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

Distribuição geográfica e custo adaptativo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Vip3Aa20 no Brasil

Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral

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

**Piracicaba
2018**

Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral
Engenheiro Agrônomo

Distribuição geográfica e custo adaptativo da resistência de *Spodoptera frugiperda*
(J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Vip3Aa20 no Brasil
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2018

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

Amaral, Fernando Semmelroth de Assunção e

Distribuição geográfica e custo adaptativo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Vip3Aa20 no Brasil / Fernando Semmelroth de Assunção e Amaral. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

59 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Lagarta-do-cartucho 2. Vip3Aa20 3. Milho Bt 4. Manejo da resistência de insetos I. Título

Aos meus pais José Jordan de Assunção e Amaral e Rosemarie Semmelroth de Assunção e Amaral, por todo o empenho e dedicação em minha formação.

À minha noiva Alessandra Pereira Rodrigues Barreto, por todo apoio nesta trajetória,

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto, pela orientação, paciência, sabedoria e dedicação em minha condução na trajetória da graduação e pós-graduação.

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade de realização de meu mestrado e minha formação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pelo conhecimento e ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aprimoramento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio na forma de concessão da bolsa de estudo.

À Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. pelo fornecimento da proteína Vip3Aa20 e apoio financeiro parcial para a realização da presente dissertação.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP pelo convívio e aprendizado.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP): Alex Sandro Poltronieri, Aline Sartori Guidolin, Anderson Bolzan, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, Dayana Rosalina de Souza, Daniel Bernardi, Daniela Miyuki Okuma, Dyrson Abbade Neto, Ewerton da Costa Lira, Felipe Antônio Domingues, Ingrid Schimidt Kaiser, Juliano Ricardo Farias, Natália Alves Leite, Oderlei Bernardi, Osmar Arias, Patrick Marques Dourado, Rebeca Ribeiro, Renato Jun Horikoshi, Rogério Machado Pereira, Rubens Hideo Kanno e Sandy Spinelí Silva por todos os momentos de convívio e troca de conhecimentos.

Às funcionárias do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, ESALQ/USP, Eloisa Salmeron, Gislaine Aparecida Amâncio de Oliveira Campos, por todo empenho e auxílio nos trabalhos.

Aos colegas Aline Sartori Guidolin, Fernando Padovez, Leonardo Libardi Miraldo e Rubens Hideo Kanno por todo o suporte e empenho na condução dos trabalhos.

A todos os estagiários com quem convivi no Laboratório de Resistência de Artrópodes e Táticas de Controle, ESALQ/USP.

À República Lesma Lerda e todos seus moradores e ex-moradores, por todos os ensinamentos e aprendizados.

Aos amigos com quem morei durante este curso, Antônio Rogério Bezerra do Nascimento, José Bruno Malaquias e Rubens Hideo Kanno, pelos ótimos momentos, orientações e incentivos.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP por todo o empenho e dedicação nos serviços prestados.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly da Biblioteca Central da ESALQ/USP pela formatação deste trabalho.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, tiveram participação na realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Bioecologia, distribuição geográfica e plantas hospedeiras de <i>S. frugiperda</i>	13
2.2. Proteínas Bt	15
2.3. Resistência de insetos a proteínas Bt	16
2.4. Custo adaptativo associado à resistência de insetos a proteínas Bt	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	19
3.1.1. Linhagem suscetível.....	19
3.1.2. Linhagem resistente à proteína Vip3Aa20.....	19
3.1.3. Linhagem resistente a Vip3Aa20 quase-isogênica à linhagem SUS	19
3.1.4. Populações de campo	20
3.2. Monitoramento de Vip3Aa20.....	21
3.2.1. Monitoramento fenotípico.....	21
3.2.1.1. Monitoramento da suscetibilidade com a proteína Vip3Aa20 purificada.....	21
3.2.1.2. Monitoramento da suscetibilidade a Vip3Aa20 com folhas de milho Bt expressando proteína Vip3Aa20	23
3.2.2. Monitoramento genotípico	24
3.2.2.1. Método F ₁ screen	24
3.2.2.2. Método F ₂ screen	25
3.3. Teste de complementaridade.....	27
3.4. Custo adaptativo para linhagem resistente quase-isogênica à proteína Vip3Aa20.....	28
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Monitoramento fenotípico.....	31
4.1.1. Monitoramento com proteína Vip3Aa20 purificada	31
4.1.2. Monitoramento com folhas de milho Bt expressando proteína Vip3Aa20.....	34
4.2. Monitoramento genotípico	35
4.2.1. Método F ₁ screen	35
4.2.2. Método F ₂ screen	36
4.3. Teste de complementaridade.....	37
4.4. Custo adaptativo para linhagem resistente quase-isogênica a Vip3Aa20.....	39
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	51

RESUMO

Distribuição geográfica e custo adaptativo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Vip3Aa20 no Brasil

A utilização de plantas transgênicas expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido a principal estratégia para o controle da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) no Brasil. A resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 foi recentemente isolada e caracterizada em condições de laboratório, a partir de uma população proveniente de Correntina-BA. Para subsidiar programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI), foram realizados estudos para entender a distribuição geográfica da resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 no Brasil, mediante uso de métodos fenotípicos (proteína purificada e folhas de milho Bt) e genotípicos (F₁ e F₂ screen), além da elucidação da presença custo adaptativo associado à resistência a partir de uma linhagem resistente quase-isogênica. Para o monitoramento com proteína purificada, as médias de sobrevivência na dose discriminatória de 3600 ng Vip3Aa20/cm² para 10 populações/safra de *S. frugiperda* das principais regiões produtoras de milho do Brasil, tiveram um aumento em número, no decorrer das safras, para as populações que diferiram da sobrevivência da linhagem SUS, por não sobreposição do I.C. (95%). As larvas sobreviventes deste monitoramento morreram quando transferidas para folhas de milho Bt expressando Vip3Aa20. Não houve sobreviventes no monitoramento da resistência utilizando folhas de milho Bt, para todas as populações avaliadas. As médias de frequência alélica da resistência estimadas pelo método F₁ screen foram de 0,0069, 0,0051 e 0,0041 para as populações avaliadas na 2ª safra/2016, entressafra/2016 e 1ª safra/2017 respectivamente. Pelo método F₂ screen, as médias de frequência alélica foram de 0,0030, 0,0036, 0,0054 e 0,0042 para as populações da 2ª safra/2016, entressafra/2016, 1ª safra/2017 e 2ª safra/2017 respectivamente. Foram selecionadas 3 linhagens resistentes a Vip3Aa20 pelo método F₂ screen, a partir de populações provenientes de Peabiru-PR, São João da Boa Vista-SP e Casa Branca-SP. Pelo teste de complementaridade, o mesmo alelo da resistência que havia sido inicialmente isolado da região de Correntina-BA, foi verificado nestas novas linhagens resistentes selecionadas. Não foi verificada a presença de custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20, além de um maior valor adaptativo de indivíduos heterozigotos mediante avaliação de parâmetros de tabela de vida e fertilidade. Os resultados do presente trabalho comprovaram que o alelo da resistência de *S. frugiperda* para a proteína Vip3Aa20 está amplamente distribuído nas principais regiões produtoras de milho no Brasil. Este fato aliado à ausência de custo adaptativo da resistência reforçam a necessidade de implementação de estratégias eficientes de MRI para retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Vip3Aa20; Milho Bt; Manejo da resistência de insetos

ABSTRACT

Geographical distribution and fitness cost of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Vip3Aa20 protein in Brazil

The use of transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal proteins has been the main strategy to control the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in Brazil. The resistance of *S. frugiperda* to Vip3Aa20 protein was recently isolated and characterized in laboratory conditions from a Correntina-BA population. In order to subsidize Insect Resistance Management (IRM) programs, studies were carried out to understand the geographical distribution of *S. frugiperda* resistance to Vip3Aa20 protein in Brazil, through the use of phenotypic (purified protein and Bt maize leaves) and genotypic methods (F_1 and F_2 screen), in addition, the elucidation of fitness-cost presence associated with resistance from a near-isogenic resistant strain. For the purified protein monitoring, the mean survival at the diagnostic concentration of 3,600 ng Vip3Aa20/cm² for 10 populations/season of *S. frugiperda* from the main maize producing regions of Brazil, had an increase in the number of populations with significant difference by non-overlap in the confidence interval (95 %) in relation with our reference of susceptibility. The surviving larvae of this monitoring died when transferred to leaves of Bt maize expressing Vip3Aa20. There were no survivors in resistance monitoring using Bt maize leaves for all populations evaluated. The mean frequency of resistance alleles estimated by the F_1 screen method were 0.0069, 0.0051 and 0.0041 for the populations evaluated in the 2nd/2,016, the offseason/2,016 and the 1st/2,017 crop seasons, respectively. By the F_2 screen method, the means of allele frequency were 0.0030, 0.0036, 0.0054 and 0.0042 for the populations of the 2nd/2,016, offseason/2,016, 1st/2,017 and 2nd/2,017 crop seasons, respectively. Three Vip3Aa20 resistant strains were selected by the F_2 screen method from populations from Peabiru-PR, São João da Boa Vista-SP and Casa Branca-SP. By the complementarity test, the same resistance allele that had been initially isolated from the Correntina-BA region was verified in these new selected resistant strains. The presence of the adaptive cost associated to the resistance of *S. frugiperda* to Vip3Aa20 was not verified, besides a higher adaptive value of heterozygous individuals through evaluation of life table parameters and fertility. The results of the present work proved that the resistance allele of *S. frugiperda* for the Vip3Aa20 protein is widely distributed in the main maize producing regions in Brazil. This fact, coupled with the lack of adaptive cost of resistance, reinforces the need to implement efficient IRM strategies to delay the evolution of *S. frugiperda* resistance to Vip3Aa20 protein in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Vip3Aa20; Bt maize; Insect resistance management

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas transgênicas expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) tem sido uma das principais estratégias para o controle da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil (FARIAS et al., 2014; BERNARDI et al., 2015a; OMOTO et al., 2016). Nos últimos anos houve um aumento expressivo na utilização de tecnologias Bt, sendo que as áreas plantadas de milho com esta tecnologia já atingiram patamares superiores a 80% no país (CÉLERES, 2017).

Este cenário de alta adoção de tecnologias Bt no Brasil, aliado à baixa adoção das áreas de refúgio, contribuíram para que ocorresse uma rápida evolução da resistência de *S. frugiperda* a algumas proteínas expressas em milho Bt em condições de campo, tais como Cry1F (FARIAS et al., 2014) e Cry1Ab (OMOTO et al., 2016). A grande maioria dos eventos Bt liberados comercialmente expressam proteínas do grupo Cry1, para o qual se observou um alto nível de resistência cruzada para algumas tecnologias de milho e algodão Bt (BERNARDI et al., 2015b; HORIKOSHI et al., 2016a). Além das proteínas do grupo Cry1, recentemente foi relatada resistência cruzada entre proteínas do grupo Cry2 (YANG et al., 2017), as quais também ocorrem em milho e algodão Bt no Brasil. Uma alternativa para o manejo da lagarta-do-cartucho, considerando a perda da eficácia das proteínas dos grupos Cry1 no Brasil, tem sido a utilização de proteínas do grupo Vip (proteína inseticida vegetativa), principalmente devido à alta eficácia no controle de *S. frugiperda* e ausência de resistência cruzada entre as proteínas dos grupos Cry e Vip utilizadas comercialmente (GOUFFON et al., 2011). O risco de evolução da resistência à proteína Vip3Aa20 foi recentemente evidenciado em populações de *S. frugiperda* no Brasil (BERNARDI et al., 2015b, 2016), necessitando assim a implementação de estratégias de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) para preservar a vida útil dessa proteína.

Uma das etapas essenciais para a implementação de estratégias de MRI está no monitoramento da resistência em populações de uma determinada praga. Diversos métodos podem ser utilizados no monitoramento da resistência, incluindo tanto os métodos fenotípicos quanto os genotípicos (HUANG, 2006; SIEGFRIED et al., 2007; ANDOW, 2008). Métodos tradicionais de monitoramento fenotípico, incluem a construção de curvas concentração-resposta mediante condução de testes com diferentes concentrações do inseticida para a estimativa da CL₅₀ para uma determinada população de inseto-praga em comparação com a resposta de uma população suscetível de referência (SIEGFRIED et al., 2007). Contudo, apesar de oferecer bons resultados para casos onde já ocorre uma alta frequência de

resistência, este método não é sensível para detectar mudanças na frequência desses alelos que conferem a resistência em situações em que a frequência de resistência é baixa na população (HALLIDAY; BURNHAW, 1990; SIEGFRIED et al., 2007). Outro método bastante utilizado é o monitoramento utilizando doses diagnósticas ou discriminatórias, os insetos da população são testados numa única concentração previamente determinada, onde pode se identificar mais facilmente variações entre populações e no decorrer do tempo (ROUSH, 1990), entretanto, estes métodos não tem poder de detecção do alelo que confere a resistência para casos onde o indivíduo heterozigoto apresente fenótipo suscetível (SIEGFRIED et al., 2007). Sabe-se que os principais carreadores dos alelos da resistência são os indivíduos heterozigotos da população.

