRAXTON, L.B.; LASSITER, R.B.; SIEBERT, M.W. Evaluations of Bollgard®, Bollgard II®, and Widestrike® technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 3, p. 531-536, 2008.
- ALI, A.; LUTTRELL, R.G.; PITRE, H.N. Feeding sites and distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n. 4, p. 1060-1067, 1990.
- ANDOW, D.A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.
- 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.
- ANDOW, D.A.; IVES, A.R. Monitoring and adaptive resistance management. **Ecological Applications**, Tempe, v. 12, p. 1378-1390, 2002.
- ARMSTRONG, J.S.; ADAMCZYK JR., J.J.; GREENBERG, S.M. Efficacy of single and dual gene cotton *Gossypium hirsutum* events on neonate and third instar fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* development based on tissue and meridic diet assays. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 94, n. 2, p. 262-271, 2011.
- BARROS, E M.; TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R.; OLIVEIRA, M.D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p. 237-245, 2010.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. 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.

BERNARDI, O.; AMADO, D.; SOUSA, R.S.; SEGATTI, F.; FATORETTO, J.; BURD, A.; OMOTO, C. Baseline susceptibility and monitoring of brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 2, p. 781-790, 2014a.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; AMADO, D.; SOUSA, R.S.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.; CONVILLE, J.; BURD, T.; OMOTO, C. Resistance risk assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 2015a.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R.S.; OKUMA, D.M.; SALMERON, E.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.L.; BURD, T.; OMOTO, C. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015b.

BERNARDI, O.; SORGATO, R.J.; BARBOSA, A.D.; DOMINGUES, F.A.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop protection**, Guildford, v. 5, n. 4, p. 33-40, 2014b.

BISHOP, B.A.; GRAFIUS, E. An on-farm insecticide resistance test kit for colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **American Potato Journal**, Orono, v.68, n.1, p.53-64, 1991.

BOURGUET, D.; CHAUFAX, J.; SÉGUIN, M.; BUISSON, C.; HINTON, J.L.; STODOLA, T.J.; PORTER, P.; CRONHOLM, G.; BUSCHMAN, L.L.; ANDOW, D. A. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 7, p. 1225-1233, 2003.

CÉLERES. 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2014/15. In: Informativo Biotecnologia. Disponível em: <http://www.celeres.com.br/docs/biotecnologia/IB1501_150611.pdf>. Acesso em: 13 Out. 2015.

DEMÉTRIO, C.G.; HINDE, J.; MORAL, R.A. Models for overdispersed data in entomology. In: FERREIRA, C.P.; GODOY, W.A. (Ed.). **Ecological Modelling Applied to Entomology**. Switzerland: Springer, 2014. chap. 9, p. 219-259.

DENNEHY, T.J.; GRAFTON-CARDWELL, E.E.; GRANETT, J.; BARBOUR, K. Practitioner-assessable bioassay for detection of dicofol resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 80, n. 5, p. 998-1003, 1987.

ENGELS, H.; BOURGUET, D.; MANACHINI, B.; SCHUPHAN, I.; STODOLA, T. J.; MICOUD, A.; BRAZIER, C.; MOTTET, C.; ANDOW, D.A. Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F-2 screen in european populations of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 5, p. 1803-1809, 2010.

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, 150-158, 2014a.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; DOS SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, 2015.

FARIAS, J.R.; HORIKOSHI, R.J.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 6, p. 2182-2189, 2014b.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARD, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3519–3523, 1997.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, Berkeley, v. 8, n. 7, p. e68164, 2013.

HUANG, F.; LEONARD, B.R.; MOORE, S.H.; COOK, D.R.; BALDWIN, J.; TINDALL, K.V.; LEE, D. R. Allele frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab corn in Louisiana populations of sugarcane borer (Lepidoptera : Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 2, p. 492-498, 2008.

HUANG, F.; PARKER, R.; LEONARD, R.; YONG, Y.; LIU, J. Frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis*-corn in Texas populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 2, p. 174-180, 2009.

HUANG, F.; QURESHI, J.A.; MEAGHER JR. R.L.; REISIG, D.D.; HEAD, G.P.; ANDOW, D.A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G.D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F Resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e112958, 2014.

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 122, p. 52-54, 2014.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014**. ISAAA Brief No. 49, International Service for the Acquisition of Ag-biotech Applications, Ithaca, New York. 2013.

KASTEN Jr, P.; PRECETI, 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. 1/2, p. 68-78, 1978.

LEMES, A.R.N.; DAVOLOS, C.C.; LEGORI, P.C.B.C.; FERNANDES, O.A.; FERRE, J., LEMOS, M.V.F., DESIDERIO, J.A. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, Berkeley, v. 9, n.10, p. e107196, 2014.

LI, H.; BOUWER, G. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 121, p. 7-13, 2014.

LIU, F.; XU, Z.; CHANG, J.; CHEN, J.; MENG, F.; ZHU, Y.C.; SHEN, J. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in china. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 3, p. 933-943, 2008.

