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

Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis*(Fabricius)(Lepidoptera: Crambidae) à
proteína inseticida Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner no Brasil

Dariane Sagaseta de Oliveira Souza

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

Piracicaba
2013

Dariane Sagaseta de Oliveira Souza
Engenheira Agrônoma

Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) à proteína inseticida Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner no Brasil
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **CELSO OMOTO**

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

Piracicaba
2013

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

Souza, Dariane Sagaseta de Oliveira

Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) à proteína inseticida Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner no Brasil / Dariane Sagaseta de Oliveira Souza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

65 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Bacillaceae 2. Bactérias gram-positivas 3. Brocas - Insetos nocivos 4. Manejo integrado 5. Milho 6. Plantas transgênicas 7. Proteínas de plantas I. Título

CDD 633.15
S729s

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

Aos meus amados pais Rosa Tereza M. S. de Oliveira Souza e
Dilmar de Oliveira Souza, razão de minha existência, meu porto seguro e exemplos da minha
vida,
OFEREÇO

A minha avó e segunda mãe querida Rosa Munhoz Sagasetta, pelos cuidados amorosos e
companheirismo,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela oportunidade concedida.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas da ESALQ/USP Alex Sandro Poltronieri, Alexandre Donizeti Barbosa, Daniel Bernardi, Eloisa Salmeron, Everaldo Batista Alves, Gislaine Campos, Juliano Ricardo Farias, Karen MissyAkiKomada, Nádia Bertan, Natália Leite, Oderlei Bernardi, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva, Rebeca da Silva Ribeiro, Renato JunHorikoshi, Ricardo Sesso, Rodrigo José Sorgatto e Rogério Nascimento pelo auxílio e companheirismo nos últimos anos.

A Dow AgroSciences pelo apoio técnico e financeiro com o fornecimento da proteína Cry1F e sementes comerciais, e pelo auxílio nas coletas das populações.

Às bibliotecárias Eliana M. Garcia e Silvia M. Zinsly, funcionárias da Biblioteca Central da ESALQ/USP pelo auxílio na formatação deste trabalho.

"Não sei...

*Se a vida é curta ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
Se não tocamos o coração das pessoas.*

Muitas vezes basta ser:

*Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.*

E isso não é coisa de outro mundo,

É o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela

Não seja nem curta,

Nem longa demais,

Mas que seja intensa,

Verdadeira e pura,

Enquanto durar".

Cora Coralina

*"A tarefa não é contemplar o que ninguém ainda
contemplou, mas meditar, como ninguém ainda
meditou, sobre o que todos tem diante dos
olhos".*

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1INTRODUÇÃO.....	19
2REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Aspectos bioecológicos de <i>Diatraea saccharalis</i>	23
2.2 A tecnologia <i>Bt</i>	25
2.3Estratégia de alta-dose e refúgio no manejo de resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas.....	26
2.4 Monitoramento da suscetibilidade de pragas-alvo a proteínas <i>Bt</i> ,.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Criação e manutenção das populações de <i>D. saccharalis</i>	33
3.2 Caracterização da linha básica de suscetibilidade de <i>D.saccharalis</i> à proteína purificada Cry1F de <i>B. thuringiensis</i>	34
3.3 Monitoramento da suscetibilidade a proteína inseticida Cry1F em populações de <i>D. saccharalis</i> coletadas na cultura do milho no Brasil.....	36
3.4 Avaliação da atividade biológica do milho <i>Bt</i> (evento TC1507) em diferentes estádios fenológicos no controle de <i>D. saccharalis</i>	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1Caracterização da linha básica de suscetibilidade de <i>D. saccharalis</i> à proteína purificada Cry1F de <i>B. thuringiensis</i>	39
4.2Monitoramento da suscetibilidade à proteína inseticida Cry1F em populações de <i>D. saccharalis</i> coletadas na cultura do milho no Brasil.....	42
4.3Avaliação da atividade biológica do milho <i>Bt</i> (evento TC1507) em diferentes estádios fenológicos no controle de <i>D. saccharalis</i>	43

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) à proteína inseticida Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner no Brasil

A broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius) é uma das pragas-alvo do milho geneticamente modificado que expressa gene(s) que codifica(m) proteína(s) de *Bacillus thuringiensis* Berliner (milho Bt) no Brasil. Para estabelecer estratégias proativas de manejo de resistência, os objetivos do presente trabalho foram (1) estabelecer linhas-básicas de suscetibilidade à proteína Cry1F de *B. thuringiensis* em populações de *D. saccharalis* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil na safra de 2010/2011, (2) realizar monitoramento da suscetibilidade de populações de *D. saccharalis* na safra 2011/2012 e (3) avaliar a atividade biológica do milho Bt (evento TC1507) em diferentes estádios fenológicos no controle de *D. saccharalis* em condições laboratoriais. Para a caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade foram realizados bioensaios com a proteína purificada Cry1F aplicada superficialmente em dieta artificial. As CL_{50} de Cry1F estimadas variaram de 0,47 a 7,02 ng de Cry1F/cm² dieta artificial para as populações avaliadas (variação de ≈ 15 vezes). Foi definida e validada a concentração diagnóstica de 112 ng de Cry1F/cm², baseada na estimativa da CL_{99} das populações testadas para o monitoramento da suscetibilidade. A avaliação da atividade biológica de milho Bt (evento TC1507) foi realizada com dois híbridos (Pioneer 30F35 e Dow 2B688) nos estádios fenológicos V3, V6 e V9 e em duas épocas de plantio. Alta atividade de controle de *D. saccharalis* foi obtida para os dois híbridos de milho Bt nos diferentes estádios fenológicos e épocas de plantio. Portanto, verificou-se que a espécie *D. saccharalis* é altamente suscetível à proteína Cry1F. Contudo, a implementação de estratégias de manejo da resistência é de fundamental importância para preservar a vida útil da tecnologia de milho Bt como importante ferramenta em programas de MIP.

Palavras-chaves: *Diatraea saccharalis*; Milho Bt; Manejo de resistência; Cry1F.

ABSTRACT

Susceptibility of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1F insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* Berliner in Brazil

The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) is one of the target pests of genetically modified maize expressing genes that code for insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt* maize) in Brazil. To implement proactive resistance management strategies, we led studies (1) to establish baseline susceptibility to Cry1F protein from *B. thuringiensis* in populations of *D. saccharalis* collected from major maize production regions in Brazil during 2010/2011 growing season, (2) to lead susceptibility monitoring in populations of *D. saccharalis* collected in 2011/2012 growing season, and (3) to assess the biological activity of *Bt* maize (event TC1507) at different growth stages for *D. saccharalis* control under laboratory conditions. The baseline susceptibility was characterized with purified protein Cry1F applied superficially on artificial diet. The estimates of LC_{50} of Cry1F ranged from 0.47 to 7.02 ng Cry1F/cm² of artificial diet for the populations evaluated ($\approx$ 15-fold variation). A diagnostic concentration of 112 ng Cry1F/cm² was defined and validated for monitoring the susceptibility based on estimation of CL_{99} of all tested populations. The biological activity of *Bt* maize (event TC1507) was assessed by using two hybrids (Pioneer 30F35 and Dow 2B688) at growth stages V3, V6 and V9 and two planting seasons. High level of *D. saccharalis* control was obtained for the two *Bt* maize hybrids at different growth stages and planting seasons. Therefore, we conclude that *D. saccharalis* is highly susceptible to Cry1F protein. However, implementation of insect resistance management strategies is essential in order to preserve the lifetime of *Bt* technology as an important tool in IPM programs.