Outros métodos mais adequados para o monitoramento da resistência têm sido os genotípicos, tais como F_1 e F_2 screen que têm sido utilizados para a estimativa da frequência dos alelos da resistência quando estes ocorrem em baixa frequência nas populações (GOULD et al., 1997; ANDOW; ALSTAD, 1998). Atualmente, o que se busca é o equilíbrio entre eficiência e custo para monitorar e estimar a frequência alélica. O método F_1 screen tem um menor custo, pois exige que a população de campo seja mantida por apenas uma geração em laboratório, entretanto, o método necessita de uma população resistente em laboratório, além de que só tem o poder de detecção para o mesmo alelo encontrado na população resistente selecionada (GOULD et al., 1997; ANDOW; ALSTAD, 1998). Já o método F_2 screen possui um maior custo, pois a aplicação da técnica exige que os insetos sejam mantidos por duas gerações em laboratório, contudo esse método possibilita selecionar outros alelos de resistência que não poderiam ser identificados por F_1 screen.

Um outro importante componente para a elaboração de estratégias de MRI está na exploração do custo adaptativo associado à resistência (JAKKA; KNIGHT; JURAT-FUENTES, 2014b; HUANG et al., 2015). A presença de custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 foi reportado por Bernardi et al. (2016) com uma redução de aproximadamente 50% na fecundidade, a linhagem resistente utilizada nesse trabalho foi selecionada a partir de uma única isofamília proveniente da região de Correntina, Estado da Bahia (BERNARDI et al., 2015b) e a comparação foi realizada com uma linhagem suscetível de laboratório com base genética distinta da população resistente selecionada. Portanto, o custo adaptativo poderia ser devido à ação de genes modificadores, conforme proposto por Roush & McKenzie (1987). Uma alternativa para eliminar o possível efeito de genes modificadores para avaliar o custo adaptativo associado à resistência a Vip3Aa20 em *S. frugiperda* seria a utilização de uma linhagem resistente quase-isogênica à linhagem

suscetível que poderia ser obtida a partir de retrocruzamentos sucessivos da linhagem resistente com a linhagem suscetível (ROUSH; MCKENZIE, 1987; ROUSH; TABASHNIK, 1991; KOOKE; WIJNKER; KEURENTJES, 2012).

Considerando a importância de se conhecer a distribuição geográfica da resistência a Vip3Aa20 e comprovar a existência de custo adaptativo associado à resistência em *S. frugiperda*, os objetivos do presente trabalho foram:

Avaliar a distribuição geográfica da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 no Brasil, mediante a utilização de métodos de monitoramento fenotípico (proteína purificada e folha de milho Bt) e genotípico (F₁ e F₂ screen);

Elucidar o custo adaptativo da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 a partir de uma linhagem resistente quase-isogênica à linhagem suscetível.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioecologia, distribuição geográfica e plantas hospedeiras de *S. frugiperda*

A lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), é uma praga de grande importância em diversas regiões do continente americano. Trata-se de uma praga que se distribui desde países como a Argentina no sul da América do Sul, até a região sul dos Estados Unidos da América, podendo ser encontrada eventualmente em locais ainda mais frios, como o sul do Canadá (SPARKS, 1979; ASHLEY et al., 1989; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Esta espécie também foi detectada recentemente nas regiões oeste e central da África, onde tem se espalhando rapidamente no continente (GOERGEN et al., 2016). A alta capacidade de dispersão dessa praga é uma das razões para o sucesso da espécie (SPARKS, 1979). Estudos recentes também mostraram que, a orientação das correntes de vento não favorecem a movimentação de *S. frugiperda* na orientação norte-sul pela América Central, sendo assim, há pouca relação e troca de material genético entre populações do Hemisfério Norte e Hemisfério Sul do continente americano (NAGOSHI et al., 2017). Na América Latina essa praga tem sido de grande importância, não somente para a cultura do milho como também em outras culturas tais como o algodão, o arroz, a cana-de-açúcar e a soja (ARAÚJO E SILVA, 1967; PASHLEY, 1988; CORTEZ; WAQUIL, 1997), com uma maior preferência por gramíneas (LUGINBILL, 1928; JOHNSON, 1987; PASHLEY, 1988).

A capacidade reprodutiva de *S. frugiperda* é bastante alta. As fêmeas da espécie são capazes de realizar cerca de cinco a seis posturas na face abaxial das folhas do hospedeiro, posturas essas contendo uma média de 215 ovos, estes com uma viabilidade entre 60 e 70 % em condições laboratoriais (SPARKS, 1979; SANTOS et al., 2004). Além disso, outro estudo mostra evidências de que ocorre uma maior preferência por plantas que não tenham sofrido herbivoria (TÉLLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014). Quando a população da praga se encontrar em altas densidades, ou em situações de ausência das plantas hospedeiras da espécie, a fêmea de *S. frugiperda* pode ovipositar em qualquer vegetação ou superfície não vegetal disponível (SPARKS, 1979). A eclosão das larvas ocorre cerca de dois a três dias após a oviposição e há grande mortalidade larval tanto por canibalismo quanto por inimigos naturais em condições de campo (GIOLO et al., 2002; SANTOS et al., 2004). A lagarta-do-cartucho, quando alimentada com algodão, soja ou milho, apresentou um maior tempo de desenvolvimento e menor peso pupal nas culturas do algodão e da soja, em relação às lagartas alimentadas com folhas de milho (PITRE; HOGG, 1983). Na cultura do milho, as lagartas iniciam seu

desenvolvimento raspando as folhas, e, à medida que se desenvolvem passam a perfura-las, esse aumento das lesões pode resultar numa destruição total do cartucho da planta, estado que normalmente ocorre quando a lagarta atinge seu tamanho máximo, variando entre 40 e 50 mm (SILVA, 1998, 2000). As perdas no milho podem variar entre 17 a 72%, de acordo com as condições (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; MURÚA et al., 2015). Além disso, a espécie apresenta de 4 a 7 instares larvais, que variam conforme a temperatura, fonte de alimento, sexo e biótipo (PITRE; HOGG, 1983).

A elevada polifagia de *S. frugiperda* resultou em mudanças tanto comportamentais quanto fisiológicas dentro da espécie, possibilitando o surgimento de raças ou biótipos (PASHLEY; MARTIN, 1987; RODRIGUES; BUENO; SAMPAIO, 2003). Atualmente está relatado que ocorre grande variabilidade genética dentro da espécie, acarretando em variações fenotípicas como os biótipos milho e arroz, os quais são claramente diferenciados (PASHLEY, 1986; RODRIGUES; BUENO; SAMPAIO, 2003; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). O estudo destes biótipos mostrou a existência de isolamento reprodutivo unidirecional, uma vez que fêmeas advindas da cultura do milho não acasalam com machos da cultura do arroz, fato confirmado pela inexistência de espermátóforos naquelas fêmeas. Porém, numa situação contrária, as fêmeas da cultura do arroz acasalaram com machos provenientes do milho e produziram descendentes férteis. Já em retrocruzamento da geração F₁, não foram observados acasalamentos. (PASHLEY; MARTIN, 1987). Acredita-se ainda que a espécie é geneticamente muito mais complexa do que essa divisão em dois biótipos, podendo haver outras variações genotípicas apresentando diferentes preferências por hospedeiros e comportamento de acasalamento (NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Foi observada, entretanto, uma baixa variabilidade entre as populações coletadas nas culturas do milho e do algodão na região Centro-Oeste do Brasil (MARTINELLI et al., 2007). Estes resultados têm impacto na evolução da resistência de *S. frugiperda* a plantas Bt, visto as diferentes raças da praga já confirmadas para as culturas do milho e do arroz no Brasil (RODRIGUES; BUENO; SAMPAIO, 2003).

Atualmente, com a utilização comercial de plantas com a tecnologia Bt visando o controle de insetos, o conhecimento de aspectos como a bioecologia da praga é de grande importância para o estabelecimento de uma estratégia eficaz de manejo da resistência (MARTINELLI et al., 2006). A alta capacidade reprodutiva, reduzido tempo para completar uma geração e elevada polifagia da espécie, aliado com o sistema sobreposto e sucessivo de cultivo de milho, algodão e soja Bt, expõem as populações de *S. frugiperda* a repetidas pressões de seleção em plantas Bt, expressando apenas proteínas Cry1, Cry2 e Vip,

propiciando assim um cenário favorável para que ocorra a evolução da resistência, caso as estratégias e recomendações de MRI não sejam implementadas.

2.2. Proteínas Bt

A engenharia genética permitiu que fossem introduzidos genes de uma espécie em outra. No caso das tecnologias Bt, técnicas permitiram que genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, que codificam proteínas com propriedades inseticidas, fossem introduzidas no genoma de plantas, permitindo a expressão destas nos tecidos do vegetal. Por exemplo, as proteínas Cry são produzidas a partir da expressão dos genes *cry*, estes localizados em um extra-cromossomo no plasmídeo de *B. thuringiensis*. Em bactérias que expressam estes genes *cry*, a pró-toxina produzida é ativada e posteriormente agrupada, formando estruturas semelhantes a cristais. Já as plantas geneticamente modificadas que apresentam os genes *cry* truncados de forma que são expressas as proteínas já ativas, ao invés das pró-toxinas e cristais (COPPING; MENN, 2000).

Visando o controle de insetos, temos as proteínas Cry, as quais tem sido bastante utilizadas (RANG et al., 2005), e as proteínas Vip, que possuem um modo de ação distinto, apresentando um baixo potencial de resistência cruzada (ESTRUCH et al., 1996; LEE et al., 2003; JACKSON et al., 2007; GOUFFON et al., 2011).

Para a explicação dos mecanismos de ação das proteínas Cry (δ -endotoxinas) existem três hipóteses, uma delas seria o “modelo clássico”, uma outra se baseia na ligação sequencial, e a última em um caminho de sinalização. O “modelo clássico”, diz que os cristais seriam ingeridos, estes, solubilizados pelo intestino alcalino do inseto, liberariam pró-toxinas, as quais seriam ativadas por proteases. Estas proteínas ativadas se ligariam a células epiteliais do intestino, formando poros não seletivos, levando a um desarranjo celular e morte do inseto (KIROUAC et al., 2002; VACHON; LAPRADE; SCHWARTZ, 2012), os esporos poderiam também, colonizar a hemolinfa do inseto, matando-o por septicemia (HÖFTE; WHITELEY, 1989; KNOWLES; DOW, 1993; SCHNEPF et al., 1998). Uma segunda hipótese onde os cristais de toxinas seriam ingeridos e solubilizados em pró-toxinas, as quais, pela ação das proteases do intestino seriam ativadas, em seguida estas proteínas ativadas se ligariam a receptores de caderina, a partir daí, a hipótese da ligação sequencial diz que essa ligação com a caderina resultaria na oligomerização da toxina, esses oligômeros se ligariam a receptores secundários na membrana do intestino do inseto, por fim, estes oligômeros seriam inseridos na membrana e formariam poros, as perfurações matariam as células (BRAVO; SOBERÓN, 2008; PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013), já a hipótese do caminho de

sinalização, diz que o efeito ocorre pela ligação da proteína ativada aos receptores de caderina que levariam a uma sinalização ainda pouco compreendida, dependente de Mg^{2+} e adenilil ciclase/proteína quinase A, e que resultaria em morte celular. (ZHANG et al., 2006).

Já para as proteínas Vip (proteína inseticida vegetativa) o mecanismo é pouco conhecido, mas, assim como as proteínas Cry, ocorre a formação de poros (LEE et al., 2003), levando o inseto a morte, porém os receptores de ligação da proteína no epitélio intestinal parecem ser independentes dos receptores para as proteínas Cry (YU et al., 1997; DE MAAGD et al., 2003). As proteínas Vip devem ser ativadas pelas proteases do mesêntero da lagarta para que ocorra a formação de poros, a proteína de ~ 88 kDa sofre a ação dessas proteases e quebra em 2 fragmentos de ~ 62 a 66 kDa e outro de 22 kDa, os quais ainda se mantém parcialmente ligados (LEE et al., 2003).

2.3. Resistência de insetos a proteínas Bt

A resistência de insetos pode ser definida como uma mudança herdável na sensibilidade de uma população de certa praga, a qual reflete numa recorrente falha de controle pelo produto, sendo utilizado conforme as recomendações do rótulo, para a praga (IRAC, 2017). Outra definição para a resistência seria, uma diminuição na suscetibilidade de uma população de insetos a um inseticida (TABASHNIK, 1994). Ou ainda, uma definição mais prática seria que a resistência ocorre numa população de campo, quando o número de indivíduos resistentes existentes é suficiente para provocar dano econômico em uma determinada cultura, em resposta a uma falha no controle dessa praga (FITT et al., 2006). A pressão de seleção exercida pelas plantas que expressam proteínas Bt é elevada, pois a expressão destas é contínua, podendo levar a uma rápida evolução da resistência (GOULD, 1998; FITT et al., 2006). A resistência é definida neste caso como a habilidade de um inseto de sobreviver na planta Bt da fase de ovo até a emergência do adulto, e capaz de deixar descendentes férteis (ANDOW, 2008).

O primeiro caso reportado de resistência de insetos para proteínas Bt foi no ano de 1985, em uma população de laboratório de *Plodia interpunctella*, a qual apresentou uma razão de resistência 100 vezes maior em relação à população suscetível após ser criada por 15 gerações em dieta artificial tratada com inseticida biológico de Bt (MCGAUGHEY, 1985). Foram observados casos de resistência também para biopesticidas formulados a base de Bt em populações de campo da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (TABASHNIK, 1994), além de mudanças na suscetibilidade de populações naturais de *Heliothis virescens* e *Helicoverpa*

zea às proteínas purificadas Cry1Ac e Cry1Ab (STONE; SIMS, 1993; ALI; LUTTRELL; YOUNG III, 2006).