LUTTRELL, R.G.; MINK, J.S. Damage to cotton fruiting structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Cotton Science**, Cordova, v. 3, n. 2, p. 35-44, 1999.

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.

MAGARO, J.J.; EDELSON, J.V. Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in South Texas: A technique for resistance monitoring in the field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 4, p. 1201-1206, 1990.

MARCON, P.C.R.G.; SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.A.; HUTCHINSON, W.D. Development of Diagnostic Concentrations for Monitoring *Bacillus thuringiensis* Resistance in European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 925-930, 2000.

MARÇON, P.C.R.G.; YOUNG, L.J.; STEFFEY, K.L.; SIEGFRIED, B.D. Baseline susceptibility of european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 2, p. 279-285, 1999.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; CASTROSILVA-FILHO, M.; 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. 2, p. 519-526, 2006.

McGAUGHEY, W.H.; WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science**, Washington, v. 258, n. 5087, p. 1451-1555, 1992.

MORIN, S.; HENDERSON, S.; FABRICK, J.A.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; BROWN, J.K.; TABASHNIK, B.E. DNA-based detection of Bt resistance alleles in pink bollworm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1225-1233, 2004.

NIU, Y.; MEAGHER JR., R.L.; YANG, F.; HUANG, F. Susceptibility of field populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to purified Cry1F protein and corn leaf tissue containing single and pyramided Bt genes. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 96, n. 3, p. 701-713, 2013.

NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V.; HUANG, F. Larval survival and plant injury of Cry1 F-susceptible, -resistant, and -heterozygous fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt corn containing single or pyramided genes. **Crop Protection**, Guildford, v. 59, p. 22-28, 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**, Sussex, 2016. In press.

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; DALLACORT, R.; ZORZENONI, T.O.; ZACCHEO, P.V.C.; NETO, C.F.O.; CONCEIÇÃO, H.E.O.; LOBATO, A.K.S. Agronomic efficiency of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize hybrids in pests control on Lucas do Rio Verde city, State of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural**, v. 8, n. 19, p. 2232-2239, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

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.

SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; CRESPO, A.L.; STORER, N.P.; HEAD, G.P.; OWENS, E.D.; GUYER, D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. **American Entomologist**, Lanham, v. 53, p. 208–214, 2007.

SIVASUPRAMANIAM, S.; MOAR, W.J.; RUSCHKE, L.G.; OSBORN, J.A.; JIANG, C.; SEBAUGH, J.L.; BROWN, G.R.; SHAPPLEY, Z.W.; OPPENHUIZEN, M.E.; MULLINS, J.W.; GREENPLATE, J.T. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 2, p. 546-554, 2008.

SORGATTO, R. J.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Survival and development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt cotton and implications for resistance management strategies in Brazil. **Environmental Entomology**, College Park, v. 44, n.1, p. 186-192, 2015.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

STORER, N.P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.E.; THOMPSON, G.D.; SANTOS, A.C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.

VÉLEZ, A., SPENCER, T.A.; ALVES, A.P.; MOELLENBECK, D.; MEAGHER, R.L.; CHIRAKKAL, H.; SIEGFRIED, B.D. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 103, n. 6, p. 700-713, 2013.

VENETTE, R.C.; HUTCHISON, W.D.; ANDOW, D.A. An in-field screen for early detection and monitoring of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* in transgenic crops. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 4, p. 1055-1064, 2000.

WAQUIL, J.M.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.D.; OLIVEIRA, W.S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; MARTINELLI, S. Management of Lepidopteran pests in maize crop using the Bt pyramided event Cry1A. 105 and Cry2Ab2. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 12, p. 1529-1537, 2013.

WENES, A.L.; BOURGUET, D.; ANDOW, D.A.; COURTIN, C.; CARRE, G.; LORME, P.; SANCHEZ, L.; AUGUSTIN, S. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera : Chrysomelidae). **Heredity**, London, v. 97, n. 2, p. 127-134, 2006.

YUE, B.; HUANG, F.; LEONARD, B.R.; MOORE, S.; PARKER, R.; ANDOW, D.A.; COOK, D.; EMFINGER, K.; LEE, D.R. Verifying an F1 screen for identification and quantification of rare *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in field populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 129, n. 2, p. 172-180, 2008.