Keywords: *Diatraea saccharalis*; *Bt* maize; Resistance management; Cry1F.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Linha-básica de suscetibilidade de <i>Diatraea saccharalis</i> à proteína Cry1F. Condições controladas de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $60\pm 10\%$ de umidade relativa e 14 horas de fotofase.....	40
Figura 2	Análise conjunta dos dados de suscetibilidade de uma população suscetível de laboratório e de cinco populações de campo de <i>D. saccharalis</i> coletadas nas safras 2010/2011 à proteína Cry1F. A área hachurada indica a faixa de concentrações diagnósticas sugeridas para o monitoramento da resistência.....	41
Figura 3	Atividade biológica de dois híbridos de milho linhagem <i>Bt</i> HX e linhagem convencional CV no controle de <i>D. saccharalis</i> em diferentes estádios fenológicos na primeira época de plantio (Teste t $P\leq 0,05$).....	44
Figura 4	Atividade biológica de dois híbridos de milho linhagem <i>Bt</i> HX e linhagem convencional CV no controle de <i>D. saccharalis</i> em diferentes estádios fenológicos na segunda época de plantio (Teste t $P\leq 0,05$).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variação de suscetibilidade entre diferentes espécies de lepidópteros à proteína Cry1F baseada nas CL ₅₀ estimadas.....	30
Tabela 2	Dieta artificial utilizada para criação da espécie <i>Diatraea saccharalis</i> . (Adaptada de MACEDO et al., 1983).....	34
Tabela 3	Procedência, data de coleta e código das populações de <i>D. saccharalis</i> coletadas na cultura do milho nas diferentes regiões do Brasil (safra 2010/2011).....	35
Tabela 4	Procedência, data de coleta e código das populações de <i>D. saccharalis</i> coletadas na cultura do milho nas diferentes regiões do Brasil (safras 2011/2012).....	36
Tabela 5	Respostas de concentração-mortalidade à proteína Cry1F para lagartas neonatas de populações de <i>D. saccharalis</i> de laboratório e coletadas na cultura do milho nas safras 2010/2011 em bioensaio de aplicação superficial..	39
Tabela 6	Respostas de inibição de crescimento larval da população de laboratório (D/LAB) e das populações de campo de <i>D. saccharalis</i> coletadas nas safras 2010/2011 à proteína Cry1F mediante bioensaios de aplicação superficial.....	42
Tabela 7	Sobrevivência de populações de <i>D. saccharalis</i> coletadas em diferentes regiões produtoras de milho do Brasil na safra 2011/1012, monitoradas em bioensaios de aplicação superficial da concentração diagnóstica de 112 ng Cry1F/cm ² dieta artificial (Tukey $P \leq 0,05$).....	43
Tabela 8	Percentual de mortalidade de <i>D. saccharalis</i> após 5 dias sobre discos foliares de milho do evento TC1507 em diferentes híbridos, estádios fenológicos e épocas de plantio.....	46

1 INTRODUÇÃO

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) tem sido uma ameaça séria à cultura do milho no Brasil (FALCO et al., 2001; CASTRO et al., 2004; CRUZ, 2007), apesar de ter se consagrado como praga importante na cultura da cana-de-açúcar..

Devido ao hábito alimentar de *D. saccharalis*, o controle químico se torna uma alternativa pouco viável, já que essa espécie passa a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, ficando inacessível ao contato com inseticidas. Por isso, a introdução do parasitoide *Cotesia flavipes* (Cameron) como agente de controle biológico desta praga ainda é uma das ferramentas mais tradicionais e eficientes (MENDONÇA, 1996). Além desta, outra estratégia de controle de *D. saccharalis* tem sido a transferência de genes de *Bacillus thuringiensis* Berliner que codifiquem proteínas inseticidas às culturas do milho (JAMES, 2011) e da cana-de-açúcar (BRAGA et al., 2003).

Para a cultura do milho, os primeiros híbridos *Bt* produzidos (eventos MON810 e Bt11) expressam uma única proteína inseticida, Cry1Ab, para controle de brocas do colmo como *Ostrinia nubilalis* (Hübner), *Diatraea grandiosella* Dyar e *D. saccharalis* (F.) (CASTRO et al., 2004). Posteriormente, foram desenvolvidos híbridos de milho que expressam outras proteínas, como por exemplo, a proteína inseticida Cry1F (evento TC1507) liberada comercialmente no Brasil em 2008, além de eventos piramidados que expressam duas ou mais proteínas *Bt* para a mesma praga alvo (CTNBio, 2013).

Estudos recentes mostraram que lagartas de *D. saccharalis* são naturalmente menos suscetíveis à proteína inseticida Cry1Ab expressa em milho *Bt* MON810 comparada às outras brocas do colmo *O. nubilalis* e *D. grandiosella* (HUANG; LEONARD; GABLE, 2006; WU et al., 2009), e a primeira detecção de alelos de resistência foi em uma população de *D. saccharalis* capaz de completar seu desenvolvimento sobre milho *Bt* comercial que expressa Cry1Ab (HUANG; LEONARD; ANDOW, 2007). Além disso, foi detectado um número significativo de lagartas *D. saccharalis* sobreviventes em ensaios com milho *Bt* ainda em fase de experimentação (HUANG et al., 2012).

A variabilidade na suscetibilidade de insetos praga a toxinas *Bt* é natural e esperada não indicando necessariamente casos de resistência. Contudo, a estimativa desta variabilidade bem como o monitoramento da suscetibilidade de populações de campo, são estudos utilizados pró ativamente como alerta no manejo das culturas, para prevenir a ocorrência rápida evolução de resistência e consequente perda de tecnologias (STORER et al., 2010; VAN RENSBURG, 2007; DHURUA e GUJAR, 2011; GASSMANN et al., 2011).

Na maioria dos casos de evolução de resistência de insetos-praga-alvo a proteínas *Bt* em laboratório e campo, observa-se que esta característica é conferida por um único gene e de caráter recessivo (GOULD et al., 1992; GOULD et al., 1995; LIU et al., 2001; HUANG; LEONARD; ANDOW, 2007). Previsões teóricas e experiências recentes sugerem que a evolução de resistência pode ocorrer em poucos anos, a menos que sejam tomadas medidas que gerenciem esse processo evolutivo (GEORGHIOU e TAYLOR, 1986; TABASHNIK et al., 2008; KRUGER; VAN RENSBURG; VAN DEN BERG, 2009; DOWNES et al., 2010; DOWNES; PARKER; MAHON, 2010; BAGLA, 2010; XU et al., 2009). Se a evolução de resistência ocorre rapidamente, todos os benefícios obtidos das variedades *Bt* são perdidos.

No Brasil e em outros países, o manejo da resistência de insetos (MRI) a culturas *Bt* é feito principalmente mediante a estratégia de alta-dose e refúgio. Nesta estratégia, as plantas *Bt* expressam altas doses de proteína inseticida, que devem matar 99,99% dos insetos suscetíveis no campo e garantir a mortalidade de indivíduos heterozigotos que carregam o alelo de resistência (TABASHNIK; RENSBURG; CARRIÈRE, 2009), e são cultivadas simultaneamente a uma área de plantas não-*Bt*, denominada refúgio, que sustenta populações suscetíveis do inseto praga. A partir do pressuposto de que a resistência se desenvolve a partir de um único gene e recessivamente, a estratégia alta-dose/refúgio pode reduzir significativamente a evolução da resistência (TABASHNIK e CROFT, 1982; ONSTAD e GOULD, 1998; PECK; GOULD; ELLNER, 1999; CAPRIO, 2001). Outro pressuposto fundamental para efetividade desta estratégia é que alelos que conferem resistência à proteínas de *Bt* são raros, com frequência inicial em torno de 10^{-3} (ROUSH e MILLER, 1986; ROUSH e MCKENZIE, 1987).

Além do uso da estratégia de alta-dose e refúgio, é muito importante que em um cenário agrícola onde a área plantada de milho transgênico tem aumentado significativamente, como é o caso do Brasil, sejam feitos estudos de linha básica de suscetibilidade para verificar a variabilidade natural de resposta de populações de *D. saccharalis* frente a diferentes proteínas inseticidas *Bt* existentes no mercado. A broca da cana *D. saccharalis* tem causado preocupação aos produtores de milho pela alta incidência e dano, seja em áreas próximas ou distantes da cana de açúcar, sugerindo uma melhor adaptação desta aos híbridos de milho utilizados atualmente, ou devido ao sistema de produção predominante em uma determinada região.