Alguns outros casos de resistência a campo de pragas-alvo a plantas Bt já foram reportados para diversas pragas como: *Busseola fusca* à proteína Cry1Ab expressa em milho na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007), *H. zea* à proteína Cry1Ac expressa em algodão nos EUA (TABASHNIK et al., 2008), *Pectinophora gossypiella* à proteína Cry1Ac expressa em algodão na Índia (DHURUA; GUJAR, 2011), *Diabrotica virgifera virgifera* às proteínas Cry3Bb1 e mCry3A expressa em milho nos EUA (GASSMANN et al., 2011, 2014), e *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa em milho em Porto Rico e no Brasil (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014), e a Cry1Ab no Brasil (OMOTO et al., 2016). Estudos recentes mostraram um aumento expressivo de casos de resistência a proteínas Cry produzidas por plantas Bt, de 3 no ano de 2005, para 16 em 2016, porém, para 17 outros casos de monitoramento, não houve redução de suscetibilidade aos cultivos Bt, incluindo para as mais recentes, proteínas Vip (BERNARDI et al., 2015b; TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017).

Além disso, a resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 já foi relatada em condições de laboratório, onde Bernardi (2016) caracterizou a resistência desta linhagem como recessiva autossômica e monogênica, a qual apresentou uma razão de resistência de >3200 vezes e custo adaptativo através da redução na sobrevivência larval em 11% e uma taxa reprodutiva aproximadamente 50% menor.

Para a maioria dos insetos que apresentaram resistência a proteínas de Bt, a herança foi caracterizada como recessiva, quando não, áreas de refúgio com plantas não-Bt retardaram a evolução da resistência (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017), a razão de resistência em sua maioria também foi superior a 500 vezes em relação a uma população suscetível, e ocorreram devido a mutações em genes que codificam proteínas envolvidas no sítio de ligação das toxinas Bt, presentes no intestino médio dos insetos e pertencentes à família das caderinas e aminopeptidases (MORIN et al., 2003; HECKEL et al., 2007; TABASHNIK et al., 2011).

2.4. Custo adaptativo associado à resistência de insetos a proteínas Bt

O custo adaptativo pode ser definido como uma troca, onde, os mesmos alelos responsáveis por uma maior aptidão em um determinado ambiente, como cultivos Bt por exemplo, também são responsáveis por uma aptidão reduzida em outro ambiente, como por exemplo na ausência de pressão de seleção por Bt (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009).

Os três principais componentes de estudos de custo adaptativo, segundo Gassmann (2009) são: a sobrevivência, o tempo de desenvolvimento e o peso, entretanto, outros parâmetros como fatores comportamentais também têm sido estudados (MALAQUIAS et al., 2017).

O cultivo de plantas Bt foi introduzido em 1996, e desde então pelo menos 16 casos de resistência de insetos a proteínas Cry já foram reportados (TABASHNIK et al., 2003; GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009; TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017), e, no decorrer deste tempo diversos trabalhos foram realizados com o intuito de observar o custo adaptativo. Observou-se custo adaptativo para *Helicoverpa zea* resistente a Cry1Ab nos Estados Unidos (DIVELY; VENUGOPAL; FINKENBINDER, 2016) com menor taxa de eclosão larval, tempo mais longo até a emergência dos adultos, menor peso de pupa e menor sobrevivência na fase adulta, já para *Helicoverpa armigera* resistente à Cry2Ab2, não foram encontradas variações que pudessem ser relacionadas ao custo adaptativo (LIU et al., 2017), outro trabalho para esta espécie apresentou uma progressão do custo adaptativo quanto maior a razão de resistência para a proteína Cry1Ac (CAO et al., 2015). Para *S. frugiperda* resistente a Cry1F, não se observou custo adaptativo para trabalhos realizados em Porto Rico e no Brasil (VÉLEZ et al., 2014; HORIKOSHI et al., 2016b), entretanto, recentemente detectou-se custo adaptativo associado ao comportamento larval de *S. frugiperda* resistente a Cry1F (MALAQUIAS et al., 2017), ainda para a mesma espécie, Bernardi (2015a) encontrou algumas reduções na taxa reprodutiva de uma linhagem resistente a Cry2Ab2 e Cry1A.105. Em *Heliothis virescens* resistente a Vip3Aa20, ocorre custo adaptativo para condições de temperaturas mais baixas, simulando períodos de inverno (GULZAR et al., 2012).

A dominância do custo adaptativo também é um fator de grande importância para o MRI, pois a forma com que os indivíduos que carregam o alelo da resistência se comportam na ausência ou presença do cultivo Bt, implicará diretamente nas estratégias de manejo a serem utilizadas. Considerando uma resistência monogênica onde a resistência é conferida por um único gene com dois alelos, r e s , o primeiro conferindo resistência, e o segundo suscetibilidade à proteína Bt, quando o custo adaptativo é recessivo, a aptidão é menor para o indivíduo rr em relação ao ss , mas sem diferença entre ss e rs , por outro lado, quando o fitness não é recessivo, a aptidão do indivíduo rs é menor do que a do indivíduo rr (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Populações de *Spodoptera frugiperda*

3.1.1. Linhagem suscetível

A linhagem suscetível de referência (SUS) vem sendo mantida há mais de 10 anos sem exposição à pressão de seleção, e é conduzida em dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedo de cerveja (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) e mantidas em condições de temperatura controladas de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 14:10 (L:E) no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, USP/ESALQ, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.1.2. Linhagem resistente à proteína Vip3Aa20

A linhagem resistente foi selecionada pelo método F₂ screen a partir de uma população de campo proveniente de Correntina-BA (BERNARDI et al., 2015b). Após a seleção, a linhagem Vip-R foi mantida por sete gerações em folhas de milho Bt contendo o evento MIR162 (expressando a proteína Vip3Aa20). A razão de resistência foi de > 3200 vezes e a herança da resistência foi caracterizada como recessiva monogênica (BERNARDI et al., 2016). A linhagem resistente foi submetida à pressão de seleção em folha de milho Bt que expressa proteína Vip3Aa20 a cada duas gerações. Esse procedimento foi adotado, uma vez que essa proteína é expressa em alta dose pela planta, ou seja, os indivíduos heterozigotos se comportam fenotipicamente da mesma forma que indivíduos suscetíveis (BERNARDI et al., 2011), possibilitando assim a seleção de indivíduos resistentes homozigotos. A linhagem foi mantida nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo que a linhagem suscetível (3.1.1.1).

3.1.3. Linhagem resistente a Vip3Aa20 quase-isogênica à linhagem SUS

A linhagem quase-isogênica à população SUS de laboratório utilizada neste trabalho foi selecionada a partir de uma população resistente Vip-R descrita acima (KOOKE; WIJNKER; KEURENTJES, 2012; BERNARDI et al., 2016). Para a obtenção da linhagem quase-isogênica foram montadas duas gaiolas de cilíndricas de PVC (policloreto de vinila, 24

cm de altura $\times$ 14,5 cm de diâmetro), uma delas com machos da população Vip-R e fêmeas da população SUS, e a outra gaiola com machos da população SUS e fêmeas da população Vip-R, onde os adultos foram mantidos para acasalamento e produção de uma progênie (F_1) heterozigota para a resistência a Vip3Aa20, após a obtenção destes indivíduos, estes foram conduzidos até a fase adulta, onde foi montada uma gaiola para autocruzamento entre estes indivíduos heterozigotos (F_1), as lagartas recém-nascidas de sua progênie (F_2), a qual possuía indivíduos suscetíveis, heterozigotos e resistentes, foram selecionadas em folhas de milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20 em alta dose, e garantindo que os indivíduos sobreviventes dessa seleção na geração F_2 fossem resistentes. Estes indivíduos resistentes selecionados, foram retrocruzados com a linhagem parental SUS, para a repetição do processo anteriormente descrito, este procedimento foi repetido seis vezes para obtenção de uma linhagem quase-isogênica à linhagem SUS. Esta linhagem foi denominada IsoVIP-R para trabalhos posteriores, foi mantida em dieta artificial e sob as mesmas condições de fotoperíodo e temperatura que a linhagem suscetível de laboratório (3.1.1.1).

3.1.4. Populações de campo

Para a realização dos monitoramentos fenotípicos e genotípicos executados neste trabalho, foram coletadas populações de *S. frugiperda* de diferentes regiões do país, as quais serão discriminadas cada qual em seu tópico correspondente. As coletas das populações foram realizadas em plantios comerciais de milho não-Bt (500-1000 lagartas/localidade). As lagartas foram trazidas para o Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, ESALQ-USP, Piracicaba/SP, onde foram criadas (uma lagarta por célula) em placas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) contendo dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976), nas quais permaneceram até a fase de pupa.

A partir deste momento, os métodos de monitoramento utilizaram estas pupas de forma distinta. Para os dois métodos de monitoramento fenotípicos, as pupas foram mantidas em gaiolas de PVC (policloreto de vinila, com 24 cm de altura $\times$ 22,5 cm de diâmetro), estas revestidas com papel jornal e extremidades superior e inferior fechadas com pratos acrílicos, sendo o prato inferior forrado com um círculo de papel filtro umedecido. Após a emergência dos adultos, estes foram transferidos para uma gaiola semelhante à anteriormente utilizada para as pupas, e foi oferecida uma solução de mel e água a uma concentração de 10% em copos plásticos de 50 mL. Gaiolas contendo os indivíduos adultos tiveram seu revestimento de papel jornal trocado três vezes por semana para a retirada das posturas, as quais foram

mantidas em copos plásticos de 150 mL com um pedaço de aproximadamente 4 cm² de papel filtro umedecido, até a eclosão das lagartas neonatas (lagartas com < 24 h após a eclosão dos ovos). As neonatas da progênie destas populações foram utilizadas nos ensaios.

Já para as técnicas de monitoramento genotípico, as pupas das populações de campo foram individualizadas em copos de 50 mL invertidos sobre bandejas cobertas com papel filtro umedecido, até que emergissem os adultos. Para o método genotípico F₂ screen, foram montados casais entre indivíduos da população de campo, já para o método genotípico do F₁ screen, para cada indivíduo adulto da população de campo foi formado um casal com um correspondente do sexo oposto da população Vip-R do laboratório.

3.2. Monitoramento de Vip3Aa20

3.2.1. Monitoramento fenotípico

3.2.1.1. Monitoramento da suscetibilidade com a proteína Vip3Aa20 purificada

Os ensaios utilizando proteína purificada para monitorar a suscetibilidade de *S. frugiperda* foram realizadas para 10 populações nas seguintes safras agrícolas: 2^a safra 2016, 1^a safra 2017 e 2^a safra 2017, totalizando 30 populações (Tabela 1).

Tabela 1. Populações de *Spodoptera frugiperda* utilizadas para o monitoramento da resistência a Vip3Aa20 coletadas na 2ª safra 2016, 1ª safra 2017 e 2ª safra 2017, utilizando a proteína Vip3Aa20 purificada.

Safra	Código da População	Data de coleta	Município	Latitude	Longitude
2ª safra 2016	M/MT-37	12/03/16	Campo Verde / MT	15°33'04"	55°12'71"
	M/PR-64	12/03/16	Cornélio Procópio / PR	23°12'42"	50°42'19"
	M/GO-38	14/03/16	Rio Verde / GO	17°35'24"	50°56'45"
	M/MS-22	23/03/16	Rio Brilhante / MS	21°44'26"	54°29'17"
	M/MT-35	23/03/16	Sapezal / MT	13°25'36"	58°38'18"
	M/MS-23	29/03/16	Chapadão do Sul / MS	18°45'43"	52°36'41"
	M/MT-36	30/03/16	Lucas do Rio Verde / MT	12°46'01"	56°07'18"
	M/PR-65	15/04/16	Peabiru / PR	23°51'58"	52°23'43"
	M/PR-66	18/04/16	Palotina / PR	24°09'50"	53°32'15"
	M/SP-22	20/04/16	Casa Branca / SP	21°50'19"	47°11'03"
1ª safra 2017	M/PR-69	16/11/16	Tibagi / PR	24°27'01"	50°11'22"
	M/PR-70	16/11/16	Cascavel / PR	25°00'06"	53°30'24"
	M/RS-22	21/11/16	Sto. Antônio do Planalto / RS	28°21'14"	52°43'02"
	M/RS-23	21/11/16	Santo Ângelo / RS	28°10'56"	54°18'16"
	M/MG-25	28/11/16	Tupaciguara / MG	18°37'49"	48°42'12"
	M/SC-6	28/11/16	Guatambu / SC	27°07'53"	52°45'33"
	M/GO-41	12/12/16	Rio Verde / GO	17°42'58"	51°10'46"
	M/GO-42	23/12/16	Cristalina / GO	16°55'27"	47°38'14"
	M/BA-47	23/12/16	Luís Eduardo Magalhães / BA	11°57'35"	46°05'54"
	M/SP-24	30/12/16	Casa Branca / SP	21°34'50"	47°05'21"
2ª safra 2017	M/MS-24	02/03/17	Chapadão do Sul / MS	18°46'43"	52°38'50"
	M/GO-43	02/03/17	Montividiu / GO	17°29'59"	51°07'23"
	M/MT-40	07/03/17	Lucas do Rio Verde / MT	12°33'41"	56°09'42"
	M/MT-41	07/03/17	Sapezal / MT	13°30'09"	58°45'33"
	M/MT-42	07/03/17	Campo Verde / MT	15°29'28"	55°20'52"
	M/MS-25	10/03/17	Laguna Carapã / MS	22°42'34"	55°02'55"
	M/PR-71	10/03/17	Toledo / PR	24°40'14"	53°48'49"
	M/PR-72	30/03/17	Luiziana / PR	24°15'05"	52°21'19"
	M/PR-73	30/03/17	Sertanópolis / PR	23°01'17"	50°59'21"
	M/SP-25	07/04/17	Pirassununga / SP	21°53'09"	47°20'58"

Para este método, as populações de campo foram mantidas em dieta artificial conforme descrito no item 3.1.1.4. Foram realizadas oito repetições para cada população, cada qual constituída por 128 lagartas neonatas (< 24 horas após a eclosão) em placas de bioensaio de 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ) contendo dieta artificial. A concentração discriminatória utilizada para o monitoramento de *S. frugiperda* com proteína Vip foi de 3600 ng/cm², equivalente a 180 µg/mL, determinada previamente por Bernardi et al. (2014). Essa concentração foi preparada mediante diluição da proteína purificada em água e, após, adicionando o surfactante Triton X-100 a 0,1% para facilitar o espalhamento da solução sobre a dieta. Com o auxílio de uma micropipeta eletrônica, foi aplicado 30 µL da solução por célula. Após a secagem da solução sobre a dieta artificial, foi inoculada uma

lagarta neonata por célula e a placa foi vedada com tampa plástica adesiva própria. As placas foram mantidas em condições de temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 14:10 (L:E).