4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE F₁ SCREEN PARA O MONITORAMENTO DA FREQUÊNCIA DE ALELOS DA RESISTÊNCIA A VIP3Aa20 EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL

Resumo

Os métodos de F₁ e F₂ screen têm sido comumente usados para estimar a frequência de alelos de resistência de pragas a proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner expressas em plantas transgênicas. Com a recente seleção e caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) à proteína Vip3Aa20 no Brasil, o objetivo desse estudo foi avaliar o método do F₁ screen para o monitoramento da frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20, utilizando-se da população resistente a Vip3a20 previamente caracterizada. Foram testadas nove populações de campo de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil na safra 2014/2015. Foram formadas 450 isofamílias, das quais, 263 foram testadas mediante exposição de neonatas a folhas de milho expressando Vip3Aa20 (Agrisure Viptera™). Foram detectadas três isofamílias positivas oriundas dos Estados do Paraná, Mato Grosso e Goiás, indicando que o alelo de resistência a Vip3Aa20 ocorre em populações de campo de *S. frugiperda* de diferentes estados do Brasil. A frequência de resistência variou de 0,0140 a 0,0367, com frequência total de 0,0076. No presente estudo foi confirmada a presença do mesmo alelo de resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 em diferentes regiões do Brasil, validando o método de F₁ screen para o monitoramento da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Milho Bt; Vip3A; Manejo da resistência de insetos

Abstract

F₁ and F₂ screen methods are commonly used to estimate the frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* Berliner insecticidal proteins expressed in transgenic plants. With recent selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) resistance to Vip3Aa20 protein in Brazil, the objective of this study was to evaluate the F₁ screen method for monitoring *S. frugiperda* Vip3Aa20 resistance allele frequency using the Vip3Aa20-resistant strain previously characterized. During 2014-2015 growing season, nine field-populations of *S. frugiperda* collected from maize production regions were tested. A total of 450 isofamily lines was established and family lines were tested by exposing neonate larvae on Vip3Aa20 corn leaves (Agrisure Viptera™). Three positive isofamily lines from Paraná, Mato Grosso and Goiás States were detected, indicating that the Vip3Aa20 resistance allele occurs in field populations of *S. frugiperda* from different states of Brazil. The resistance frequency ranged from 0.0140 to 0.0367, with overall frequency of 0.0076. In this study we confirmed the presence of same resistance Vip3Aa20 resistance allele in *S. frugiperda* in distinct geographical regions in Brazil, validating the F₁ screen method for resistance monitoring of *S. frugiperda* to Vip3Aa20 in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Bt maize; Vip3A, Insect resistance management

4.1 Introdução

A estratégia de manejo da resistência denominada alta-dose e refúgio tem sido proposta para prevenir ou retardar a evolução da resistência de pragas a plantas Bt (GOULD, 1998; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIERE, 2009; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIERE, 2013). Esta estratégia combina a expressão *in planta* de proteína inseticida em alta dose, que torna a resistência funcionalmente recessiva (TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIERE, 2009). Para isso, áreas de refúgio (plantas não-Bt) tem que ser cultivadas nas proximidades para permitir a multiplicação de indivíduos suscetíveis para acasalar com os raros indivíduos resistentes que estejam sobrevivendo na área de refúgio (ALSTAD; ANDOW, 1995; ANDOW; ALSTAD, 1998; GOULD, 1998; TABASHNIK, 2008).

O sucesso desta estratégia depende, entre outros fatores, da baixa frequência dos alelos de resistência (TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIERE, 2009). Nesse contexto, a estimativa e/ou monitoramento de alelos de resistência raros ou recessivos é essencial para a avaliação do risco de resistência. Para a estimativa e monitoramento de alelos de resistência em baixa frequência, métodos genotípicos como o F_1 e F_2 screen tem sido utilizados (GOULD et al., 1997; ANDOW; ALSTAD, 1998). A técnica do F_2 screen exige alto custo com mão de obra e material de criação, devido à necessidade de criação dos insetos por duas gerações para que ocorra endogamia (ANDOW; ALSTAD, 1998; SIEGFRIED et al., 2007). No Brasil, o F_2 screen foi usado durante a primeira e a segunda safras de milho de 2013 e 2014 para estimar a frequência de alelos da resistência à Vip3Aa20 em populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Nesse estudo, foi observada uma frequência inicial de alelos de resistência a Vip3Aa20 de 0,0009 (BERNARDI et al., 2015b). Por meio desse método também foi possível a seleção e estabelecimento de uma linhagem resistente de *S. frugiperda* a Vip3Aa20. O estabelecimento da população resistente via F_2 screen permite estimar a frequência de resistência pelo método de F_1 screen (GOULD et al., 1997; YUE et al., 2008).

O método F_1 screen tem a vantagem de apresentar menor custo, ser mais rápido e prático, bem como possibilita uma estimativa mais robusta da frequência de resistência (GOULD et al., 1997; MAHON et al., 2010). Este método consiste em cruzar indivíduos resistentes selecionados em laboratório com indivíduos coletados no campo, testando-se a progênie F_1 em bioensaios. Caso o indivíduo coletado a campo possua o mesmo alelo de resistência da população de

laboratório, espera-se que 50% da progênie seja homozigoto resistente e sobreviva em bioensaios discriminatórios (GOULD et al., 1997; YUE et al., 2008). O F₁ screen tem sido utilizado para estimativa de frequência de alelos de resistência em diversas espécies pragas-alvo de proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner expressas em plantas geneticamente modificadas, tais como: *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) a Cry1Ac (GOULD et al., 1997), *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) a Cry1Ab (YUE et al., 2008), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) a Cry1Ac e Cry2Ab2 (LIU et al., 2008; MAHON et al., 2010; ZHANG et al., 2012), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) a Cry1F (SIEGFRIED et al., 2014).