O objetivo deste trabalho é fornecer bases para o manejo de resistência da espécie *D. saccharalis* à proteína Cry1F expressa em milho de forma pró-ativa, mediante estudos para: (1) estimar a linha-básica de suscetibilidade das principais regiões produtoras de milho no

Brasil na safra de 2010/2011, (2) monitorar a suscetibilidade da espécie na safra 2011/2012 e (3) avaliar a atividade biológica do milho *Bt* (evento TC1507) em diferentes estádios fenológicos no controle de *D. saccharalis* em condições laboratoriais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos bioecológicos de *Diatraeasaccharalis*

Conhecida popularmente como broca da cana-de-açúcar, *Diatraeasaccharalis* (Fabricius, 1794) é uma praga nativa do continente americano, ocorrendo desde sudeste dos EUA, México e Caribe até regiões mais quentes da América do Sul (CAPINERA, 2002; FALCO et al., 2001; REAGAN, 2001) sendo economicamente importante para todo Ocidente (LONG e HENSLEY, 1972). A espécie *D. saccharalis* foi durante muito tempo citada destacadamente como uma praga importante para a cultura de cana-de-açúcar e com menor destaque em outras culturas, como sorgo, arroz e milho (BOIÇA JÚNIOR & LARA, 1993; CASTRO et al., 2004; FERREIRA et al., 2004; MARQUES et al., 2006). Porém, nos últimos anos esta espécie tem sido indicada como ameaça séria à cultura do milho no Brasil.

Apesar de ser considerada uma espécie polífaga, dentre 17 gramíneas avaliadas em Porto Rico, as culturas preferidas para oviposição e mais atrativas para lagartas de primeiro instar foram o milho, cana-de-açúcar e sorgo (QUINTANA-MUÑIZ e WALKER, 1970). Os principais danos causados pelas lagartas broqueadoras ocorrem devido a sua alimentação no interior do colmo da planta. Em função desse hábito, as medidas convencionais de controle químico, mediante pulverizações de inseticidas de contato direcionados para a lagarta, são praticamente ineficientes.

O adulto de *D. saccharalis* é capaz de voar uma extensão de aproximadamente 300 metros, podendo chegar a 700 metros com o auxílio do vento (HAYWARD, 1943). Os ovos são depositados em massa sob as folhas de milho onde após um período de incubação de uma semana, as lagartas originadas de uma mesma massa de ovos eclodem quase ao mesmo tempo e ficam agregadas no cartucho começando a raspar e se alimentar do tecido foliar. Após a eclosão, a lagarta passa por um período de até 12 dias na parte externa da planta e só a partir deste período começa a penetrar no colmo de milho, ficando neste local até a emergência do adulto (FIGUEIREDO; CRUZ; SILVA, 2010). Dentro deste colmo ocorre a transformação em pupa, em um túnel criado pela lagarta com uma fina camada de tecido da planta que é removido pela mariposa ao sair do hospedeiro (CRUZ, 2007).

A duração do ciclo ovo-adulto de *D. saccharalis* é bastante variável e isto se dá por diversos fatores climáticos e de nutrição (PARRA et al., 1999). Em condição ambiente, sobre plantas de milho e com temperatura média de 25 °C, o ciclo total desta praga dura em média 40 dias (FIGUEIREDO; CRUZ; SILVA, 2010) e comparando parâmetros biológicos de desenvolvimento em áreas canavieiras, Mélo e Parra (1988) verificaram que há possibilidade

de ocorrer até 5 gerações anuais. Em áreas canavieiras, a primeira geração é observada em outubro-novembro, a segunda entre dezembro-fevereiro, a terceira em fevereiro-março, a quarta em abril-maio e eventualmente a quinta geração a partir de junho (MACEDO e MACEDO, 2007). No Brasil, o ciclo e infestações de *D. saccharalis* estão diretamente relacionados ao sistema de plantio predominante de suas culturas hospedeiras, tais como cana de açúcar, sorgo e milho.

Após o plantio, a lavoura de cana-de-açúcar permite de três a seis colheitas consecutivas, dependendo de vários fatores: variedades, manejo de solo e de água e clima. Com o término do ciclo da cana, o produtor pode optar por renovar imediatamente seu plantio ou fazer a rotação com outras culturas. O sistema mais comum em rotação ou reforma envolve operações como: retirada da cana (entre setembro e outubro), destruição da soqueira, calagem, preparo do solo, plantio da cultura anual, colheita (entre fevereiro e março) e novo plantio de cana, logo em seguida.

O cultivo de espécies de ciclo curto nas áreas de reforma de cana-de-açúcar, como milho e sorgo, proporciona ao produtor de cana uma série de vantagens (MONTEIRO e FERREIRA, 1986). Quando se utiliza o milho, este pode ser aproveitado para silagem e produção de grãos na alimentação animal. Atualmente tem-se utilizado também o sorgo sacarino, pois fornece açúcar armazenado no colmo e uma quantidade de bagaço suficiente para geração de vapor na operação industrial. O grande problema é que quando se faz a reforma de canaviais com culturas de sorgo e milho, o ciclo de vida de *D. saccharalis* não é quebrado e sim favorecido pela sucessão de culturas hospedeiras.

Quando a infestação de *D. saccharalis* ocorre em plantas de milho e sorgo jovens, o interior do cartucho danificado ocasiona o sintoma conhecido como “coração morto”. As lagartas danificam também o colmo da planta, debilitando-a ou matando-a e causando o quebramento da planta madura. No entanto, as perdas em rendimentos do milho têm sido atribuídas a um aumento da esterilidade, redução no tamanho da espiga e do grão, assim como uma interferência na colheita mecânica. Tais perdas na colheita, historicamente já chegaram a 27% em termos de grãos (FLOYD, 1966).

Devido ao hábito alimentar da praga, o controle químico de *D. saccharalis* se torna pouco viável já que essa espécie passa a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, ficando inacessível ao contato com inseticidas. Por essa razão surgiu o interesse na transferência de genes de *B. thuringiensis* que codifiquem proteínas inseticidas à cultura do milho e mais recentemente à cana-de-açúcar (BRAGA et al., 2003), a fim de minimizar os danos causados por essa praga. A busca de linhagens de *B. thuringiensis* com alta atividade tóxica e diferentes

especificidades a insetos é de extrema importância para a utilização como fonte de genes para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos (BOBROWSKI et al., 2001).

2.2 A tecnologia Bt

A clonagem e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* Berliner forneceram novas perspectivas do uso desta bactéria e de suas proteínas com ação inseticida (SCHNEPF e WHITELEY, 1981). Como resultado deste avanço da engenharia genética, uma nova tecnologia para o controle de insetos-praga foi obtida: as plantas transgênicas resistentes a insetos que expressam genes codificadores de proteínas inseticidas oriundos de *B. thuringiensis*, denominadas de plantas Bt (FISCHHOFF, 1987; VAECK et al., 1987).

Em 1901, estudos realizados pelo bacteriologista Shigetane Ishiwata sobre uma doença misteriosa que estava matando muitas populações de bicho-da-seda *Bombyx mori* (L.) no Japão, levaram a primeira descoberta, isolamento e identificação desta bactéria de solo (ISHIWATA, 1901). Posteriormente, em 1911, o biólogo alemão Ernst Berliner fez uma descoberta similar enquanto isolava a bactéria responsável pela morte das mariposas de *Ephestia kuehniella* (Zell) (BERLINER, 1915; SIEGEL, 2000; SANAHA et al., 2011).

B. thuringiensis é uma bactéria de solo anaeróbica facultativa e gram-positiva que produz durante a esporulação δ -endotoxinas específicas em forma de cristais (Cry), e durante os estágios de crescimento vegetativo proteínas inseticidas vegetativas (Vip) (ZAKHARYAN, 1979; GASSER e FRALEY, 1989; VAECK; REYNAERTS; HOFTE, 1989; ESTRUCH et al., 1997). Desde a década de 20, foram lançados vários produtos comerciais, como Dipel[®], originados da fermentação e secagem de esporos/cristais de Bt, transformados em pó molhável ou granulados que misturados à água podiam ser pulverizados nas áreas de produção para o controle de lagartas.

Produtos à base de Bt sempre foram considerados inofensivos ao ambiente, além de serem altamente eficazes e relativamente baratos de produzir comparativamente a outros inseticidas. Por este motivo, em pouco tempo se tornaram os biopesticidas mais amplamente utilizados no mundo para o controle de lepidópteros, e algumas larvas de coleópteros e dípteros (BAUM; JOHNSON; CARLTON, 1999; KAUR, 2000).

Existem muitas linhagens de Bt e cada linhagem produz cristais proteicos ou δ -endotoxinas específicas para cada praga alvo. Após seu primeiro sequenciamento genético em 1985, muitos genes Cry foram sequenciados e classificados em várias classes, subclasses e subfamílias baseando-se na similaridade das sequências de aminoácidos (SCHNEPF; WONG;

WHITELEY., 1985). O grupo atual é formado por 51 classes de proteínas Cry (Cry1 a Cry51), cada classe com várias subclasses (Cry 1A, Cry1B, Cry1C etc) e cada subclasse com várias subfamílias (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac etc) (LI et al., 1991; CRICKMORE et al., 2012).