Os dados de mortalidade das lagartas foram coletados 7 dias após a realização dos ensaios, para cada população testou-se o seguinte: para o tratamento com a proteína (180 µg/mL) foram testadas 1024 lagartas neonatas (< 24 horas após a eclosão) e para o tratamento controle foram utilizadas 32 lagartas neonatas. Com os dados obtidos, foram estimados os valores médios de sobrevivência, bem como seus respectivos intervalos de confiança (I.C. 95%), considerando a distribuição binomial dos dados. Análises foram conduzidas utilizando a função “binom.probit” do pacote “binom” do programa R (R STUDIO, 2012).

3.2.1.2. Monitoramento da suscetibilidade a Vip3Aa20 com folhas de milho Bt expressando proteína Vip3Aa20

O monitoramento fenotípico com tecido vegetal foi realizado no decorrer de três safras agrícolas: 2ª safra 2016, a entressafra 2016, e a 1ª safra 2017, das quais foram experimentadas um total de 12 populações (Tabela 2).

As populações foram coletadas na fase larval e enviadas para o Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, ESALQ-USP, Piracicaba/SP, onde foram conduzidas conforme descrito no item 3.1.1.4, permitindo, dessa forma, o acasalamento aleatório dos indivíduos adultos e garantindo a variabilidade genética necessária para o experimento. Obtida a progênie (F_1), estes foram utilizados para os ensaios seguintes. Os ensaios foram realizados utilizando placas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil), cada célula contendo 5 mL de uma mistura gelificada ágar-água a 2,5%, sobre esta mistura, depositou-se papel filtro para impedir o contato direto com a mistura, porém, mantendo a umidade. Sobre o papel filtro foi colocado um pedaço de folha de milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20 com cerca de 4 cm², e pedaços de folha de milho não-Bt de mesma área para o tratamento controle, sobre estes pedaços de folha foram depositadas, com a ajuda de um pincel, duas lagartas neonatas por célula. Foram testadas 10 placas por população, sendo que, em cada placa de 32 células, 8 apresentaram folhas de milho não-Bt como tratamento controle, e 24 células com milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20, totalizando 640 lagartas testadas para cada uma das populações, sendo 480 lagartas neonatas com folhas de milho Bt, e 160 neonatas em milho não-Bt, como controle. As placas de ensaio foram mantidas em ambiente com condições de temperatura e fotoperíodo controlados (25 ± 1 °C e 14:10 (L:E)) até a avaliação, a qual foi realizada 4 dias após a infestação das

placas, onde foram coletados os dados de sobrevivência. Com os dados obtidos, foram estimados os valores médios de sobrevivência, bem como seus respectivos intervalos de confiança (I.C. 95%), considerando a distribuição binomial dos dados. Análises foram conduzidas utilizando a função “binom.probit” do pacote “binom” do programa R (R STUDIO, 2012).

Tabela 2. Populações de *Spodoptera frugiperda* utilizadas para o monitoramento da resistência a Vip3Aa20, coletadas na 2ª safra 2016, entressafra 2016, e 1ª safra 2017, utilizando tecido vegetal expressando a proteína inseticida Vip3Aa20.

Safra	Código População	Data de coleta	Município	Latitude	Longitude
2ª safra 2016	RV-GO	10/03/2016	Rio Verde / GO	17°35'24"	50°56'45"
	DN-MG	20/04/2016	Divisa Nova / MG	21°30'48"	46°18'07"
	CP-PR	02/05/2016	Cornélio Procópio / PR	23°07'14"	50°36'41"
	BAR-BA	09/05/2016	Barreiras / BA	11°45'42"	45°46'31"
	LRV-MT	18/05/2016	Lucas do Rio Verde / MT	12°58'10"	55°56'41"
Entres-safra 2016	M/GO-39	27/07/2016	Rio Verde / GO	17°24'26"	50°49'50"
	M/SP-23	01/08/2016	São João da Boa Vista / SP	22°00'58"	46°50'22"
	M/BA-45	27/09/2016	Roda Velha / BA	12°08'25"	45°26'58"
1ª Safra 2017	PR-68	09/11/2016	Palotina / PR	24°08'42"	53°47'25"
	BA-46	09/11/2016	São Desidério / BA	12°45'42"	45°17'06"
	M/MG-26	29/11/2016	Divisa Nova / MG	20°30'35"	46°16'42"
	M/GO-40	30/11/2016	Rio Verde / GO	17°50'52"	50°52'06"
	M/MT-39	06/01/2017	São José do Rio Claro / MT	13°28'09"	56°41'10"

3.2.2. Monitoramento genotípico

3.2.2.1. Método F₁ screen

Para os ensaios utilizando a técnica F₁ screen foram realizadas com cinco populações de *S. frugiperda* coletadas na 2ª safra 2016, três populações da entressafra 2016 e cinco populações da 1ª safra 2017 (Tabela 2).

As populações foram coletadas na fase larval e enviadas para o Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, ESALQ-USP, Piracicaba/SP, onde foram mantidas até a fase de pupa, momento em que foram sexadas e individualizadas para posterior cruzamento, conforme descrito no item 3.1.1.4. Os ensaios foram realizados utilizando a geração F₁, proveniente de casais (F₀) formados por um indivíduo resistente de laboratório (Vip-R) e um correspondente do sexo oposto da população coletada do campo, cada casal foi mantido numa gaiola e denominado como uma isolinha ou isofamília. Os testes foram conduzidos utilizando placas plásticas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil),

cada célula contendo 5 mL de uma mistura gelificada ágar-água a 2,5%, sobre esta mistura, depositou-se papel filtro para impedir o contato direto com a mistura, porém, mantendo a umidade. Sobre o papel filtro foi colocado um pedaço de folha Bt com cerca de 4 cm², e sobre estes pedaços de folha foram depositadas duas neonatas por célula. No total, foram testadas 128 lagartas neonatas para cada isolinha, sendo, 32 delas dispostas sobre milho não-Bt e utilizadas como controle, as 96 restantes foram testadas em milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20, as placas foram fechadas com tampas plásticas. Foi realizada a avaliação 4 dias após a inoculação das larvas sobre as folhas sendo avaliados os indivíduos sobreviventes, sendo que a dose de proteína inseticida expressa em milho contendo o evento MIR162 é discriminatória, ou seja, somente indivíduos homozigotos resistentes sobrevivem. No caso de haver sobrevivência, a folha de milho presente na célula de cada lagarta sobrevivente foi testada com um kit de detecção de proteína Vip3Aa20 (Envirologix, Quick Stix). Caso positivo, a lagarta foi mantida na célula com folhas de milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20 até a fase de pupa. Os adultos obtidos a partir deste método tiveram sua progênie testada para provar a hereditariedade da resistência, tendo sua progênie novamente selecionada em dose discriminatória da proteína Vip3Aa20, e possibilitando também, posteriormente, a seleção de linhagens resistentes. O resultado esperado foi a sobrevivência de aproximadamente 50% dos indivíduos testados caso o parental proveniente da população do campo seja heterozigoto para o mesmo alelo de resistência da população resistente de laboratório. A frequência dos alelos da resistência foi estimada, bem como seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%). Esta frequência supracitada foi estimada pela equação a seguir, de YUE et al. (2008).

$$q = 1 - \left[\left| 1 - \frac{S + 1}{N_{\text{tot}} + 2} \right| \right]^{\frac{1}{2}}$$

Sendo que: q = estimativa da frequência do alelo de resistência; S = número de isolinhas positivas; N_{tot} = número de indivíduos testados.

3.2.2.2. Método F₂ screen

Os bioensaios utilizando a técnica F₂ screen, foram realizados com sete populações de *S. frugiperda* coletadas na 2^a safra 2016, quatro populações na entressafra 2016, quatro populações na 1^a safra 2017 e uma população na 2^a safra 2017 (Tabela 3).

Tabela 3. Populações de *Spodoptera frugiperda* utilizadas para o monitoramento da resistência a Vip3Aa20 coletadas na 2ª safra 2016, entressafra 2016 e 1ª e 2ª safras 2017, utilizando o método F₂ screen.

Safra	Código da População	Data de coleta	Município	Latitude	Longitude
2ª safra 2016	M/MT-37	12/03/16	Campo Verde / MT	15°33'4''	55°12'71''
	M/MS-22	23/03/16	Rio Brilhante / MS	21°44'26''	54°29'17''
	M/MT-35	23/03/16	Fazenda São Lázaro / MT	13°25'36''	58°38'18''
	M/PR-65	15/04/16	Peabiru / PR	23°51'58''	52°23'43''
	M/SP-22	20/04/16	Casa Branca / SP	21°50'19''	47°11'03''
	BAR-BA	09/05/16	Barreiras / BA	11°45'42''	45°46'31''
	LRV-MT	18/05/16	Lucas do Rio Verde / MT	12°58'10''	55°56'41''
Entressafra 2016	M/GO-39	27/07/16	Rio Verde / GO	17°24'26''	50°49'50''
	M/SP-23	01/08/16	São João da Boa Vista / SP	22°00'58''	46°50'22''
	M/BA-45	27/09/16	São Desidério / BA	12°08'25''	45°26'58''
	M/MT-38	03/10/16	Lucas do Rio Verde / MT	13°00'05''	55°58'14''
1ª safra 2017	M/PR-70	16/11/16	Cascavel / PR	25°00'06''	53°30'24''
	M/GO-41	12/12/16	Rio Verde / GO	17°42'58''	51°10'46''
	M/BA-47	23/12/16	Luís Eduardo Magalhães / BA	11°57'35''	46°05'54''
	M/SP-24	30/12/16	Casa Branca / SP	21°34'50''	47°05'21''
2ª safra 2017	M/MT-40	07/03/17	Lucas do Rio Verde / MT	12°33'41''	56°09'42''

Para o método F₂ screen, se utilizou os indivíduos provenientes de populações de campo, onde foram mantidas até a fase de pupa, momento em que foram sexadas e individualizadas. Com a emergência, foram formados casais utilizando-se gaiolas montadas com copos plásticos de 500 mL invertidos e pratos plásticos (15 cm de diâmetro) forrados com papel jornal como base, os adultos foram alimentados com solução de mel 10%. Cada casal (F₀) formado foi considerado uma isolinha ou isofamília. A progênie (F₁) deste casal foi mantida identificada e criada em dieta artificial até a fase de pupa, de forma que para cada isofamília foram inoculadas 96 lagartas de terceiro instar (F₁) em três placas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil), as quais foram mantidas até a fase de pupa. Com a obtenção destas pupas foram montadas gaiolas, uma para cada isofamília, aguardando que emergissem os adultos (F₁) e que estes acasalassem entre si, as posturas (F₂) foram identificadas e mantidas em copos plásticos de 100 mL até a eclosão das neonatas (F₂), as quais foram testadas em placas de 32 células, da mesma forma que os ensaios conduzidos no item 3.1.2.2.1, a avaliação ocorreu após quatro dias, coletando dados de sobrevivência. Diferentemente do método anterior, qualquer sobrevivente a partir deste método foi levado em consideração, pois a proporção de sobrevivência, no caso de um dos indivíduos parentais (F₀) ser heterozigoto, seria de 1/16. Portanto, para os 96 indivíduos testados em folhas Bt, a

sobrevivência seria de aproximadamente 6 indivíduos para uma condição de resistência autossômica monogênica e recessiva.

Nos casos em que houve sobrevivência larval, a folha de milho presente na célula de cada lagarta sobrevivente foi testada com um kit de detecção de proteína Vip3Aa20 (Envirologix, Quick Stix). Em caso de positivo, a lagarta mantida na célula foi alimentada com folhas de milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20 até a fase de pupa. Os adultos obtidos a partir deste método, assim como os obtidos pelo método F₁ screen, tiveram sua progênie testada para provar a hereditariedade da resistência através da seleção em dose discriminatória de Vip3Aa20 e possibilitando também a seleção de linhagens resistentes.