Com a seleção de uma população resistente de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 via F₂ screen, pode-se realizar o monitoramento da frequência de alelos de resistência via F₁ screen. No Brasil, a proteína Vip3Aa20 é expressa nas tecnologias de milho Agrisure Viptera que contém o evento MIR162 e Agrisure Viptera 3 que combina os eventos Bt11, MIR162 e GA21 que conferem resistência a insetos através da expressão de Cry1Ab e Vip3Aa20, e tolerância ao glifosato devido a expressão da enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-phosphatesynthase (EPSPS) do evento GA21 (CTNBIO, 2009). A proteína Vip3Aa20 tem demonstrado elevada toxicidade para *S. frugiperda* (BERNARDI et al., 2014) e ausência de resistência cruzada com proteínas do grupo Cry (LEE et al., 2003; JACKSON et al., 2007; GOUFFON et al., 2011). Estas características tornam a proteína Vip3Aa20 essencial para o controle e manejo da resistência de *S. frugiperda* no Brasil. Para prolongar a vida útil desta tecnologia, é essencial avaliar a efetividade das estratégias de manejo da resistência e dentro deste contexto, há necessidade de detecção de pequenas variações na frequência dos alelos de resistência pelo monitoramento.

Com a recente seleção e caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) à proteína Vip3Aa20 no Brasil (Bernardi et al., 2016), o objetivo desse estudo foi avaliar o método do F₁ screen para o monitoramento da frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 em populações de *S. frugiperda* do Brasil.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Seleção e manutenção da população resistente

A linhagem resistente de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 foi selecionada via F₂ screen a partir de uma população oriunda de Correntina, Bahia (BERNARDI et al., 2015b). Essa linhagem foi chamada de Vip-R e possui herança de resistência autossômica, monogênica e recessiva (BERNARDI et al., 2016). Após seleção, em cada geração as lagartas da linhagem Vip-R foram criadas em folhas de milho Agrisure Viptera™ (expressando Vip3Aa20) até o terceiro ínstar larval quando foram transferida para dieta artificial proposta por Kasten Júnior et al. (1978), onde permaneceram até a fase de pupa. Os adultos da linhagem Vip-R foram usados para o estabelecimento das isofamílias para o F₁ screen.

4.2.2 Estabelecimento de isofamílias para o F₁ screen

Para formação das isofamílias, lagartas de nove populações de *S. frugiperda* de terceiro ao sexto instar larval foram coletados em regiões geograficamente distintas e de maior representatividade em cultivo de milho no Brasil (Tabela 1; Figura 1). Todas as populações foram coletadas em plantios comerciais de milho não-Bt (500 - 700 lagartas por local), durante a primeira e segunda safra de milho de 2015. Após a coleta, as lagartas foram transportadas para o laboratório e mantidas em dieta artificial até a pupação. As pupas das populações de campo e da linhagem Vip-R foram então individualizadas em copos de plástico (50 ml) invertidos sobre papel de filtro umedecido, permanecendo até a emergência dos adultos. Adultos recém-emergidos foram acasalados aos pares (isofamílias) (♀ campo × ♂ Vip-R ou ♂ campo × ♀ Vip-R) em gaiolas de PVC (uma isofamília/gaiola). O alimento dos adultos foi constituído de uma solução de mel a 10%. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada a 25 ± 1°C, umidade relativa 70 ± 10% e fotofase de 14 h. Os ovos foram retirados a cada dois dias e acondicionados em copos plásticos (100 ml) contendo papel filtro umedecido com água destilada até a eclosão das neonatas para a montagem dos bioensaios de F₁ screen.

Tabela 4.1 - Populações de campo de *S. frugiperda* utilizadas no F₁ screen

População	Cidade	Estado	Latitude	Longitude	Data
SP-19	Casa Branca	São Paulo (SP)	21°30'02" S	47°00'34" W	11/14/14
PR-57	Palotina	Paraná (PR)	24°07'26" S	53°30'21" W	11/18/14
MG-22	Araguari	Minas Gerais (MG)	18°27'00" S	48°01'00" W	11/28/14
BA-40	Correntina	Bahia (BA)	13°40'37" S	45°40'40" W	12/12/14
GO-33	Água Fria de Goiás	Goiás (GO)	15°00'18" S	47°47'58" W	12/12/14
MT-32	Sapezal	Mato Grosso (MT)	13°15'15" S	58°22'48" W	03/19/15
PR-61	Londrina	Paraná (PR)	23°27'47" S	51°00'21" W	04/22/15
GO-35	Rio Verde	Goiás (GO)	17°40'54" S	50°56'26" W	05/05/15
MS-20	Campo Grande	Mato Grosso do Sul (MS)	20°39'28" S	54°47'38" W	05/05/15