Com este avanço dos conhecimentos em engenharia genética, realizou-se a primeira modificação genética em plantas de fumo para expressarem δ -endotoxinas, no caso através do gene *Cry1Ab* em 1987 na Bélgica (VAECK; REYNAERTS; HOFTE, 1989). Posteriormente nos EUA, batatas *Bt* foram desenvolvidas para controle do coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* Say e em seguida lançadas comercialmente por serem consideradas seguras para a alimentação humana (PERLAK et al., 1993).

Desde então, muitas outras culturas foram sendo desenvolvidas para expressarem genes de interesse agrônomo. Atualmente existem cerca de 25 culturas geneticamente modificadas, e entre elas está a cultura do milho *Bt* (JAMES, 2011).

2.3 Estratégia de alta-dose e refúgio no manejo de resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas

A primeira geração de híbridos de milho *Bt*, como YieldGard® e Herculex®, expressa uma única proteína inseticida de *Bt*, Cry1Ab e Cry1F respectivamente. Mas, para retardar a evolução de resistência, mais recentemente tem sido utilizada a estratégia de genes piramidados onde as plantas transgênicas desenvolvidas expressam duas ou mais proteínas inseticidas às mesmas pragas alvo. Esta nova geração de híbridos de milho expressando genes *Bt* piramidados, se tornaram disponíveis comercialmente para o controle de insetos-praga primeiramente nos Estados Unidos e Canadá e estão no mercado brasileiro desde 2010 com os eventos Bt11×MIR162×GA21 (Cry1Ab, VIP3Aa20, mEPSPS), MON89034×TC1507×NK603 (Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, CP4-EPSPS), TC1507×MON810×NK603 (Cry1Ab, Cry1F, CP4-EPSPS), TC1507×MON810 (Cry1F, Cry1Ab) e MON89034×MON88017 (Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4-EPSPS) (CTNBio, 2013).

Apesar do avanço na tecnologia de produção de híbridos *Bt*, previsões teóricas e experiências sugerem que a resistência pode evoluir em poucos anos, a menos que sejam tomadas medidas que gerenciem o processo evolutivo (GEORGHIOU e TAYLOR, 1986; TABASHNIK et al., 2008; KRUGER; VAN RENSBURG; VAN DEN BERG, 2009; DOWNES et al., 2010; DOWNES; PARKER; MAHON, 2010; BAGLA, 2010; XU et al., 2009). Um dos principais casos de resistência a campo em milho geneticamente modificado foi de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) à proteína Cry1F em Porto Rico (STORER et

al.,2010) que se desenvolveu em apenas 4 anos de utilização da tecnologia. Outros casos importantes de resistência a culturas *Bt* foram da broca-africana-do-milho *Busseola fusca* (Fuller) ao milho expressando a proteína Cry1ab na África (VAN RENSBURG, 2007), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) a proteína Cry1Ac expressa em algodão na Índia (DHURUA e GUJAR, 2011) e *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte a proteína Cry3Bb1 expressa em milho nos EUA (GASSMANN et al., 2011).

Estudos recentes mostraram que lagartas de *D. saccharalis* são naturalmente menos suscetíveis à proteína Cry1Ab de milho *Bt* comercial que outras brocas do colmo como *O. nubilalis* e *D. grandiosella* (HUANG; LEONARD; GABLE, 2006; WU *et al.*, 2009) e que dentre todas as espécies importantes de lagartas broqueadoras do colmo, a primeira detecção de alelos de resistência foi em uma população de *D. saccharalis* capaz de completar seu desenvolvimento sobre milho *Bt* comercial que expressa a proteína inseticida Cry1Ab (HUANG; LEONARD; ANDOW, 2007). O problema é que quando a resistência ocorre rapidamente, todos os benefícios obtidos das novas tecnologias de variedades *Bt* são perdidos.

Qualquer processo evolutivo ocorre dentro de uma espécie devido à variabilidade genética natural e pressão de seleção. Por meio de bioensaios em laboratório é possível verificar rapidamente que os insetos praga possuem uma variabilidade natural de suscetibilidade a proteínas inseticidas *Bt* e, avaliar o potencial de evoluir em resistência às culturas *Bt* no campo (GOULD, 1998; TABASHNIK, 1994; TABASHNIK et al. 2003). Este fato é importante para programas de manejo integrado de pragas (MIP), pois revela a necessidade de utilizar a rotação de diferentes táticas de controle.

O manejo da resistência de insetos a culturas *Bt* tem sido feito em muitos países, incluindo o Brasil, mediante o uso da estratégia de alta-dose e refúgio, em que plantas *Bt* devem expressar altas doses de proteína inseticida e ser cultivadas simultaneamente a uma área de plantas não *Bt*, denominada refúgio, que mantém populações suscetíveis do inseto-praga alvo. Assume-se como alta-dose a planta que expressa a proteína inseticida em concentração de pelo menos 25 vezes a que seria necessária para matar 99% de uma população suscetível de referência (CAPRIO; SUMERFORD; SIMS, 2000). Uma definição alternativa de alta-dose é que a planta *Bt* deve matar 99,99% dos insetos suscetíveis no campo (TABASHNIK; RENSBURG; CARRIÈRE, 2009).

Esta estratégia de manejo baseia-se no pressuposto de que: a resistência é monogênica e funcionalmente recessiva (RR); alelos que conferem resistência às proteínas *Bt* são raros numa frequência menor que 10^{-3} ; os raros insetos homozigotos resistentes (RR) da cultura *Bt* acasalam com os insetos homozigotos suscetíveis (SS) da área de refúgio e o heterozigoto

(RS) resultante do acasalamento é morto pela alta-dose da proteína inseticida expressa na planta *Bt* (ROUSH e MILLER, 1986; ROUSH e McKENZIE, 1987; TABASHNIK e CROFT, 1982; TABASHNIK *et al.*, 1997; ONSTAD e GOULD, 1998; PECK; GOULD; ELLNER, 1999; CAPRIO SUMERFORD; SIMS, 2000; CAPRIO, 2001).

Apesar de a estratégia de alta-dose e refúgio ser amplamente adotada no manejo de resistência de culturas *Bt*, dados empíricos básicos que comprovem sua eficiência são escassos. Utilizar populações selecionadas em laboratório que exibem altos níveis de resistência, e com padrão de herança genética conhecida, tem sido uma forma bastante útil de validar as estratégias de manejo (ZHAO *et al.*, 2005; MORIN *et al.*, 2004). Mediante a realização de cruzamentos recíprocos de uma população de *O. nubilalis* selecionada com razão de resistência de 3000 vezes à proteína Cry1F, foi possível verificar que a herança do gene de resistência a esta proteína é autossômico e recessivo, e que então para esta espécie a estratégia de alta-dose e refúgio como manejo de resistência é apropriada (PEREIRA; STORER; SIEGFRIED, 2008).

Mapas de ligação genética de uma população de *O. nubilalis* selecionada resistente, mostraram que a característica de resistência a proteína Cry1F é controlada por um único locus de característica quantitativa e que este não está associado a genes receptores intestinais de *Bt* conhecidos, como a fosfatase alcalina, aminopeptidase, e caderinas (COATES *et al.*, 2011). A evidência sugere que os genes neste intervalo do genoma podem dar origem a uma nova característica de resistência à toxina *Bt* para lepidópteros que apresentem independência dos receptores conhecidos.

Além disso, análises e comparações de sítios de ligação do epitélio intestinal de lagartas de *O. nubilalis* suscetíveis e resistentes sugerem que a redução de ligação de Cry1F aos receptores dos insetos não está associada à resistência, e que não foram observadas diferenças na atividade das proteases intestinais ou processos proteolíticos da toxina alterados na população resistente (PEREIRA *et al.*, 2010). Adicionalmente, a partir de um estudo de herança por cruzamentos recíprocos, foi observado um baixo custo adaptativo associado à resistência a proteína Cry1F em *O. nubilalis*, pois indivíduos heterozigotos apresentaram desempenho igual ou até melhor que indivíduos homozigotos suscetíveis, indicando que os pequenos custos adaptativos devem ser recessivos (PEREIRA; STORER; SIEGFRIED, 2011). Esta informação pode ter implicações práticas importantes, pois quando heterozigotos tem adaptação equivalente a indivíduos suscetíveis homozigotos, alelos de resistência podem persistir ao longo de gerações (ROUSH e McKENZIE, 1987).