A estimativa da frequência foi obtida de acordo com a fórmula a seguir proposta por ANDOW & ALSTAD (1998):

$$q = \frac{S + 1}{((2 + N_{\text{tot}}) * 4)}$$

Sendo que: q = estimativa da frequência do alelo de resistência; S = número de isolinhas positivas; N_{tot} = número de isofamílias testadas.

3.3. Teste de complementaridade

Com o objetivo de testar as populações selecionadas pelo método F₂ screen para o principal alelo que confere resistência a Vip3Aa20 foi realizado o teste de complementaridade proposto por TABASHNIK et al. (2004). Este teste foi realizado a partir das linhagens resistentes obtidas a partir de populações de campo pelo método F₂ screen (PR-65 (VIPPR), SP-23 (VIPSP) e SP-24 (VIPSP2)).

Para a condução deste trabalho foram montados 15 casais para cada uma das três populações de campo selecionadas, sendo que, um dos indivíduos do casal foi proveniente da nova população resistente selecionada e o outro proveniente da população resistente de laboratório, todos selecionados de forma aleatória para o ensaio (Figura 1). Utilizou-se gaiolas montadas com copos plásticos transparentes de 500 mL invertidos, e pratos plásticos (15 cm de diâmetro) forrados com papel jornal como base, a alimentação dos adultos foi realizada com uma solução de mel 10 %. A progênie (F₁) foi testada utilizando placas plásticas de 32 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil), cada célula contendo 5 mL de uma mistura gelificada ágar-água a 2,5 %. Sobre esta mistura, depositou-se papel filtro para impedir o

contato direto com a mistura, porém, mantendo a umidade. Sobre o papel filtro foi colocado um pedaço de folha com cerca de 4 cm², e sobre estes pedaços de folha foram depositadas duas neonatas por célula. No total, foram testadas 128 lagartas neonatas para cada casal, sendo que, 32 delas foram dispostas sobre milho não-Bt e utilizadas como controle, as 96 restantes foram testadas em milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20, as placas foram fechadas com tampas plásticas e mantidas em temperatura e fotoperíodo controlados (14:10 (Luz:Escuro) e 25±1 °C). Foi realizada a avaliação 4 dias após a inoculação das larvas sobre as folhas, sendo que a dose de proteína inseticida expressa em milho contendo o evento MIR162 é discriminatória, ou seja, somente indivíduos homozigotos resistentes sobrevivem.

Figura 1. Esquema do teste de complementaridade realizado para linhagens resistentes a Vip3Aa20.

3.4. Custo adaptativo para linhagem resistente quase-isogênica à proteína Vip3Aa20

Tendo como objetivo a detecção de custo adaptativo da população resistente quase-isogênica associado a resistência à proteína Vip3Aa20 (IsoVIP-R), em comparação à população suscetível, a criação das linhagens em laboratório foi feita conforme descrito no item 3.1.1.3. Foram avaliados parâmetros biológicos das linhagens resistente quase-isogênica, suscetível e cruzamentos recíprocos. Para a condução deste trabalho, foram utilizadas placas de 16 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) com cerca de 6 ml de dieta artificial (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976) por célula. Foi inoculada uma lagarta neonata (< 24h de idade) em cada célula da placa, e as mesmas foram mantidas em condições temperatura de 25±1 °C e fotofase de 14:10 (Luz:Escuro). Para cada linhagem ou cruzamento foram utilizadas 10 repetições, sendo considerada cada uma como uma placa de 16 células,

nas quais as lagartas foram inoculadas de forma inteiramente casual, totalizando 160 indivíduos testados por linhagem ou cruzamento. Os parâmetros definidos para a detecção do custo adaptativo foram: tempo de desenvolvimento e sobrevivência dos ovos, tempo larval e de pupa, além do período ovo-adulto, razão sexual, longevidade dos machos e fêmeas, tempos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, fecundidade, fertilidade. Os valores de tempo de desenvolvimento e sobrevivência dos ovos, além do tempo de larva e pupa e período ovo-adulto foram obtidos por observações diárias. Parâmetros como a longevidade de machos e fêmeas, tempos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, fecundidade e fertilidade, foram coletados diariamente de 20 casais de cada tratamento, os quais foram mantidos em gaiolas de PVC (24 cm de altura $\times$ 14,5 cm de diâmetro) encapadas em sua face interior com papel jornal para a deposição de ovos, as extremidades superior e inferior foram tampadas com pratos acrílicos (15 cm de diâmetro), sendo que o prato inferior é forrado papel filtro e uma solução de mel a 10% é oferecida em copos plásticos de 50 mL. Para a avaliação do período embrionário e sobrevivência, foram separadas posturas com cerca de 100 ovos do segundo dia de oviposição de cada um dos casais, estas posturas foram acondicionadas em copos plásticos de 100 mL juntamente com um pedaço de papel filtro (4 cm²), tampadas e acondicionadas nas mesmas condições controladas de temperatura e fotoperíodo de todo o experimento (14:10h (Luz:Escuro) e 25 ± 1 °C). O número de ovos e lagartas eclodidas foi contado diariamente.

Os dados da tabela de vida foram analisados no programa SAS (INSTITUTE, 2005) pelo método Jackknife, utilizando a programação traduzida para o português “tabela de vida.sas” (MAIA; LUIZ; CAMPANHOLA, 2000). Foram obtidos os seguintes parâmetros: taxa líquida de reprodução (R_0), taxa intrínseca de crescimento (R_m), intervalo médio entre gerações (IMG) e razão finita de crescimento (λ). Além disso, os dados de tempo de desenvolvimento de ovo, larva, pupa e ovo-adulto e de sobrevivência de ovo, larva, pupa e ovo-adulto, permitiram que fosse realizada comparação em busca de variações significativas utilizando o programa R (R STUDIO, 2012), as médias obtidas por estes parâmetros não obedecerem aos pressupostos necessários para que fosse feito um teste paramétrico, sendo assim foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

4. RESULTADOS

4.1. Monitoramento fenotípico

4.1.1. Monitoramento com proteína Vip3Aa20 purificada

O uso da proteína purificada para o monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* foi capaz de demonstrar variações na sobrevivência das populações expostas à proteína Vip3Aa20 para as três safras testadas (Tabela 4). Para a primeira safra avaliada (2ª safra / 2016), pudemos observar uma baixa sobrevivência larval para a concentração de 3600 ng Vip3Aa20/ cm², onde apenas duas populações de MT e PR (M/MT-37 e M/PR-64) diferiram significativamente, por não sobreposição dos intervalos de confiança, de uma linhagem suscetível de referência. Já para a segunda safra (1ª safra / 2017), houve um aumento bastante grande no número de populações que diferiram significativamente da população referencial de suscetibilidade, representando 8 das 10 populações testadas, e todos os estados amostrados. Para a última safra amostrada (2ª safra / 2017), os resultados obtidos apresentaram um número ainda maior de populações que diferiram da suscetível, representando 9 das 10 populações utilizadas e não abrangendo apenas o estado de GO dentre todos os amostrados. Os indivíduos sobreviventes foram alimentados com folha de milho expressando Vip3Aa20 e não houve sobreviventes.

Tabela 4. Sobrevivência das lagartas neonatas de populações de *S. frugiperda* expostas à proteína Vip3Aa20 purificada em bioensaio de tratamento superficial da dieta.

Safra	População	Cidade / Estado	Sobrev. Média em Vip3Aa20 (%)	I.C. (95%)
2 ^a safra 2016	SUS	Suscetível de referência	0,0000	0,0000 – 0,0036
	M/MT-37	Campo Verde / MT	0,0098	0,0047 – 0.0179 ^a
	M/PR-64	Cornélio Procópio/ PR	0.0098	0.0047 – 0.0179 ^a
	M/GO-38	Rio Verde / GO	0.0068	0.0033– 0.0125
	M/MS-22	Rio Brilhante / MS	0,0000	0,0000 – 0,0036
	M/MT-35	Sapezal / MT	0,0000	0,0000 – 0,0036
	M/MS-23	Chapadão do Sul / MS	0,0000	0,0000 – 0,0036
	M/MT-36	Lucas do Rio Verde/ MT	0.0068	0.0028– 0.0140
	M/PR-65	Peabiru / PR	0.0039	0.0011– 0.0110
1 ^a safra 2017	M/PR-66	Palotina / PR	0.0029	0.0006 – 0.0090
	M/SP-22	Casa Branca / SP	0,0000	0,0000 – 0,0036
	SUS	Suscetível de referência	0,0000	0,0000 – 0,0036
	M/PR-69	Tibagi / PR	0.0156	0.0090 – 0.0253 ^a
	M/PR-70	Cascavel / PR	0.0059	0.0022 – 0.0127
	M/RS-22	Sto. Antônio do Planalto/ RS	0.1250	0.1054 – 0.1468 ^a
	M/RS-23	Santo Ângelo / RS	0.0029	0.0006 – 0.0090
	M/MG-25	Tupaciguara / MG	0.0098	0.0047 – 0.0179 ^a
	M/SC-6	Guatambu / SC	0.0215	0.0135 – 0.0323 ^a
2 ^a safra 2017	M/GO-41	Rio Verde / GO	0.0107	0.0054 – 0.0191 ^a
	M/GO-42	Cristalina / GO	0.0322	0.0223 – 0.0450 ^a
	M/BA-47	Luís Eduardo Magalhães / BA	0.0283	0.0190 – 0.0404 ^a
	M/SP-24	Casa Branca / SP	0.0156	0.0090 – 0.0253 ^a
	SUS	Suscetível de referência	0,0000	0,0000 – 0,0036
	M/MS-24	Chapadão do Sul / MS	0.0576	0.0441 – 0.0737 ^a
	M/GO-43	Montividiu / GO	0.0039	0.0011 – 0.0110
	M/MT-40	Lucas do Rio Verde / MT	0.3125	0.2842 – 0.3419 ^a
	M/MT-41	Sapezal / MT	0.0889	0.0722 – 0.1080 ^a
2 ^a safra 2017	M/MT-42	Campo Verde / MT	0.1426	0.1217 – 0.1655 ^a
	M/MS-25	Laguna Carapã / MS	0.0195	0.0120 – 0.0300 ^a
	M/PR-71	Toledo / PR	0.0273	0.0182 – 0.0393 ^a
	M/PR-72	Luiziana / PR	0.0205	0.0128 – 0.0312 ^a
	M/PR-73	Sertanópolis / PR	0.1045	0.0864 – 0.1249 ^a
	M/SP-25	Pirassununga / SP	0.0088	0.0040 – 0.0166 ^a

^a Significativamente diferente da linhagem suscetível de referência por não haver sobreposição do I.C. a 95%.

Figura 2. Monitoramento de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 em bioensaio de tratamento superficial da dieta. Valores médios, por população, no decorrer de três safras agrícolas.

Figura 3. Monitoramento de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 em bioensaio de tratamento superficial da dieta. Valores médios no decorrer de três safras agrícolas.

4.1.2. Monitoramento com folhas de milho Bt expressando proteína Vip3Aa20

A ausência de detecção para este método nas três safras em que foi conduzido (Tabela 5), é decorrente da baixa frequência da ocorrência da resistência para essa proteína (Vip3Aa20) a nível de campo e, principalmente, da capacidade de detectar apenas indivíduos homozigotos resistentes para a proteína, uma vez que os indivíduos heterozigotos se comportam fenotipicamente como indivíduos suscetíveis (BERNARDI et al., 2016). Visto que os principais carreadores do alelo da resistência a nível de campo são os indivíduos heterozigotos (ROUSH; TABASHNIK, 1991), os métodos fenotípicos convencionais dificilmente detectam a resistência quando em baixa frequência na população.

Tabela 5. Sobrevivência de lagartas neonatas de *S. frugiperda* em folhas de milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20 provenientes de diferentes regiões produtoras de milho do Brasil.

Safra	População	<i>n</i>	Sobreviventes	RR detectados
2º safra 2016	Rio Verde / GO	480	0	0
	Divisa Nova / MG	480	0	0
	Cornélio Procópio /PR	480	0	0
	Barreiras / BA	480	0	0
	Lucas do Rio Verde / MT	480	0	0
	Total safra	2400	0	0
Entressafra 2016	Rio Verde / GO	480	0	0
	São João da Boa Vista / SP	480	0	0
	Roda Velha / BA	480	0	0
	Total safra	1440	0	0
1ª safra 2017	Palotina / PR	480	0	0
	São Desidério / BA	480	0	0
	Divisa Nova / MG	480	0	0
	Rio Verde / GO	480	0	0
	São José do Rio Claro / MT	480	0	0
	Total safra	2400	0	0

4.2. Monitoramento genotípico

4.2.1. Método F₁ screen

Para este método de monitoramento genotípico foram testadas um total de 555 isofamílias provenientes de 13 populações, no decorrer de três safras agrícolas (Tabela 6). Os resultados obtidos por este monitoramento estimaram uma maior frequência média do alelo para os estados de GO e MG com 0,0047 e 0,0048 respectivamente, um valor intermediário para BA, com 0,0038 e uma frequência média menor para os estados do PR, MT e SP, com 0,0001, 0,0 e 0,0001, respectivamente (Tabela 7). A frequência média estimada para o alelo da resistência neste período foi de 0,0027.

Tabela 6. Resultados de F₁ screen e estimativa da frequência do alelo da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 em diferentes localidades e safras agrícolas.