Figura 4.1 - Populações de *S. frugiperda* utilizados no estudo de F₁ screen para estimar a frequência de alelos de resistência a Vip3Aa20

4.2.3 Bioensaios

Para os bioensaios foram utilizadas folhas de milho Agrisure Viptera™ e respectiva isolinha não-Bt retiradas de plantas cultivadas a campo. Antes dos bioensaios, a expressão Vip3Aa20 em cada planta foi verificada usando o Kit QuickStix™ para Vip3A. As folhas foram removidas da região do “cartucho” das plantas nos estádios V₄ a V₈ e, em laboratório, cortadas em pedaços de ~4 cm², sendo acondicionadas sobre uma mistura geleificada de agar-água a 2,5% em bandejas de bioensaios com 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil). Em

seguida, 128 neonatas da progênie F_1 de cada isofamília foram expostas à alimentação em folhas de milho Agrisure Viptera™ expressando Vip3Aa20 (4 neonatas/célula). Como tratamento controle foram testadas 32 neonatas/isofamília em folhas de milho não-Bt. Posteriormente, as placas foram vedadas com tampas plásticas, e acondicionadas em sala climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h. As folhas foram substituídas a cada dois dias. A sobrevivência larval foi avaliada aos 6 dias. Por ocasião de lagartas sobreviventes, as mesmas foram alimentadas com folhas de milho Agrisure Viptera™ até a pupação. Somente as isofamílias com larvas que completaram o desenvolvimento em milho Bt, e originaram adultos viáveis foram consideradas isofamílias positivas (resistentes). A sobrevivência em cada isofamília é dependente do genótipo do parental proveniente do campo. Se o indivíduo do campo for homozigoto suscetível (SS), toda a progênie será formada por heterozigotos (RS), resultando em 100% de mortalidade, uma vez que o milho Agrisure Viptera™ atende o conceito de alta dose, ou seja, mata indivíduos heterozigotos (BERNARDI et al., 2015a). Entretanto, se o parental do campo for heterozigoto (RS), é esperado uma relação 1:1 entre indivíduos resistentes (RR) e heterozigotos (RS) na progênie F_1 , resultando em 50% de sobrevivência em milho Agrisure Viptera™. Caso o parental do campo for homozigoto resistente (RR), toda a F_1 será composta por indivíduos resistentes resultando em 100% de sobrevivência.

4.2.4 Análise estatística

Para estimar a frequência do alelo de resistência a Vip3Aa20, foi utilizada a equação (4) proposta por Yue et al. (2008). O intervalo de confiança (IC 95%) foi estimado a partir da equação (15) reportada por Andow e Alstad (1999). A probabilidade de falso negativo no F_1 screen, calculada a partir da mortalidade no controle, número de insetos testados e do número (desconhecido) de insetos resistentes na isofamília, foi estimada pela equação (5) reportada por Yue et al. (2008). A frequência do alelo de resistência e o intervalo de confiança foram calculados usando a função *binom.bayes* do pacote *binom* do R 3.1.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

4.3 Resultados

De um total de nove populações de *S. frugiperda* foram formadas 450 isofamílias das quais, 52,9% foram resultantes do acasalamento ♀ campo × ♂ Vip-R e 47,1% do cruzamento ♂ campo × ♀ Vip-R (Tabela 2). Das isofamílias formadas, 263 (58,4%) apresentaram posturas viáveis e foram utilizadas nos bioensaios de F₁ screen (Tabela 2). Do total de isofamílias testadas, 45,2% foram representadas pelo cruzamento ♀ campo × ♂ Vip-R e 54,8% do cruzamento ♂ campo × ♀ Vip-R (Tabela 2). A presença de alelos de resistência a Vip3Aa20 foi detectada em três isofamílias de populações provenientes de Palotina, PR (PR57), Sapezal, MT (MT32) e Rio Verde, GO (GO35). A progênie F₁ nas três isofamílias positivas foi oriunda de um parental do campo de genótipo heterozigoto (RS), pois a sobrevivência larval em folhas de milho Vip3Aa20 variou de 42 a 65%. A sobrevivência até a fase adulta foi de 35,9; 40,6 e 55,5% para a isofamília de Palotina, Sapezal e Rio Verde, respectivamente. Em contraste, a sobrevivência no tratamento controle (isolinha não-Bt) foi superior a 90% em todas as isofamílias avaliadas. A frequência de alelos de resistência a Vip3Aa20 variou de 0,0140 (IC 95%, 0 - 0,0419) (Araguari, MG - MG22) a 0,0367 (IC 95%, 0,0044 - 0,1001) (Rio Verde, GO - GO35), com uma frequência total de 0,0076 (IC 95%, 0,0021 - 0,0165) (Tabela 3). Devido a sobreposição dos intervalos de confiança, não houve diferenças significativas na frequência de alelos de resistência a Vip3Aa20 entre as populações de *S. frugiperda* (Tabela 3). A probabilidade de não se detectar o alelo de resistência calculada para o F₁ screen foi de 0,0014.