Em todo e qualquer caso, sabe-se que a resistência é um caráter pré-adaptativo e hereditário que pode ser presente em uma população de organismo vivo em decorrência da variabilidade genética. A pressão de seleção leva ao aumento da frequência do gene que confere resistência à população, e dessa forma o processo de evolução da resistência se acelera quando há o uso contínuo de um determinado agente de controle, como o caso de plantas geneticamente modificadas, onde a pressão de seleção se dá continuamente com altas doses de proteína inseticida. Por este motivo é tão essencial que a variabilidade natural das pragas alvo às tecnologias *Bt* seja conhecida e monitorada.

2.4 Monitoramento da suscetibilidade das pragas-alvo a proteínas *Bt*

Uma das dificuldades no manejo da resistência é a habilidade de monitorar efetivamente a evolução da resistência nas populações de campo de insetos praga a determinada proteína inseticida expressa em plantas *Bt*. Para verificar a suscetibilidade de uma população de insetos praga, habitualmente tem-se coletado uma amostra de campo e observado como sua progênie responde à proteína inseticida em laboratório. Para avaliar a variabilidade genética de uma população amostrada em relação a uma tecnologia *Bt*, por exemplo, têm-se caracterizado a linha básica de suscetibilidade desta população, comparativamente a uma população suscetível de referência, sob uma faixa determinada de concentrações da proteína inseticida com métodos padronizados de bioensaio, estimando-se a CL_{50} (concentração letal que mata 50% da população). Por meio destes bioensaios é possível verificar se as populações de campo com histórico de exposição à proteína inseticida estão apresentando menor suscetibilidade que populações de laboratório que não foram expostas à proteína (TABASHNIK, 1994). Esses métodos têm sido adequados para documentar resistência já em níveis elevados ou quando a resistência é dominante, mas não detectam pequenas mudanças na frequência de indivíduos resistentes ou quando esta característica genética é recessiva (PLAPP et al, 1990; HALLIDAY e BURNHAM, 1990).

Devido à variabilidade genética, é natural que exista variação de suscetibilidade nos insetos às diferentes táticas de controle, assim como também acontece para a proteína Cry1F, tanto entre populações da mesma espécie como também entre espécies diferentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Variação de suscetibilidade entre diferentes espécies de lepidópteros à proteína Cry1F baseada nas CL₅₀ estimadas

Espécie	CL ₅₀ (IC 95%) ¹	Referência
<i>Diatraeasaccharalis</i>	73,4 (35,2 - 163,3)	Tan et al., 2011
<i>Ostriniafurnacalis</i>	13,9 (12,0-15,9)	Tan et al., 2011
<i>Ostrinianubilalis</i>	12,7 (9,1-17,2)	Tan et al., 2011
	2,72 a 6,11 (2,30-7,03)	Gaspers et al., 2011
<i>Spodopterafrugiperda</i>	1,0 a 63,7 (0,01-85,2)	Storer et al., 2012
<i>Sesamianonagrioides</i>	10,0 a 29,6 (4,5-44,0)	Farinós et al., 2012
<i>Heliothisvirescens</i>	2,76 a 8,23 (1,97-10,20)	Blanco et al., 2008

¹ng cm⁻²

Uma alternativa ao teste tradicional de comparação das CL₅₀ envolve o uso de concentrações diagnósticas ou discriminatórias, estimadas a partir da CL₉₉, que além de ser mais eficiente, exige uma menor quantidade de indivíduos a serem testados e menos tempo (ROUSH e MILLER, 1986; FRENCH-CONSTANT e ROUSH, 1990). Esta técnica apresenta maior eficiência na detecção de resistência quando os alelos que conferem resistência ocorrem em frequências baixas, pois todos os indivíduos são testados em uma concentração mais apropriada sem que haja desperdício destes em concentrações mais baixas ou mais altas onde a porcentagem de mortalidade não seria informativa (ROUSH e MILLER, 1986; MARÇON et al., 2000).

Porém, quando a frequência de um alelo recessivo de resistência é menor que 10⁻³, seria necessário coletar mais de 10⁶ indivíduos de campo para se detectar pelo menos um indivíduo resistente. Diante disso novas técnicas de detecção foram elaboradas. Andow e Alstad (1998) utilizaram pela primeira vez a técnica do F₂screen que melhora ainda mais a eficiência de medição de alelos raros de resistência em populações naturais. Como proposto originalmente para detectar resistência à proteína inseticida Cry1Ab em *Ostrinianubilalis*, esta técnica envolve a formação de linhagens isofêmeas e seleção de suas progênes na geração F₂ (ANDOW e ALSTAD, 1998). Este procedimento baseia-se no pressuposto que a endogamia forçada na geração F₁ (cruzamento entre irmãos) de casa isolinha, aumenta a probabilidade de encontrar um indivíduo resistente homozigoto recessivo na geração F₂, tornando conhecido qualquer genótipo dos indivíduos coletados no campo. Dessa forma, quando a resistência é recessiva, a técnica do F₂screen é ainda mais eficiente que a utilização de concentrações diagnósticas (HUANG et al., 2011).

Visando um monitoramento ainda mais rápido, efetivo e com custos reduzidos, estudos tem buscado detectar mudanças na frequência inicial de alelos de resistência por meio de técnicas de marcadores moleculares e estudos filogenéticos de genomas mitocondriais (KIM et al., 2006; CAMERON; JOHNSON; WHITING, 2007; CHA et al., 2007; CAMERON e WHITING, 2008; HONG et al., 2009; LI et al., 2011). Análises de DNA para genes de receptores intestinais de *Bt* como as caderinas tem sido feitas em alguns casos (TABASHNIK et al., 2006; GAHAN et al., 2007; XU; YU; WU, 2005; YANG et al. 2007; YANG et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Entretanto, enquanto os bioensaios tradicionais de concentração resposta podem detectar resistência a qualquer mecanismo, análises de DNA detectam apenas alelos de resistência associados com mecanismos previamente identificados e podem subestimar a frequência de todos os alelos que conferem resistência (MORIN et al., 2004; GAHAN et al., 2007).

De qualquer forma, é muito importante que o monitoramento das populações de campo expostas a proteínas inseticidas *Bt* seja realizado com frequência, a fim de acompanhar a evolução da resistência e garantir o funcionamento da estratégia de alta-dose e refúgio utilizada no manejo de culturas *Bt*, uma vez que verificará se o risco de resistência se mantém baixo (BOURGUET et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A criação e manutenção das populações dos insetos utilizados para realização dos bioensaios, bem como todos os bioensaios foram realizados no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba/SP.

3.1 Criação e manutenção das populações de *D. saccharalis*

A população de *D. saccharalis* que foi utilizada como suscetível de referência tem sido mantida pelo Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas desde 2008, e as populações de *D. saccharalis* oriundas de campo foram coletadas na cultura de milho nas principais regiões agrícolas do Brasil.

Lagartas recém-eclodidas foram transferidas para tubos de vidro com dimensões de 2,5 cm de diâmetro $\times$ 8,5 cm de altura contendo dieta artificial (Tabela 2) (MACEDO et al., 1983), sendo posteriormente vedados com chumaço de algodão hidrofóbico e seguindo as técnicas assépticas de criação de insetos descrita por Parra (1999). Em cada tubo foram infestadas em média sete lagartas que ali permaneceram até a fase de pupa. As pupas foram então retiradas e acondicionadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro $\times$ 1,5 cm de altura) forradas com papel filtro e cobertas com um copo plástico (150 ml) invertido, até a emergência dos adultos. Após a emergência, os insetos adultos foram transferidos para gaiolas cilíndricas de PVC (20 cm de altura $\times$ 15 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco e fechadas na parte superior com placas de Petri, para acasalamento e oviposição. Sob a gaiola foi colocada uma camada de folha absorvente e papel filtro embebidos com água destilada para manter alta umidade. Ao serem coletados, os ovos foram tratados com sulfato de cobre a 1%, e uma vez secos, foram acondicionados em potes plásticos (10 cm de diâmetro $\times$ 8 cm de altura) contendo algodão embebido em água destilada para manter a umidade e incubados em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h. Após a eclosão, uma fração das lagartas foram infestadas em dieta artificial para manutenção da criação e outra fração foi utilizada para realização dos bioensaios.