Safra	Código da População	Isofamílias testadas	Alelos R detectados		Frequência do alelo R	I.C. (95%)
			RR	RS		
2 ^a safra 2016	RV-GO	27	0	0	0,0179	0,0000 – 0,0530
	DN-MG	35	0	1	0,0278	0,0034 – 0,0760
	CP-PR	44	0	0	0,0111	0,0000 – 0,0331
	BAR-BA	68	0	1	0,0145	0,0018 – 0,0400
	LRV-MT	41	0	0	0,0119	0,0000 – 0,0354
	Total	215	0	2	0,0069	0,0014 – 0,0167
Entressafra 2016	M/GO-39	31	0	0	0,0156	0,0000 – 0,0464
	M/SP-23	35	0	0	0,0139	0,0000 – 0,0413
	M/BA-45	32	0	0	0,0152	0,0000 – 0,0450
	Total	98	0	0	0,0051	0,0000 – 0,0151
1 ^a safra 2017	PR-68	16	0	0	0,0294	0,0000 – 0,0868
	BA-46	32	0	0	0,0152	0,0000 – 0,0450
	M/MG-26	70	0	0	0,0070	0,0000 – 0,0210
	M/GO-40	50	0	1	0,0196	0,0024 – 0,0539
	M/MT-39	74	0	0	0,0067	0,0000 – 0,0199
	Total	242	0	1	0,0041	0,0005 – 0,0114

Tabela 7. Frequência alélica do alelo da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20, estimada pelo método F₁ screen, por estado.

Estado	Isofamílias testadas	Alelos R detectados		Frequência do alelo R	I.C. (95%)
		RR	RS		
GO	108	0	1	0,0047	0,0001 – 0,017
MG	105	0	1	0,0048	0,0001 – 0,0176
PR	60	0	0	0,0001	0,0000 – 0,0000
BA	132	0	1	0,0038	0,0001 – 0,0140
MT	115	0	0	0,0000	0,0000 – 0,0000
SP	35	0	0	0,0001	0,0000 – 0,0000
Total	555	0	3	0,0027	0,0006 – 0,0065

4.2.2. Método F₂ screen

Para este segundo método de monitoramento genotípico foram testadas um total de 1288 isofamílias provenientes de 16 populações, no decorrer de quatro safras (Tabela 8). Os resultados obtidos por este monitoramento estimaram uma maior frequência média do alelo para os estados de PR e SP com 0,0071 e 0,0068 respectivamente, um valor intermediário para GO, com 0,0052 e uma frequência média mais baixa estimada para os estados do MS,

BA e MT, com 0,0031, 0,0027 e 0,0021, respectivamente (Tabela 9). A frequência média estimada para o alelo da resistência neste período foi de 0,0124.

Tabela 8. Resultados de F₂ screen e estimativa da frequência do alelo da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20 em diferentes localidades e safras agrícolas.

Safr	População	Isofamílias testadas	Parentais detectados		Frequência do alelo R	I.C. (95%)
			RR	RS		
2 ^a safra 2016	M/MT-37	13	0	0	0,0168	0,0004 – 0,0609
	M/MS-22	80	0	0	0,0031	0,0001 – 0,0113
	M/MT-35	40	0	0	0,0060	0,0002 – 0,0220
	M/PR-65	102	0	3	0,0096	0,0026 – 0,0210
	M/SP-22	90	0	1	0,0031	0,0001 – 0,0113
	BAR-BA	86	0	1	0,0057	0,0007 – 0,0158
	LRV-MT	92	0	0	0,0027	0,0001 – 0,0098
	Total safra	503	0	5	0,0030	0,0011 – 0,0058
Entressafra 2016	M/GO-39	92	0	0	0,0027	0,0001 – 0,0098
	M/SP-23	62	0	2	0,0118	0,0024 – 0,0281
	M/BA-45	96	0	1	0,0051	0,0006 – 0,0142
	M/MT- 38	94	0	1	0,0052	0,0006 – 0,0145
	Total safra	344	0	4	0,0036	0,0012 – 0,0074
1 ^a safra 2017	M/PR-70	72	0	1	0,0068	0,0008 – 0,0188
	M/GO-41	50	0	2	0,0145	0,0030 – 0,0345
	M/BA-47	98	0	0	0,0025	0,0007 – 0,0093
	M/SP-24	104	0	3	0,0095	0,0026 – 0,0206
	Total safra	324	0	6	0,0054	0,0022 – 0,0100
2 ^a safra 2017	M/MT-40	117	0	1	0,0042	0,0005 – 0,0117
	Total safra	117	0	1	0,0042	0,0005 – 0,0117

Tabela 9. Frequência alélica do alelo da resistência de *S. frugiperda* a Vip3Aa20, estimada pelo método F₂ screen, por estado.

Estado	Isofamílias testadas	Alelos R detectados		Frequência do alelo R	I.C. (95%)
		RR	RS		
MT	356	0	2	0,0021	0,0004 – 0,0051
MS	80	0	0	0,0031	0,0001 – 0,0113
PR	174	0	4	0,0071	0,0023 – 0,0145
SP	256	0	6	0,0068	0,0027 – 0,0126
BA	280	0	2	0,0027	0,0006 – 0,0064
GO	142	0	2	0,0052	0,0011 – 0,0125
Total	1288	0	16	0,0124	0,0071 – 0,0192

4.3. Teste de complementaridade

A linhagens resistentes utilizadas neste método visando a complementaridade com a linhagem resistente de laboratório VIP-R foram, VIPPR, VIPSP e VIPSP2, as quais, quando

cruzadas com a linhagem VIP-R, poderiam chegar a dois possíveis resultados quando os indivíduos da progênie (F_1) fossem testados em folha de milho Bt expressando a proteína Vip3Aa20 em alta dose para *S. frugiperda*, a sobrevivência total (podendo haver alguma mortalidade natural), quando o principal alelo que confere resistência a essa proteína encontrado na população resistente de laboratório for o mesmo da população selecionada pelo método F_2 screen, ou a mortalidade total dessa progênie testada, o que nos indicaria que a resistência da população de campo selecionada resistente para Vip3Aa20 não é complementar para a população resistente de laboratório, ou seja, o principal alelo que confere resistência à população resistente de laboratório não estaria presente na população de campo selecionada. Os resultados obtidos por este método nos mostraram que não houve variação entre as populações resistentes selecionadas por F_2 screen testadas (VIPSP, VIPSP2, VIPPR) e a população resistente de laboratório VIP-R, para os três cruzamentos realizados (Tabela 10). As lagartas neonatas sobreviveram e se desenvolveram normalmente nas folhas de milho Bt, o qual expressa a proteína Vip3Aa20 em alta dose (BERNARDI et al., 2016), ou seja, a resistência se apresenta de forma fenotipicamente recessiva para a quantidade de proteína Vip expressa pela planta, indivíduos heterozigotos se comportam como suscetíveis. Sendo assim, após os cruzamentos, só sobreviveriam indivíduos que partilhassem do mesmo alelo selecionado anteriormente na linhagem de laboratório (BERNARDI et al., 2015b).

Foi possível mapear, através da complementaridade positiva das populações obtidas por F_2 screen e das populações resistentes obtidas por F_1 screen, a distribuição geográfica do alelo da resistência a Vip3Aa20 nos estados amostrados do Brasil (Figura 4).

Tabela 10. Teste de complementaridade entre populações resistentes de *S. frugiperda* selecionadas por F_2 screen e a população resistente de laboratório VIP-R.

Linhagem cruzada com VIP-R	<i>n</i>	Sobreviventes em folha de milho Bt	Viabilidade (%)	Complementaridade
VIPSP	864	704	81	Sim
VIPSP2	1056	816	77	Sim
VIPPR	1056	799	76	Sim
VIP-R (controle)	1280	998	78	—

Figura 4. Mapa representando as regiões em que foi detectado o alelo da resistência a Vip3Aa20 para *S. frugiperda* no Brasil.

4.4. Custo adaptativo para linhagem resistente quase-isogênica a Vip3Aa20

Os resultados obtidos, mostraram que houve diferenças significativas para alguns parâmetros biológicos entre as linhagens de *S. frugiperda* resistente quase-isogênica a Vip3Aa20, heterozigotas e suscetível. No que tange os parâmetros biológicos de crescimento populacional (Tabela 11), não houve diferenças entre as linhagens IsoVIP-R e SUS. Para os parâmetros R_0 (taxa líquida de reprodução) ambas as linhagens apresentaram valores mais baixos e foram estatisticamente diferentes dos dois cruzamentos, os quais não diferiram entre si, para T (duração média de uma geração) apenas o cruzamento SUS♀ × IsoVIP-R♂ mostrou resultados mais baixos diferiu de todos os outros tratamentos, para os resultados obtidos em r_m (capacidade inata de aumento da população) e λ (razão finita de aumento da população) os resultados seguiram os mesmos padrões, as linhagens IsoVIP-R e SUS não diferiram entre si apresentando os valores mais baixos e IsoVIP-R também não diferiu do cruzamento IsoVIP-

$R♀ \times SUS♂$, o cruzamento $SUS♀ \times IsoVIP-R♂$ diferiu de todos os outros tratamentos com os valores mais altos.

Para os outros parâmetros avaliados no trabalho de custo adaptativo (Figura 5), os únicos em que foram obtidas diferenças entre as linhagens IsoVIP-R e SUS foram o tempo de desenvolvimento larval e o período total ovo-adulto, para o primeiro, foi obtido um tempo de desenvolvimento larval maior para a linhagem isogênica a qual diferiu de todos os outros tratamentos, o cruzamento $IsoVIP-R♀ \times SUS♂$ foi o que apresentou um menor tempo de desenvolvimento diferindo dos restantes, para o segundo parâmetro (ovo-adulto), o tempo de desenvolvimento da linhagem isogênica foi maior do que todos os outros. O tempo de desenvolvimento de ovo e pupa não diferiu entre nenhum dos tratamentos. Para a avaliação de sobrevivência, as linhagens IsoVIP-R e SUS não diferiram entre si e nem do cruzamento $SUS♀ \times IsoVIP-R♂$, o cruzamento $IsoVIP-R♀ \times SUS♂$ apresentou o maior valor para este parâmetro e não diferiu do outro cruzamento, porém, foi diferente das linhagens SUS e ISOVIP-R, a sobrevivência das fases de larva e pupa não diferiu entre nenhum dos tratamentos, para a fase ovo-adulto, as duas linhagens apresentaram os menores valores de sobrevivência e não diferiram entre si, porém ambas diferiram dos dois cruzamentos, os quais também foram estatisticamente diferentes entre si, com $IsoVIP-R♀ \times SUS♂$ apresentando o valor mais alto de sobrevivência. O período total de oviposição de $IsoVIP-R♀ \times SUS♂$ foi o maior, foi estatisticamente diferente das linhagens IsoVIP-R e SUS, porém não diferiu do outro cruzamento o qual, por sua vez, também não foi diferente da linhagem SUS, e não diferindo da linhagem IsoVIP-R. Para a avaliação de longevidade das fêmeas, o cruzamento $IsoVIP-R♀ \times SUS♂$ foi onde se obtiveram os maiores valores, os quais não foram estatisticamente diferentes da linhagem SUS, a qual, por sua vez, também não diferiu de IsoVIP-R e $SUS♀ \times IsoVIP-R♂$. Os valores de número de ovos/fêmea/dia foram estatisticamente iguais para todos os tratamentos. Para os valores totais de ovos/fêmea, os maiores valores foram obtidos a partir do cruzamento de $SUS♀ \times IsoVIP-R♂$ e $IsoVIP-R♀ \times SUS♂$. Vale ressaltar ainda a porcentagem de fêmeas observada para cada uma das linhagens e cruzamentos, uma vez que foram dados utilizados em cálculos dos parâmetros de crescimento populacional, os valores foram de 0,54, 0,48, 0,51 e 0,47% para IsoVIP-R, $IsoVIP-R♀ \times SUS♂$, $SUS♀ \times IsoVIP-R♂$ e SUS, respectivamente.

Tabela 11. Parâmetros de crescimento populacional para linhagens de *S. frugiperda* resistente quase-isogênica a Vip3Aa20, heterozigotas e suscetível em dieta artificial.

Linhagem ou cruzamento	Parâmetros de crescimento populacional ^{a,b}			
	R_0	T	r_m	λ
IsoVIP-R	$234.2 \pm 29.8a$	$38.3 \pm 0.7a$	$0.14 \pm 0.005ab$	$1.15 \pm 0.005ab$
IsoVIP-R $\text{♀} \times \text{SUS}\text{♂}$	$421.3 \pm 29.8b$	$38.7 \pm 0.4a$	$0.16 \pm 0.003b$	$1.17 \pm 0.004b$
SUS $\text{♀} \times \text{IsoVIP-R}\text{♂}$	$540.6 \pm 29.8b$	$36.7 \pm 0.3b$	$0.17 \pm 0.004c$	$1.19 \pm 0.005c$
SUS	$165.6 \pm 29.2a$	$39.1 \pm 0.3a$	$0.13 \pm 0.005a$	$1.14 \pm 0.006a$

^a R_0 — taxa líquida de reprodução (fêmeas por fêmea por geração); T — duração média de uma geração (d); r_m — capacidade inata de aumento da população (por dia); λ — razão finita de aumento da população (por dia).

^b médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes (teste-t para comparação de médias dois a dois, $P > 0.05$).

Figura 5. Dados de tabela de vida para diferentes linhagens e cruzamentos em custo adaptativo para *S. frugiperda*. As médias foram comparadas utilizando Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

As proteínas Bt são uma estratégia que está sendo amplamente utilizada no MIP, principalmente para o controle de lepidópteros-praga desde que foram apresentados trabalhos mostrando o potencial de toxicidade destas proteínas (CHAMBERS et al., 1991; ESTRUCH et al., 1996; LAMBERT et al., 1996; CÉLERES, 2017). No presente estudo foi possível quantificar e monitorar a distribuição geográfica da resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 bem como a obtenção de dados de custo adaptativo associados a essa resistência, dando respaldo a programas de MRI.