Tabela 4.2 - Isofamílias formadas para o F₁ screen da resistência a Vip3Aa20 em populações de *S. frugiperda* no Brasil

População	Isofamílias/ população	Isofamílias formadas		Isofamílias testadas	
		♀ Campo	♂ Campo	♀ Campo	♂ Campo
SP-19	48	20	28	9	14
PR-57	50	16	34	3	28
MG-22	51	33	18	21	13
BA-40	50	33	17	11	12
GO-33	51	22	29	11	22
MT-32	54	31	23	23	18
PR-61	49	26	23	7	13
GO-35	43	24	19	15	11
MS-20	54	33	21	19	13
Total	450	238	212	119	144

Tabela 4.3 - Resultados do F₁ screen e estimativa da frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 no Brasil

População	Isofamílias testadas	Indivíduos detectados ^a		Frequência do alelo R	Intervalo de confiança (95%)
		RR	RS		
SP-19	23	0	0	0,0204	0 - 0,0610
PR-57	31	0	1 (128; 48,4%)	0,0310	0,0037 - 0,0848
MG-22	34	0	0	0,0140	0 - 0,0419
BA-40	23	0	0	0,0204	0 - 0,0610
GO-33	33	0	0	0,0144	0 - 0,0431
MT-32	41	0	1 (128; 42,2%)	0,0236	0,0028 - 0,0649
PR-61	20	0	0	0,0234	0 - 0,0696
GO-35	26	0	1 (128; 65,6%)	0,0367	0,0044 - 0,1001
MS-20	32	0	0	0,0149	0 - 0,044
Total	263	0	3	0,0076	0,0021 - 0,0165

^aNúmero de isofamílias na qual indivíduos RR ou RS foram detectados (número de indivíduos testados no bioensaio; porcentagem de sobrevivência aos 6 dias)

4.4 Discussão

O método de F₁ screen foi eficaz em detectar indivíduos de *S. frugiperda* que carregam o alelo de resistência a Vip3Aa20. A expressão em alta dose de Vip3Aa20 em milho Agrisure Viptera™ (BERNARDI et al., 2015a) permitiu discriminar os indivíduos homozigotos resistentes RR, uma vez que a dose expressa de Vip3Aa20 causa a mortalidade completa dos indivíduos de genótipo heterozigoto (RS) e homozigoto suscetíveis (SS) (BERNARDI et al., 2015a). Isso é um indicativo que o F₁ screen pode ser usado para o monitoramento da frequência de alelos da resistência a Vip3Aa20 em populações de *S. frugiperda* do Brasil. O uso de folhas de plantas *Bt* para estimar a frequência de resistência via F₁ e F₂ screen também foi reportado em vários estudos (BOURGUET et al., 2003; WENES et al., 2006; HUANG et al., 2008; LIU et al., 2008; YUE et al., 2008; HUANG et al., 2009; ENGELS et al., 2010; HUANG et al., 2014; BERNARDI et al., 2015b). Além disso, métodos de bioensaio com folhas de milho Bt tem se mostrado mais rápidos e práticos, quando comparado com aqueles que utilizam proteína inseticida em dieta, pois o uso de proteínas tem alto custo de produção e disponibilidade limitada (SIEGFRIED et al., 2007; BERNARDI et al., 2015b).

A frequência do alelo de resistência no presente estudo foi relativamente baixa 0,0076, demonstrando que a frequência de indivíduos homozigotos resistentes (RR) será de $(0,0076)^2 =$

0,00005776 e de heterozigotos (RS) $(2 \times 0,0076 \times 0,9924) = 0,01508448$, ou seja, espera-se encontrar um indivíduo RR e RS a cada 17313 e 66 indivíduos no campo, respectivamente. Essa frequência é similar àquela reportada para *H. virescens* a Cry1Ac nos EUA 0,0015 (GOULD et al., 1997), *D. saccharalis* a Cry1Ab nos EUA, 0,0028 (YUE et al., 2008). Em contraste, uma maior frequência elevada (0,033) foi detectada em *H. armigera* a Cry2Ab2 na Austrália (MAHON et al., 2010); Cry1Ac na China, 0,029 a 0,107 (LIU et al., 2008; ZHANG et al., 2012) e *O. nubilalis* a Cry1F nos EUA, 0,0253 a 0,0286 (SIEGFRIED et al., 2014). Pelo método de F₂ screen uma maior frequência de alelos de resistência (0,027 e 0,008) foi relatado em *H. armigera* e *Helicoverpa punctigera* na Austrália antes da liberação comercial do algodão Bt expressando a proteína Vip3A (MAHON; DOWNES; JAMES, 2012).