Tabela 2 – Dieta artificial utilizada para criação da espécie *Diatraea saccharalis* (Adaptada de MACEDO et al., 1983)

Ingrediente	Quantidade
Germe de Trigo (g)	52,63
Farelo de Soja (g)	78,95
Açúcar Refinado (g)	63,16
Sais de Wesson (g)	5,00
Ácido Ascórbico (g)	2,50
Cloreto de Colina (g)	0,50
Nipagin (g)	6,00
Tetraciclina (g)	0,40
Ágar (g)	14,00
Vita Gold (g)	0,80
Solução Vitamínica (ml)	11,00
Formaldeído (ml)	1,00
Água(ml)	1200

3.2 Caracterização da linha básica de suscetibilidade de *D. saccharalis* à proteína purificada Cry1F de *B. thuringiensis*

Para caracterização da suscetibilidade de *D. saccharalis* à proteína Cry1F, foi utilizada a população suscetível de referência (D/LAB) e as cinco populações de campo coletadas na safra agrícola 2010/2011 em diferentes regiões geográficas do Brasil (Tabela 3) nas gerações F₁ e F₂.

Foram testadas de cinco a oito concentrações da proteína purificada Cry1F aplicadas superficialmente em dieta artificial. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro a sete repetições para cada concentração representada por um grupo de 16 lagartas, sendo testadas no mínimo 64 lagartas por concentração. A atividade da proteína Cry1F foi verificada mediante avaliação de mortalidade e redução de peso das larvas sobreviventes após sete dias de exposição à proteína inseticida. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para as estimativas das concentrações letais (CL) e respectivos intervalos de confiança (IC95%) por meio do programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). Os dados referentes ao peso médio das lagartas sobreviventes foram submetidos à análise de regressão não-linear (SIMS et al., 1996) para as estimativas das

concentrações efetivas (CE), mediante o uso do programa JMP SAS versão 9.1 (SAS INSTITUTE, 2010).

Tabela 3- Procedência, data de coleta e código das populações de *D. saccharalis* coletadas na cultura do milho nas diferentes regiões do Brasil (safra 2010/2011).

Estado	Município	Data de Coleta	Código da população	Latitude	Longitude
Goiás	Inaciolândia	23/02/2011	D/GO-2	18° 29' 49,5" S	49° 58' 53,3" O
Mato Grosso	Campo Verde	19/04/2011	D/MT-7	15° 13' 945" S	54° 09' 757" O
Minas Gerais	Uberlândia	23/05/2011	D/MG-4	19° 02' 28,7" S	48° 11' 41,1" O
São Paulo	Jaboticabal	09/06/2011	D/SP-4	21° 14' 41" S	48° 15' 09" O
Paraná	Rolândia	20/07/2011	D/PR-7	23° 17' 47,1" S	51° 21' 10,0" O

Para estimativa das concentrações diagnósticas, os dados de mortalidade das cinco populações de *D. saccharalis* coletadas a campo na safra 2010/2011 foram agrupados e analisados conjuntamente, segundo o método proposto por Sims et al. (1996). Os dados de mortalidade foram submetidos ao modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo CLL) que foi usado para descrever a relação entre a concentração da proteína e a probabilidade de mortalidade acumulada (ROBERTSON e PREISLER, 1992), utilizando o procedimento de Probit no programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE, 2010). Por meio deste modelo foi estimada a CL₉₉ e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) e definida a concentração diagnóstica para o monitoramento da suscetibilidade de *D. saccharalis* à proteína Cry1F, baseado em valores próximos do limite inferior do IC 95%.

Pelos resultados consistentes obtidos e em função da maior rapidez de execução, menor consumo de proteína e ao hábito de *D. saccharalis* se alimentar nos primeiros dias de seu estágio larval apenas superficialmente da dieta, associado ao fato de trabalhos anteriores terem sido realizados com aplicação superficial da proteína Cry1F, optou-se por trabalhar com esse método durante os trabalhos de linha básica e também de monitoramento (STORER et al., 2010; TAN et al., 2011).

3.3 Monitoramento da suscetibilidade a proteína inseticida Cry1F em populações de *D. saccharalis* coletadas na cultura do milho no Brasil

O monitoramento da suscetibilidade de *D. saccharalis* à proteína Cry1F foi realizado com populações coletadas em campo na safra 2011/1012 (Tabela 4) em diferentes regiões do Brasil nas gerações F₁ e F₂, mediante bioensaios com aplicação superficial em dieta artificial da concentração diagnóstica previamente definida. Foram realizadas 18 repetições (16 lagartas na testemunha de cada repetição) com as lagartas distribuídas em bandejas de bioensaio de 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), totalizando 2016 lagartas para cada população monitorada. As placas foram vedadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO-CV-16, CD International Inc.), que permitem as trocas gasosas com o ambiente externo, e acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h. No sétimo dia após a inoculação das lagartas neonatas (0 – 24h), foi feita a avaliação de mortalidade, onde lagartas sem movimento aparente após leve toque com pincel e que não ultrapassaram o primeiro instar larval foram consideradas mortas. Os dados de mortalidade (X) foram transformados para $\arcsen\sqrt{X/100}$ e submetidos à análise de variância. Para discriminação dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro ($P \leq 0,05$), utilizando o software SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2010).

Tabela 4— Procedência, data de coleta e código das populações de *D. saccharalis* coletadas na cultura do milho nas diferentes regiões do Brasil (safras 2011/2012).

Estado	Município	Data de Coleta	Código da população	Latitude	Longitude
Paraná	Sabáudia	29/03/2012	D/PR-8	23° 18' 39,6" S	51° 31' 08,0" O
São Paulo	Jaboticabal	16/05/2012	D/SP-7	21° 02' 39,6" S	48° 14' 32,0" O
São Paulo	Palmital	30/07/2012	D/SP-8	22° 46' 31,84" S	50° 13' 46,64" O
Mato Grosso do Sul	Douradina	24/05/2012	D/MS-3	22° 01' 13,43" S	54° 32' 03,55" O
Mato Grosso	Jaciara	18/06/2012	D/MT-9	15° 49' 15,9" S	55° 15' 12,54" O

3.4 Avaliação da atividade biológica do milho *Bt* (evento TC1507) em diferentes estádios fenológicos no controle de *D. saccharalis*

Foram avaliados dois híbridos de milho *Bt* Herculex[®] (Pioneer 30F35 e Dow 2B688) e suas respectivas isolinhas convencionais não *Bt* em condições de campo na densidade de sete plantas por metro linear e espaçamento entre linhas de 0,5 m. As avaliações da atividade

biológica desses híbridos ocorreram em duas épocas de plantio, com semeaduras em 20 de novembro de 2011 (primeira época) e 04 de fevereiro de 2012 (segunda época). Os tratamentos culturais seguiram as recomendações técnicas para a região sem aplicação de inseticidas durante o período de estudo. Os estádios fenológicos das plantas utilizadas para os bioensaios com discos foliares foram V3, V6 e V9.

As folhas completamente expandidas da região mediana das plantas foram retiradas e levadas ao laboratório, e com o auxílio de um vazador metálico, foram obtidos discos foliares de 2,4cm de diâmetro. Os discos foram então acondicionados em placas de acrílico com 12 células sobre uma camada de mistura não geleificada de ágar-água a 2,5% (1 ml por célula). Os discos de folha de milho foram mantidos separados da camada de ágar-água por um disco de papel filtro. Posteriormente, com o auxílio de um pincel fino inoculou-se uma única lagarta neonata (0 – 24h) de uma população suscetível de referência à proteína Cry1F disponível, no caso a população de laboratório (D/LAB). As placas foram vedadas com filme plástico e em seguida tampadas e acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos representados por dois híbridos de milho *BtHerculex*[®] (Pioneer 30F35 e Dow 2B688) e seus respectivos controles (milho não *Bt* isolinha convencional), e com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de 12 lagartas neonatas.