O método fenotípico utilizando proteína purificada, foi capaz de detectar um aumento na sobrevivência na proteína, com populações com uma sobrevivência significativamente maior em relação à linhagem suscetível de referência, no decorrer das três safras monitoradas. A dose discriminatória definida para o monitoramento, 3600 ng Vip3Aa20/cm² (BERNARDI et al., 2014), pode ter variado no decorrer das safras até o presente momento devido ao aumento da frequência de genes de resistência secundários no campo, como sugerido em monitoramento realizado na China para a proteína Cry1Ac (LI et al., 2007). Todos os indivíduos sobreviventes deste monitoramento foram expostos a folhas de milho expressando Vip3Aa20, porém, nenhum sobreviveu, o que reforça a possibilidade do aumento da tolerância dos indivíduos no campo. Os resultados deste monitoramento mostraram uma variação na sobrevivência para a proteína Vip3Aa20, porém, diferentemente do que ocorreu para as proteínas Cry1F e Cry1Ab (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016), o aumento ainda não levou a falhas de controle pela proteína.

Já para o monitoramento fenotípico utilizando folhas de milho Bt expressando Vip3Aa20 não houve nenhum indivíduo sobrevivente, isso ocorreu devido à baixa frequência do alelo da resistência nas populações de campo e a alta dose da proteína Vip3Aa20 pela folha do milho Bt para *S. frugiperda* (BERNARDI et al., 2014). A resistência é recessiva para o alelo de resistência detectado no Brasil, sendo assim, somente os indivíduos em homozigose para este alelo são capazes de sobreviver quando alimentadas com a folha do milho expressando Vip3Aa20 (BERNARDI et al., 2016), conforme já relatado pela literatura, no início da evolução da resistência, os principais carreadores do alelo da resistência são os indivíduos heterozigotos (ROUSH; TABASHNIK, 1991), os quais se comportam fenotipicamente como indivíduos suscetíveis quando lhes é oferecida a folha de milho Bt (BERNARDI et al., 2016).

O monitoramento da frequência do alelo que confere resistência à proteína Vip3Aa20 utilizando o método F₁ screen teve um único entrave, que foi a dificuldade em sincronizar o ciclo da população resistente proveniente do laboratório (VIP-R) com as populações coletadas no campo, uma vez que as coletas no campo foram realizadas de acordo com a disponibilidade da praga e o instar larval variou bastante, para a população resistente de laboratório, buscou-se possuir um nível elevado de indivíduos em todas as fases de desenvolvimento, visando reduzir essa problemática. Os resultados obtidos por este método mostraram que há baixa frequência e variação no decorrer das três safras monitoradas, os valores médios estimados de frequência deste alelo para as safras 2^a/16, entressafra/16 e 1^a safra/17 foram de 0,0069, 0,0051 e 0,0041 respectivamente, e 0,0027 de frequência total do período. Até então, o monitoramento para essa mesma proteína no Brasil havia trazido o valor estimado de 0,0009 (IC 95%, 0 – 0,0021) no intervalo de 2013 a 2015 por F₂ screen (BERNARDI et al., 2015b), na Austrália, os valores de frequência alélica 0,08 para *Helicoverpa armigera* e 0,027 para *Helicoverpa punctigera* foram relatados para Vip3Aa20, não acarretaram nenhuma falha de controle da proteína a nível de campo. Para outras proteínas inseticidas, e utilizando o método do F₁ screen, também foram observados valores de frequência baixos, nos Estados Unidos foi relatada uma frequência inicial de 0,0015 para a proteína Cry1Ac para *Heliothis virescens* (GOULD et al., 1997) e 0,037 para Cry1Ab em *Diatraea saccharalis* e 0,030 para *Ostrinia nubilalis*, onde, para todos os valores, não ocorreu falha de controle. Valores mais altos foram encontrados para a proteína Cry1F, quando foi realizada uma estimativa no ano de 2013 para a frequência do alelo da resistência em *S. frugiperda* no Brasil, obtendo uma frequência alélica de 0,24 (SANTOS-AMAYA et al., 2017), falhas pontuais de controle já estavam sendo detectadas a nível de campo para áreas com híbridos expressando essa proteína no campo.

Para o método genotípico do F₂ screen, a estimativa da frequência encontrada para as safras: 2^a/16, Entressafra/16, 1^a/17 e 2^a/17 foram, 0,0030, 0,0036, 0,0054 e 0,0042 respectivamente, resultando numa frequência total estimada para o período de 0,0124. Neste período, devido à baixa frequência do alelo, ainda não foram relatadas falhas de controle para a proteína Vip3Aa20 a nível de campo. A frequência do alelo da resistência (R) encontrada foi maior do que a relatada por Bernardi (2015) para o monitoramento no decorrer de quatro safras entre os anos 2013 e 2014, período no qual foi estimada uma frequência de 0,0009. Valores baixos também foram relatados para *Ostrinia nubilalis* em F₂ screen com a proteína Cry1Ab monitorado em alguns países da Europa, apresentando uma frequência média de 0,0026 entre 1999 e 2005 (ENGELS et al., 2010), com um bom controle da praga a nível de

campo. Para *Helicoverpa armigera*, os valores baixos de frequência alélica, de 0.085 para Cry1Ac no ano de 2011 na Índia (NINGTHOUJAM; SHARMA; GUJAR, 2017), e de 0,0585 na China entre 2010 e 2012 (PAN et al., 2017), também não detectaram nenhuma falha de controle a campo. Valores de frequência alélica mais altos foram reportados em *S. frugiperda* para a proteína Cry1F no Brasil, com uma média de frequência alélica entre 2011 e 2013 de 0,143 (FARIAS et al., 2016), na mesma época, pontuais falhas de controle a nível de campo já estavam sendo identificadas em áreas de maior frequência do alelo que confere a resistência.

Em ambos os métodos de estimativa da frequência da resistência utilizados os resultados foram satisfatórios, cada qual com suas vantagens e desvantagens já citadas anteriormente no que tange a detecção por exemplo, além disso, Andow (2002) estimou que o método genotípico F₂ screen em comparação com métodos fenotípicos de monitoramento, tem um potencial de detecção pelo custo, de 10 a 1000 vezes menor para alelos de resistência recessivos. Para o monitoramento com F₂ screen para *O. nubilalis* na Europa os custos variaram de ~US\$ 300 na França a ~US\$ 1.300 na Eslováquia, mesmo assim, a conclusão foi de que, mesmo custoso, o F₂ screen é o melhor método para se realizar o monitoramento da resistência. Os resultados obtidos a partir do monitoramento genotípico evidenciaram que o principal alelo que confere resistência a Vip3Aa20 está presente nas principais regiões produtoras de milho do Brasil.

A recomendação para o MRI é de que, deve se utilizar alta-dose e refúgio para o manejo da resistência a proteínas Bt, e que esta estratégia é eficiente no controle ou retardo da evolução da resistência a estas proteínas no campo (GOULD, 1998; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013), porém, com o alto vigor detectado para os híbridos provenientes dos cruzamentos das linhagens resistente a Vip3Aa20 e suscetível, estes indivíduos heterozigotos poderiam manter o alelo da resistência no campo (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009).

Os resultados dos cruzamentos visando identificar a complementaridade alélica entre diferentes populações resistentes a Vip3Aa20 nos mostra que o gene da resistência selecionado anteriormente por Bernardi et al. (2015b) é de fato o principal gene da resistência que ocorre no Brasil para esta proteína, uma vez que os testes de complementaridade (TABASHNIK et al., 1997), foram todos positivos. Estes resultados obtidos tem um grande impacto em relação aos objetivos deste trabalho, uma vez que, através dos testes de complementaridade, determinamos como está ocorrendo a distribuição geográfica dos alelos que conferem resistência à Vip3Aa20 no Brasil.

Os resultados obtidos neste trabalho de custo adaptativo mostraram poucas diferenças entre as linhagens IsoVIP-R (resistente quase-isogênica a SUS) e SUS (suscetível de referência), os parâmetros com diferença significativa foram, um maior período de desenvolvimento larval por parte da linhagem IsoVIP-R e um maior período ovo-adulto. Para estes mesmos parâmetros Bernardi (2016) não encontrou respostas semelhantes em trabalho realizado em folhas de milho como fonte de alimento, sendo que observou custo adaptativo para a resistência a Vip3Aa20, com uma redução de 11% na taxa de sobrevivência até a fase adulta, além disso, observou uma redução de ~50% na taxa de reprodutiva em comparação com a linhagem suscetível e cruzamentos, esta presença de custo pode ter sido decorrente da ação de genes modificadores (ROUSH; MCKENZIE, 1987), os quais, para o presente trabalho foram eliminados através da utilização de uma população quase-isogênica.

Nos parâmetros de crescimento populacional obtidos da tabela de vida, observamos que os cruzamentos (heterozigotos) apresentaram alguns valores consideravelmente mais altos em relação às linhagens IsoVIP-R e SUS, considerando o parâmetro R_0 para a linhagem IsoVIP-R os valores foram 1,8 e 2,3 vezes maiores para os dois heterozigotos e para SUS, de 2,5 e 3,2 vezes, o que resulta numa tendência de aumento destes indivíduos heterozigotos na população, considerando também que para outros parâmetros avaliados como a sobrevivência ovo-adulto, ambos os cruzamentos apresentaram valores altos chegando quase ao dobro do obtido para as duas linhagens, e, na maioria dos parâmetros, os cruzamentos também apresentaram valores estatisticamente iguais ou superiores às linhagens IsoVIP-R e SUS.

Este comportamento dos heterozigotos aos parâmetros avaliados sugere que ocorre vigor híbrido ou heterose nesses cruzamentos, sendo esses cruzamentos mais vigorosos que suas linhagens parentais, o que poderia ainda acarretar numa estabilidade da resistência na ausência das proteínas Bt (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009). O fitness relativo para estes indivíduos heterozigotos terá impacto na taxa de evolução da resistência (CARRIERE; TABASHNIK, 2001). Este seria um alerta sobre os resultados obtidos, uma vez que estes indivíduos heterozigotos teriam uma maior capacidade de propagar estes genes, porém, a resistência à Vip3Aa20 se comporta fenotipicamente como recessiva devido a dose expressa pela planta, sendo capaz de controlar os indivíduos heterozigotos no campo, pois estes se comportam como suscetíveis na planta (BERNARDI et al., 2016).

Um melhor estudo acerca deste maior valor adaptativo dos indivíduos heterozigotos para a resistência a Vip3Aa20 nas populações deve ser realizado, pois implicaria no favorecimento da evolução da resistência no campo.

Em síntese, as respostas das linhagens resistente quase-isogênica e suscetível foram semelhantes com exceção dos parâmetros de tempo de desenvolvimento mais longo para a quase-isogênica resistente, e ambas as linhagens apresentaram um desempenho geral inferior aos cruzamentos. Já foram reportados resultados semelhantes, com o período de desenvolvimento larval mais longo para uma linhagem resistente a Cry1F em populações de *S. frugiperda* de Porto Rico (JAKKA; KNIGHT; JURAT-FUENTES, 2014a), onde o próprio trabalho sugere uma possível assincronia de emergência dos indivíduos adultos e consequentemente de acasalamento entre indivíduos resistentes e suscetíveis no campo. Outro trabalho para a mesma espécie em Porto Rico também observou pouca diferença significativa, tendo a população resistente um maior tempo de desenvolvimento e, no geral, não indicando custo adaptativo (VÉLEZ et al., 2014). Horikoshi (2016) também não detectou custo adaptativo para *S. frugiperda* resistente a Cry1F no Brasil, e para as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, Bernardi (2015a) detectou apenas algumas reduções na taxa reprodutiva da população resistente. Para *H. armigera* resistente a Cry2Ab não foi detectada nenhuma variação significativa (LIU et al., 2017). Avaliando parâmetros de temperatura, linhagens resistentes de *Heliothis virescens* apresentaram custo para temperaturas mais baixas, simulando o período do inverno (GULZAR et al., 2012). Nos Estados Unidos, observou-se custo adaptativo para *Helicoverpa zea* resistente a Cry1Ab (DIVELY; VENUGOPAL; FINKENBINDER, 2016). Mais recentemente, Malaquias (2017) observou custo adaptativo para *S. frugiperda* resistente a Cry1F para parâmetros associados ao comportamento larval.

Os resultados do presente trabalho comprovaram que o alelo da resistência de *S. frugiperda* para a proteína Vip3Aa20 está amplamente distribuído nas principais regiões produtoras de milho no Brasil. Este fato aliado à ausência de custo adaptativo da resistência reforçam a necessidade de implementação de estratégias eficientes de MRI para impedir ou retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 no Brasil.