No Brasil, para Vip3Aa20 foi estimada uma frequência de 0,0009 via F₂ screen durante a primeira e segunda safra de milho de 2013 e 2014 (BERNARDI et al., 2015). Este valor é 8,4 vezes menor do que o verificado neste estudo via F₁ screen, durante a safra 2015. Esta diferença pode estar relacionada com a: (i) perda de alelos de resistência em algum momento da execução do F₂ screen; (ii) número de isofamílias testadas e (iii) acasalamento preferencial. A perda de alelos de resistência no F₂ screen pode ocorrer por falhas na amostragem (ANDOW; ALSTAD, 1998) ou devido a custo adaptativo da resistência (MAHON et al., 2010). Neste caso, o F₁ screen, por não necessitar criar os insetos por apenas uma geração, elimina estes erros e permite a detecção de maior número de alelos de resistência. Na segunda hipótese, quanto maior o número de isofamílias testadas a frequência estimada se torna menor, pois o denominador da fórmula de frequência é o número total de isofamílias testadas. No presente estudo foram testadas 263 isofamílias, enquanto que, 852 isofamílias foram avaliadas via método de F₂ screen por Bernardi et al. (2015b). Assim como, a preferência de acasalamento entre indivíduos resistentes de laboratório (RR) com indivíduos do campo que carregam pelo menos um alelo de resistência (RR ou RS), pode elevar a taxa de sucesso na produção de progênie nestas isofamílias, aumentando a estimativa da frequência de indivíduos resistentes (SIEGFRIED et al., 2014).

A detecção de alelos de resistência a Vip3Aa20 via F₁ screen indica que o mesmo alelo que confere resistência à linhagem Vip-R também ocorre em populações de campo de *S. frugiperda*. A linhagem Vip-R foi selecionada de uma população oriunda de Correntina, BA. Via F₁ screen o mesmo alelo de resistência foi detectado em outras três populações oriundas de Palotina, PR, Sapezal, MT e Rio Verde, GO, cuja distância varia de 800 a 1500 km (Figura 1). No presente

estudo demonstramos que o mesmo alelo de resistência a Vip3Aa20 em *S. frugiperda* foi detectado nos principais estados produtores de milho do Brasil. Isso representa uma ameaça potencial a sustentabilidade das tecnologias de milho que expressam Vip3Aa20, caso as estratégias de manejo de resistência forem negligenciadas.

Para o manejo da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 no Brasil, a estratégia de alta dose e refúgio tem sido recomendada (BERNARDI et al., 2015b). Para o sucesso desta estratégia, além de uma baixa frequência inicial de alelos de resistência (TABASHNIK et al., 2009), a utilização de áreas de refúgio (GOULD, 1994), herança recessiva da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977) e custo adaptativo (GASSMANN; CARRIERE; TABASHNIK, 2009) também são requeridas. Para a linhagem Vip-R a herança da resistência foi recessiva e houve relevante custo adaptativo associado à resistência (BERNARDI et al., 2016). Estes aspectos contribuem para manter uma baixa frequência de alelos de resistência a Vip3Aa20 em populações de *S. frugiperda*. No entanto, a baixa adoção de áreas de refúgio no Brasil favorece o aumento da frequência de indivíduos resistentes (FARIAS et al., 2014; BERNARDI et al., 2015b). A baixa adoção de áreas de refúgio foi um dos aspectos associados à evolução da resistência de *S. frugiperda* a Cry1F em Porto Rico (STORER et al., 2010) e Cry1F e Cry1Ab no Brasil (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016).

Nesse cenário, se as mesmas condições que propiciaram a resistência a Cry1F em populações brasileiras de *S. frugiperda* são mantidas, a resistência à Vip3Aa20 também pode evoluir rapidamente. Sendo assim, o aumento na adoção de áreas de refúgio é um aspecto chave para preservar ou prolongar a vida útil das tecnologias de milho que expressam Vip3Aa20 para controle de *S. frugiperda*. Em adição, existe a necessidade de um contínuo monitoramento da frequência do alelo de resistência a Vip3Aa20 em populações de *S. frugiperda*. Nesse contexto, o método do F₁ screen devido à simplicidade e capacidade de detecção de alelos de resistência em baixa frequência pode ser utilizado como método de monitoramento da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 no Brasil.

4.5 Conclusões

- O método de F₁ screen é eficiente em detectar indivíduos de *S. frugiperda* que carregam o alelo de resistência a Vip3Aa20.

- O mesmo alelo de resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 ocorre em populações de campo de diferentes regiões do Brasil.
- A frequência dos alelos de resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 é baixa no Brasil.

Referências

ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Sussex, v. 268, n. 5219, p. 1894-1896, 1995.

ANDOW, D.; ALSTAD, D.N. Credibility interval for rare resistance allele frequencies - Response. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 4, p. 755-758, 1999.

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.