Aos cinco dias após a inoculação, avaliou-se a mortalidade e peso das lagartas sobreviventes. Lagartas sem movimento aparente após leve toque com pincel e aquelas que não ultrapassaram o primeiro instar foram consideradas mortas. Os dados de mortalidade (χ) das repetições dos tratamentos com híbridos de milho *Herculex*[®] foram corrigidos a partir dos tratamentos com isolinhas convencionais (ABBOTT, 1925) e transformados por $\sqrt{(X) + 0,1}$. Para se avaliar o peso, as lagartas sobreviventes de cada repetição foram separadas e pesadas em balança de precisão. A redução do desenvolvimento larval foi calculada a partir dos dados obtidos nos tratamentos com milho não *Bt*. Para discriminação dos tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste t (híbrido *Bt* versus isolinha convencional dentro de cada estágio fenológico) e pelo teste de Tukey (híbrido *Bt* entre os estádios fenológicos) ao nível de 5% de probabilidade de erro ($P \leq 0,05$), utilizando o software SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da linha básica de suscetibilidade de *D. saccharalis* à proteína purificada Cry1F de *B. thuringiensis*

As populações de campo de *D. saccharalis* avaliadas apresentaram elevada suscetibilidade à proteína Cry1F que variaram de 0,47 a 7,02 ng de Cry1F/ cm² de dieta artificial. Para estas populações, os dados de mortalidade se ajustaram ao modelo de Probit confirmados pelo valor de Qui-quadrado (χ^2) (Tabela 5). Foi observada também uma menor suscetibilidade da população de laboratório, porém esta teve seu intervalo de confiança sobreposto a algumas populações de campo, sendo também considerada bastante suscetível à proteína Cry1F. Todas as populações testadas tiveram CL₅₀ inferiores ao que Tan et al., 2011 observaram de 73,4 ng de Cry1F /cm² de dieta artificial.

Tabela 5 - Respostas de concentração-mortalidade à proteína Cry1F para lagartas neonatas de populações de *D. saccharalis* de laboratório e coletadas na cultura do milho nas safras 2010/2011 em bioensaio de aplicação superficial

População	N	Coef. Ang. ($\pm$ EP)	CL ₅₀ (IC 95%) ¹	χ^2	g.l.
D/LAB	288	1,34 ($\pm$ 0,15)	5,96 (4,02-8,35)	0,26	3
D/GO-2	400	0,89 ($\pm$ 0,10)	3,220 (1,73-5,24)	4,22	5
D/MT-7	464	1,13 ($\pm$ 0,12)	7,02 (4,77-10,09)	3,95	5
D/MG-4	272	0,82 ($\pm$ 0,14)	0,47 (0,14-1,03)	2,41	3
D/SP-4	208	1,07 ($\pm$ 0,15)	1,96 (0,97-3,51)	0,12	2
D/PR-7	400	1,95 ($\pm$ 0,23)	5,62 (2,89-8,67)	3,52	3

¹ng cm⁻²

Pela análise da razão entre a maior e a menor CL₅₀, estimadas das populações de *D. saccharalis* coletadas em campo, verificou-se uma diferença de aproximadamente 15 vezes na suscetibilidade a proteína Cry1F. As diferenças de CL₅₀ observadas são normais, pois existe variabilidade genética das populações de *D. saccharalis* o que ocasiona diferenças de suscetibilidade entre as populações.

Em trabalho similar, Blanco et al. (2008) estimou que para *H. virescens* a CL_{50} variou de 2,76 a 8,23 ng de Cry1F/cm² de dieta artificial. Da mesma forma, foram estimadas as CL_{50} = 1,0 a 63,7 e CL_{50} =12,7 ng de Cry1F/cm² de dieta artificial para *S. frugiperda* e *O. nubilalis* respectivamente, mostrando que também existe variabilidade de suscetibilidade entre espécies diferentes à mesma proteína inseticida e com os mesmos métodos de bioensaio (STORER et al., 2012; TAN et al., 2011).

Os maiores valores de coeficientes angulares obtidos permitiram observar que as populações oriundas do Mato Grosso, São Paulo, Paraná e também a população de laboratório apresentaram maior sensibilidade de resposta, ou seja, com pequenos incrementos na concentração da proteína Cry1F na dieta ocorreram aumentos de mortalidade consideráveis (Figura 1).

Figura 1 -Linha-básica de suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* à proteína Cry1F. Condições controladas de $27\pm1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $60\pm10\%$ de umidade relativa e 14 horas de fotofase

Após o agrupamento e análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade da população de laboratório e das cinco populações de campo de *D. saccharalis* coletadas nas

safras 2010/2011, estimou-se uma $CL_{99} = 145,38$ ($IC_{95\%} 110,60 - 201,76$) ng de Cry1F.cm⁻² de dieta artificial (Figura 2).

Figura 2 - Análise conjunta dos dados de suscetibilidade de uma população suscetível de laboratório e de cinco populações de campo de *D. saccharalis* coletadas nas safras 2010/2011 à proteína Cry1F. A área hachurada indica a faixa de concentrações diagnósticas sugeridas para o monitoramento da resistência.

Em relação à resposta de inibição de crescimento larval por redução de peso, os valores estimados de CE_{50} variaram de 3,22 a 8,32 ng de Cry1F.cm⁻² de dieta artificial (Tabela 6). Em muitos trabalhos, as respostas de inibição de crescimento têm sido consideradas mais sensíveis que os bioensaios de concentração-resposta da mortalidade para detecção de incipientes mudanças na suscetibilidade de lepidópteros-praga à proteína Cry1F, uma vez que se obtém grande redução no desenvolvimento larval mesmo em baixas concentrações da proteína. Porém observou-se que a variação de suscetibilidade de populações de *D. saccharalis* à proteína Cry1F, baseada na estimativa da CE_{50} foi mais baixa (≈ 3 vezes) quando comparada com a variação obtida com a estimativa das CL_{50} (≈ 15 vezes). Possivelmente este resultado é decorrente do fato de que para a estimativa das CE_{50} e CE_{90} foram pesadas também as lagartas sobreviventes que não ultrapassaram o primeiro instar larval, enquanto que estas foram consideradas mortas pelos critérios de mortalidade para estimativa das CL_{50} .

Tabela 6 - Respostas de inibição de crescimento larval da população de laboratório (D/LAB) e das populações de campo de *D. saccharalis* coletadas nas safras 2010/2011 à proteína Cry1F mediante bioensaios de aplicação superficial

População	N	CE ₅₀ (IC 95%) ¹	CE ₉₀ (IC95%) ¹
D/LAB	882	8,32 (6,31-10,95)	87,35 (57,33-138,01)
D/MT-7	546	5,82 (4,82-7,07)	33,50 (23,27-49,54)
D/GO-2	561	8,29 (5,72-11,95)	78,90 (45,64-150,00)
D/SP-4	758	7,78 (5,80-10,53)	46,10 (23,65-99,01)
D/MG-4	291	4,08 (1,70-9,12)	27,49 (8,51-210,15)
D/PR-7	712	3,22 (1,34-7,83)	53,94 (13,86-492,79)

¹ng cm⁻²

Mediante a análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade no estudo de linha básica de suscetibilidade de populações de *D. saccharalis* das diferentes regiões produtoras de milho no Brasil, determinou-se que a concentração diagnóstica mais adequada para o monitoramento foi de 112 ng de Cry1F/cm² de dieta artificial, correspondente ao limite inferior do intervalo de confiança da CL₉₉, pois indicaria mudanças mais sensíveis na suscetibilidade das populações a serem monitoradas ao longo das safras.

4.2 Monitoramento da suscetibilidade à proteína inseticida Cry1F de populações de *D. saccharalis* coletadas na cultura do milho no Brasil

Foram encontradas diferenças significativas entre as populações de campo monitoradas ($F_{4,85} = 3,13; P = 0,0188$). Porém, observou-se uma baixa porcentagem de sobrevivência das populações, que variou de 0 a 0,3% (Tabela 7). As populações de Douradina/MS e Sabáudia/PR diferiram significativamente das demais populações testadas apresentando maior porcentagem de sobrevivência. As lagartas consideradas sobreviventes haviam atingido o segundo instar, da mesma forma que as lagartas sobreviventes na testemunha, mostrando que para *D. saccharalis*, utilizar outros critérios de resposta como inibição da troca de tegumento ou inibição de crescimento, não são tão interessantes como são para outras espécies, podendo subestimar a suscetibilidade das mesmas (ALI e LUTTRELL, 2009).