6. CONCLUSÕES

- O alelo da resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 está presente em diferentes regiões geográficas do Brasil;
- Não há custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20, quando utilizada uma linhagem quase-isogênica em dieta artificial.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. I.; LUTTRELL, R. G.; YOUNG III, S. Y. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 1, p. 164–175, 2006.
- ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 142–199, 2008.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 572–578, 1 jun. 1998.
- ANDOW, D. A.; IVES, A. R. Monitoring and Adaptive Resistance Management. v. 12, n. 5, p. 1378–1390, 2002.
- ARAUJO E SILVA, A. G. d'. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil; seus parasitos e predadores**. [s.l: s.n.].
- ASHLEY, T. R.; WISEMAN, B. R.; DAVIS, F. M.; ANDREWS, K. L. **The Fall armyworm: A Bibliography**, 1989. .
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996–1001, dez. 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**, v. 10, n. 10, p. e0140130, 16 out. 2015a.
- BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de Insetos-Praga a Plantas Geneticamente Modificadas Introdução. n. October 2015, p. 181–208, 2011.
- 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**, v. 107, n. 2, p. 781–790, 1 abr. 2014.
- 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**, v. 72, n. 9, p. 1794–1802, set. 2016.
- 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**, v. 76, p. 7–14, out. 2015b.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573–579, out. 2008.

CAO, G.; FENG, H.; GUO, F.; WU, K.; LI, X.; LIANG, G.; DESNEUX, N. Quantitative Analysis of Fitness Costs Associated with the Development of Resistance to the Bt Toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 5629, 9 maio 2015.

CARRIERE, Y.; TABASHNIK, B. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1475, p. 1475–1480, 22 jul. 2001.

CÉLERES. **IC17.10 – Projeção de safra – Milho – outubro 2017**. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/ic17-10-projecao-de-safra-milho-outubro-2017/>>. Acesso em: 18 out. 2017.

CHAMBERS, J. a; JELEN, a M. Y.; GILBERT, M. P.; JANY, C. S.; JOHNSON, T. B.; GAWRON-BURKE, C. Isolation and Characterization of a Novel Insecticidal Crystal Protein Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp . *aizawai*. **Microbiology**, v. 173, n. 13, p. 3966–3976, 1991.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, n. 8, p. 651–676, 2000.

CORTEZ, M. G.; WAQUIL, J. M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. **Embrapa Milho e Sorgo-Nota técnica (ALICE)**, 1997.

DE 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**, v. 37, n. 1, p. 409–433, dez. 2003.

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**, v. 67, n. 8, p. 898–903, 2011.

DIVELY, G. P.; VENUGOPAL, P. D.; FINKENBINDER, C. Field-Evolved Resistance in Corn Earworm to Cry Proteins Expressed by Transgenic Sweet Corn. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0169115, 30 dez. 2016.

ENGELS, H.; BOURGUET, D.; CAGÁN, L.; MANACHINI, B.; SCHUPHAN, I.; STODOLA, T. J.; MICOUD, A.; BRAZIER, C.; MOTTET, C.; ANDOW, D. a. Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F₂ screen in European populations of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 5, p. 1803–9, 1 out. 2010.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, p. 5389–5394, 28 maio 1996.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R. da S.; NASCIMENTO, A. R. do; SANTOS, A. C. dos; OMOTO, C. Frequency of Cry1F resistance alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 12, p. 2295–2302, dez. 2016.

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

FITT, G. P.; OMOTO, C.; MAIA, A. H.; WAQUIL, J. M.; CAPRIO, M.; OKECH, M. A.; CIA, E.; HUAN, N. H.; ANDOW, D. A.; HILBECK, A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. **Environmental risk assessment of genetically modified organisms**, v. 2, p. 300–345, 2006.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 147–163, jan. 2009.

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**, 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**, v. 6, n. 7, p. e22629, 2011.

GIOLO, F.; GRUTZMACHER, A.; GARCIA, M.; BUSATO, G. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 8, n. 3, 2002.

GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S. B.; TOGOLA, A.; TAMÒ, M. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 27 out. 2016.

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**, v. 77, n. 10, p. 3182–3188, 2011.

GOULD, F. Sustainability of Transgenic Insecticidal Cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 701–726, jan. 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**, v. 94, n. 8, p. 3519–23, 15 abr. 1997.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487–488, 1 ago. 1976.

GULZAR, A.; PICKETT, B.; SAYYED, A. H.; WRIGHT, D. J. Effect of Temperature on the Fitness of a Vip3A Resistant Population of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 3, p. 964–970, 1 jun. 2012.

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

HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; BAXTER, S. W.; ZHAO, J.-Z.; SHELTON, A. M.; GOULD, F.; TABASHNIK, B. E. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of invertebrate pathology**, v. 95, n. 3, p. 192–197, 2007.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 2, p. 242–55, jun. 1989.

HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D.; BERNARDI, O.; MALAQUIAS, J. B.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L.; AMARAL, F. S. de A. e; OMOTO, C. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34864, 10 dez. 2016a.

HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; OKUMA, D. M.; 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**, v. 109, n. 2, p. 854–859, abr. 2016b.

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

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

HUANG, F.; CHEN, M.; GOWDA, A.; CLARK, T. L.; MCNULTY, B. C.; YANG, F.; NIU, Y. Identification, inheritance, and fitness costs of Cry2Ab2 resistance in a field-derived population of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 116–123, set. 2015.

INSTITUTE, S. **SAS 9.1.3**. [s.l.] SAS Brasil, 2005.

IRAC. **Resistance**. Disponível em: <<http://www.irac-online.org/about/resistance/>>. Acesso em: 23 out. 2017.

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**, v. 100, n. 1, p. 180–186, 2007.

JAKKA, S. R. K.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. Fitness Costs Associated With Field-Evolved Resistance to Bt Maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 1, p. 342–351, 1 fev. 2014a.

JAKKA, S. R. K.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 122, p. 52–54, out. 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.08.009>>.

JOHNSON, S. J. Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 8, n. 4-5-6, p. 543–549, 1987.

KIROUAC, M.; VACHON, V.; NOËL, J.-F.; GIRARD, F.; SCHWARTZ, J.-L.; LAPRADE, R. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1561, n. 2, p. 171–179, abr. 2002.

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

KOOKE, R.; WIJNKER, E.; KEURENTJES, J. J. B. **Quantitative Trait Loci (QTL)**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 871

LAMBERT, B.; BUYSSE, L.; DECOCK, C.; JANSSENS, S.; PIENS, C.; SAEY, B.; SEURINCK, J.; VAN AUDENHOVE, K.; VAN RIE, J.; VAN VLIET, A.; PEFEROEN, M. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 1, p. 80–6, jan. 1996.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab Endotoxin. **Biochemical Pharmacology**, v. 6, n. 8, p. 205–216, 2003.

LI, G.-P.; WU, K.-M.; GOULD, F.; WANG, J.-K.; MIAO, J.; GAO, X.-W.; GUO, Y.-Y. Increasing tolerance to Cry1Ac cotton from cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, was confirmed in Bt cotton farming area of China. **Ecological Entomology**, v. 32, n. 4, p. 366–375, ago. 2007.

LIU, L.; GAO, M.; YANG, S.; LIU, S.; WU, Y.; CARRIÈRE, Y.; YANG, Y. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab and survival on single-toxin and pyramided cotton in cotton bollworm from China. **Evolutionary Applications**, v. 10, n. 2, p. 170–179, fev. 2017.

LUGINBILL, P. The fall armyworm. **USDA Technical Bulletin**, v. 34, p. 91, 1928.

MAIA, A. de H. N.; LUIZ, A. J. B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life parameters using jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 2, p. 511–518, 2000.

MALAQUIAS, J. B.; GODOY, W. A. C.; GARCIA, A. G.; RAMALHO, F. de S.; OMOTO, C. Larval Dispersal of *Spodoptera frugiperda* Strains on Bt Cotton: A Model for Understanding Resistance Evolution and Consequences for its Management. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16109, 23 dez. 2017.

MARTINELLI, S.; BARATA, R. M.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. D. C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 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**, v. 97, n. 3, p. 225–231, 2007.

MCGAUGHEY, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 229, p. 193–196, 1985.

MORIN, S.; BIGGS, R. W.; SISTERTON, M. S.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; HIGGINSON, D.; HOLLEY, D.; GAHAN, L. J.; HECKEL, D. G.; CARRIERE, Y. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5004–5009, 2003.

MURÚA, M. G.; NAGOSHI, R. N.; DOS SANTOS, D. A.; HAY-ROE, M. M.; MEAGHER, R. L.; VILARDI, J. C. Demonstration using field collections that argentina fall armyworm populations exhibit strain-specific host plant preferences. **Journal of economic entomology**, v. 108, n. 5, p. 2305–2315, 2015.

NAGOSHI, R. N.; FLEISCHER, S.; MEAGHER, R. L.; HAY-ROE, M.; KHAN, A.; MURÚA, M. G.; SILVIE, P.; VERGARA, C.; WESTBROOK, J. Fall armyworm migration across the Lesser Antilles and the potential for genetic exchanges between North and South American populations. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171743, 6 fev. 2017.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, v. 91, n. 4, p. 546–554, 2008.

NINGTHOUJAM, K.; SHARMA, K.; GUJAR, G. T. Frequency of alleles conferring resistance to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis* in population of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) from India. v. 55, n. October, p. 728–733, 2017.

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**, v. 72, n. 9, p. 1727–1736, set. 2016.

PAN, L.; SHI, M.; CHEN, J.; WEI, Q.; GAO, C. Resistance monitoring of larvae treated with Bt cotton and pesticides in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Oriental Insects**, v. 51, n. 3, p. 285–296, 3 jul. 2017.

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

PASHLEY, D. P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 6, p. 898–904, 1986.

PASHLEY, D. P. Current status of fall armyworm host strains. **Florida Entomologist**, p. 227–234, 1988.

PASHLEY, D. P.; MARTIN, J. A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 6, p. 731–733, 1987.

PITRE, H. N.; HOGG, D. B. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn [*Spodoptera frugiperda*]. **Journal of the Georgia Entomological Society**, 1983.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; RIE, J. Van; FRUTOS, R. Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6276–6281, 2005.

RODRIGUES, S. M. M.; BUENO, V. H. P.; SAMPAIO, M. V. Tabela de vida de fertilidade de *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson, 1880) (Hymenoptera, Aphidiidae) em *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Homoptera, Aphididae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 4, p. 637–642, dez. 2003.

ROUSH, R. T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: **Pesticide resistance in arthropods**. [s.l.] Springer, 1990. p. 4–38.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361–380, jan. 1987.

ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. **Pesticide Resistance in Arthropods**. Boston, MA: Springer US, 1991. v. 0

SANTOS-AMAYA, O. F.; TAVARES, C. S.; RODRIGUES, J. V. C.; SOUZA, T. C.; RODRIGUES-SILVA, N.; GUEDES, R. N. C.; ALVES, A. P.; PEREIRA, E. J. G. Magnitude and Allele Frequency of Cry1F Resistance in Field Populations of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Journal of economic entomology**, v. 110, n. 4, p. 1770–1778, 1 ago. 2017.

SANTOS, L. M. Dos; REDAELLI, L. R.; DIEFENBACH, L. M. G.; EFROM, C. F. S. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 345–350, abr. 2004.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 775–806, set. 1998.

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**, v. 53, n. 4, p. 208–214, 2007.

SILVA, M. T. B. Insetos-pragas: aspectos ecológicos, danos e controle. **A cultura do milho no plantio direto**, p. 95–123, 1998.

SILVA, M. T. B. da. Manejo de insetos nas culturas de milho e soja. **Bases e técnicas do manejo integrado de pragas**. Pallotti, Santa Maria, Brasil, p. 169–200, 2000.

SPARKS, A. N. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82–87, 1979.

STONE, T. B.; SIMS, S. R. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of economic entomology**, v. 86, n. 4, p. 989–994, 1993.

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**, v. 103, n. 4, p. 1031–1038, 1 ago. 2010.

STUDIO, R. RStudio: integrated development environment for R. **RStudio Inc, Boston, Massachusetts**, 2012.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, v. 39, n. 1, p. 47–79, 1994.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 1 jun. 2013.

TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 926–935, 11 out. 2017.

TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; MORIN, S.; SISTERTON, M. S.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M.; ZHAO, J.-Z. Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: Lessons from the Laboratory and Field. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1031–1038, 1 ago. 2003.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 199–202, 1 fev. 2008.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L. J.; HECKEL, D. G. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 1128–1131, 2011.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y.-B.; UNNITHAN, D. C.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; MORIN, S. Shared Genetic Basis of Resistance to Bt Toxin Cry1Ac in Independent Strains of Pink Bollworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 3, p. 721–726, 1 jun. 2004.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; MALVAR, T.; HECKEL, D. G.; MASSON, L.; BALLESTER, V.; GRANERO, F.; MÉNSUA, J. L.; FERRÉ, J. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 24, p. 12780–5, 25 nov. 1997.

TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; RAYMOND, B.; MORÁN-BERTOT, I.; RODRÍGUEZ-CABRERA, L.; WRIGHT, D. J.; BORROTO, C. G.; AYRA-PARDO, C. Strong oviposition preference for Bt over non-Bt maize in *Spodoptera frugiperda* and its implications for the evolution of resistance. **BMC biology**, v. 12, n. 1, p. 48, 2014.

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

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

VÉLEZ, A. M.; SPENCER, T. A.; ALVES, A. P.; CRESPO, A. L. B.; SIEGFRIED, B. D. Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, n. 5, p. 315–325, jun. 2014.

YANG, F.; KERNS, D. L.; HEAD, G. P.; PRICE, P.; HUANG, F. Cross-resistance to purified Bt proteins, Bt corn and Bt cotton in a Cry2Ab2-corn resistant strain of *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2495–2503, dez. 2017.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 2, p. 532–6, fev. 1997.

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**, v. 129, n. 2, p. 172–180, nov. 2008.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; TAUSSIG, R.; BULLA, L. A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 27 jun. 2006.