BERNARDI, O.; AMADO, D.; SOUSA, R.S.; SEGATTI, F.; FATORETTO, J.; BURD, A.D.; OMOTO, C. Baseline susceptibility and monitoring of brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 2, p. 781-790, 2014.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; AMADO, D.; SOUSA, R.S.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.; CONVILLE, J.; BURD, T.; OMOTO, C. Resistance risk assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 2015a.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R.J.; OKUMA, D.M.; MIRALDO, L.L.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.; BURD, T.; OMOTO, C. Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex, 2016. In press.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R.S.; OKUMA, D.M.; SALMERON, E.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F.C.L.; BURD, T.; OMOTO, C. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015b.

BOURGUET, D.; CHAUFaux, J.; SÉGUIN, M.; BUISSON, C.; HINTON, J.L.; STODOLA, T.J.; PORTER, P.; CRONHOLM, G.; BUSCHMAN, L.L.; ANDOW, D. A. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 7, p. 1225-1233, 2003.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Commercial Release of the Genetically Modified Insect Resistant Corn (Zea mays), Namely MIR 162 Corn.** In: Technical opinion nº. 2042/2009. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15160.html> . Acesso em: 25 Out. 2015.

ENGELS, H.; BOURGUET, D.; MANACHINI, B.; SCHUPHAN, I.; STODOLA, T. J.; MICOUD, A.; BRAZIER, C.; MOTTET, C.; ANDOW, D.A. Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F-2 screen in european populations of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 5, p. 1803-1809, 2010.

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, 150-158, 2014.

GASSMANN, A.J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B.E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 54, p. 147-163, 2009.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, n. 3, p. 319-323, 1977.

GOUFFON, C.; VAN VLIET, A.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; JURAT-FUENTES, J.L. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A Toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n.10, p. 3182-3188, 2011.

GOULD F. Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 451-461, 1994.

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

GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARD, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3519–3523, 1997.

HUANG, F.; LEONARD, B.R.; MOORE, S.H.; COOK, D.R.; BALDWIN, J.; TINDALL, K.V.; LEE, D. R. Allele frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab corn in Louisiana populations of sugarcane borer (Lepidoptera : Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 2, p. 492-498, 2008.

HUANG, F.; PARKER, R.; LEONARD, R.; YONG, Y.; LIU, J. Frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis*-corn in Texas populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 2, p. 174-180, 2009.

HUANG, F.; QURESHI, J.A.; MEAGHER JR. R.L.; REISIG, D.D.; HEAD, G.P.; ANDOW, D.A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G.D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F Resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e112958, 2014.

JACKSON, R.E.; MARCUS, M.A.; GOULD, F.; BRADLEY JUNIOR, J.R.; VAN DUYN, J. W. Cross-resistance responses of Crylac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein VIP3A. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, p. 180-186, 2007.

KASTEN JÚNIOR, P.; PRECETI, 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. 1/2, p. 68-78, 1978.

LEE, M.K.; WALTERS, F.S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J.S. Mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4648-4657, 2003.

LIU, F.; XU, Z.; CHANG, J.; CHEN, J.; MENG, F.; ZHU, Y.C.; SHEN, J. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in china. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 3, p. 933-943, 2008.

MAHON, R.J.; DOWNES, S.; JAMES, W.; PARKER, T. Why Do F1 screens estimate higher frequencies of Cry2Ab resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) than do F2 screens? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 2, p. 472-481, 2010.

MAHON, R.J.; DOWNES, S.J.; JAMES, B. Vip3A resistance alleles exist at high levels in australian targets before release of cotton expressing this toxin. **Plos One**, Berkeley, v. 7, n. 6, 2012.

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**, Sussex, 2016. In press.

SIEGFRIED, B.D.; RANGASAMY, M.; WANG, H.; SPENCER, T.; HARIDAS, C.V.; TENHUMBERG, B.; SUMERFORD, D.V.; STORER, N. P. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, n. 5, p. 725-733, 2014.

SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; CRESPO, A.L.; STORER, N.P.; HEAD, G.P.; OWENS, E.D.; GUYER, D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. **American Entomologist**, Lanham, v. 53, p. 208-214, 2007.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B.E. Delaying insect resistance to transgenic crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 49, p. 19029-19030, 2008.

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

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

WENES, A.L.; BOURGUET, D.; ANDOW, D.A.; COURTIN, C.; CARRE, G.; LORME, P.; SANCHEZ, L.; AUGUSTIN, S. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera : Chrysomelidae). **Heredity**, London, v. 97, n. 2, p. 127-134, 2006.

YUE, B.; HUANG, F.; LEONARD, B.R.; MOORE, S.; PARKER, R.; ANDOW, D.A.; COOK, D.; EMFINGER, K.; LEE, D.R. Verifying an F1 screen for identification and quantification of rare *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in field populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 129, n. 2, p. 172-180, 2008.

ZHANG, H.; TIAN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, J.; LIU, C.; YANG, Y.; WU, S.; WU, K.; CUI, J.; TABASHNIK, B.E.; WU, Y. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 26, p. 10275-10280, 2012.