Tabela 7 –Sobrevivência de populações de *D. saccharalis* coletadas em diferentes regiões produtoras de milho do Brasil na safra 2011/1012, monitoradas em bioensaios de aplicação superficial da concentração diagnóstica de 112 ng Cry1F/cm² dieta artificial (Tukey $P \leq 0,05$)

Populações	Sobrevivência (%) $\pm$ Erro Padrão
D/SP-8	0,00 $\pm$ 0,00a
D/MT-9	0,00 $\pm$ 0,00a
D/SP-7	0,00 $\pm$ 0,00a
D/MS-3	0,1 $\pm$ 0,09 ab
D/PR-8	0,3 $\pm$ 0,22b

Apesar dos baixos valores estimados, é importante que o monitoramento da suscetibilidade à proteína Cry1F no decorrer das safras de milho seja realizado pois, quando a porcentagem de sobrevivência de lagartas é elevada no monitoramento, pode ser um indicador de que está ocorrendo uma evolução de resistência e que mudanças no manejo das tecnologias precisam ser adotadas.

Na safra 2011/2012, muitas das populações de campo coletadas e recebidas no laboratório para o monitoramento estavam com número de indivíduos pequeno, parasitadas ou com viabilidade baixa. Por este motivo, apenas cinco populações conseguiram ser mantidas por uma ou duas gerações para a realização do monitoramento.

4.3.Avaliação da atividade biológica do milho *Bt* (evento TC1507) em diferentes estádios fenológicos no controle de *D. saccharalis*

Por meio de bioensaios com discos de folha de milho *Bt* cultivado nas épocas de plantio planejadas, foi possível avaliar a sobrevivência da espécie-alvo, comprovando assim a eficiência agrônômica, ou atividade biológica do milho *Bt* (evento TC1507) no controle de *D. saccharalis*. A avaliação foi realizada com lagartas neonatas por meio de bioensaios com discos foliares obtidos das plantas nos estádios fenológicos V3, V6 e V9. Foi observada alta atividade de controle de *D. saccharalis* para os dois híbridos de milho *Bt* nos diferentes estádios fenológicos (Tabela 8).

Na primeira época de plantio, entre o híbrido Pioneer 30F35 *Bt* e sua isolinha convencional observou-se uma diferença significativa já esperada dentro dos estádios V3 ($t=7,63$; g.l.=1,18; $P<0,0001$), V6 ($t=6,34$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$) e V9 ($t=7,46$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$) (Figura 3). Além disso, observou-se que para a linhagem *Bt* deste híbrido, no

estádio fenológico V9 houve mortalidade significativamente menor de *D. saccharalis* em relação aos demais estádios fenológicos ($F_{2,27}=4,85$; $P=0,0158$), porém considerada dentro da normalidade.

Entre o híbrido Dow 2B688 *Bt* e sua isolinha convencional, também houve diferenças significativas esperadas dentro dos estádios V3 ($t=9,38$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$), V6 ($t=5,07$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$) e V9 ($t=7,13$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$) (Figura 4). Entretanto, para a linhagem *Bt* deste híbrido não houve diferença significativa no controle de *D. saccharalis* entre os estádios fenológicos ($F_{2,27}=2,11$; $P=0,1406$).

Figura 3 –Atividade biológica de dois híbridos de milho linhagem *Bt* HX e linhagem convencional CV no controle de *D. saccharalis* em diferentes estádios fenológicos na primeira época de plantio (Teste t $P\leq 0,05$)

A diferença na expressão de proteínas Cry em diferentes tecidos e ao longo dos estádios fenológicos do milho é comum e tem sido observada por outros autores (ABEL e ADAMCZYK, 2004; SIEBERT et al., 2008; SZÉCÁCS et al., 2010; SZÉCÁCS; LAUBER; TAKÁCS, 2010). Foi verificado, por exemplo, que o nível de proteína Cry1F em tecido foliar de plantas do evento TC1507 no estágio fenológico V9 foi de $17,3\pm 3,4$ ngmg^{-1} de matéria seca, enquanto que variou de $28,5\pm 5,4$ ng mg^{-1} no estágio fenológico R1 à $44,8\pm 16,8$ ng mg^{-1} no estágio fenológico R4 (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005).

Na segunda época de plantio entre o híbrido Pioneer 30F35 Bt e sua isolinha convencional observou-se uma esperada diferença significativa dentro dos estádios V3 ($t=6,94$; g.l.=1,18; $P<0,0001$), V6 ($t=4,99$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$) e V9 ($t=6,30$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$) (Figura 4). Além disso, observou-se que para a linhagem Bt deste híbrido, não houve diferença significativa de mortalidade de *D. saccharalis* em relação aos demais estádios fenológicos ($F_{2,27}=1,00$; $P=0,3811$).

Entre o híbrido Dow 2B688 Bt e sua isolinha convencional, também houve diferença significativa dentro dos estádios V3 ($t=6,9$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$), V6 ($t=1,12$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$) e V9 ($t=4,95$; g.l.= 1,18; $P<0,0001$). Entretanto, para a linhagem Bt deste híbrido não houve diferença significativa no controle de *D. saccharalis* entre os estádios fenológicos ($F_{2,27}=0,54$; $P=0,5890$).

Figura 4—Atividade biológica de dois híbridos de milho linhagem Bt HX e linhagem convencional CV no controle de *D. saccharalis* em diferentes estádios fenológicos na segunda época de plantio (Teste $tP\leq 0,05$)

Comparando-se a atividade biológica dos híbridos entre as duas épocas de plantio, verificou-se que não houve diferenças significativas em V3 ($F_{3,36}=1,00$), V6 ($F_{3,36}=0,67$) e V9 ($F_{3,36}=1,94$)(Tabela 8).

Tabela 8 – Percentual de mortalidade de *D. saccharalis* após 5 dias sobre discos foliares de milho do evento TC1507 em diferentes híbridos, estádios fenológicos e épocas de plantio

Tratamento	Estádio Fenológico ¹		
	V3	V6	V9
<i>Primeira Época</i>			
Pioneer 30F35	100±0,00 aA	100±0,00 aA	94,6±2,44 b A
Dow 2B688	100±0,00 aA	100±0,00 aA	94,62±3,63 aA
<i>Segunda Época</i>			
Pioneer 30F35	100±0,00 aA	99,17±0,83 aA	100±0,00 aA
Dow 2B688	99,17±0,83 aA	99,17±0,83 aA	100±0,00 aA

¹Média dos valores ±E.P. ANOVA (Tukey P≤0,05) híbridos entre estádios na linha (letras minúsculas) e entre épocas de plantio nas colunas dentro de cada estágio (letras maiúsculas).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As condições climáticas favoráveis associadas a grande extensão territorial do Brasil, promovem uma agricultura intensa e diversificada, composta por plantios sucessivos durante todo o ano. Com a liberação de uso da tecnologia de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bt*, as possibilidades de exploração agrícola se tornaram ainda mais promissoras, dentre elas o aumento da produção de milho.

A adoção da cultura de milho *Bt* aumentou para 51 milhões de hectares no mundo todo em 2011, um terço da área total de milho plantada. O Brasil tomou a segunda posição de maior área cultivada com 9,1 milhões de hectares de milho *Bt*, ou seja, 1,8 milhões de hectares a mais que o ano anterior (JAMES, 2011). Dentre os benefícios das culturas *Bt* está, o controle eficaz de determinadas pragas e redução do uso de inseticidas convencionais (HUANG et al., 2005; CARRIÈRE et al., 2001). Em alguns casos, a adoção das culturas *Bt* tem sido associada com supressão regional de insetos-praga como *O. nubilalis* e *P. gossypiella* (HUTCHISON et al., 2010; TABASHNIK et al., 2010).

Devido aos benefícios da tecnologia *Bt*, a suscetibilidade de pragas a esta é vista como um bem comum que deve ser preservado e estar presente como mais uma ferramenta do Manejo de Resistência de Insetos (MRI). Porém, pela falta de lei e fiscalização efetiva, ou pela crença na facilidade de lançamento de novas tecnologias, a maioria dos produtores não estão utilizando esta ferramenta corretamente. Percebe-se que não está havendo rotação com outras táticas de controle e que muitos produtores não estão plantando áreas de refúgio. Dessa forma, a situação atual está favorecendo a evolução da resistência dos insetos às proteínas inseticidas expressas e comprometendo a durabilidade da tecnologia no mercado.

Qualquer processo evolutivo ocorre dentro de uma espécie devido à variabilidade genética e pressão de seleção. Este fato é importante para programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), pois revela o sentido de utilizar diferentes táticas de controle de pragas no agroecossistema. Se não houvesse variabilidade genética, não seria preciso rotacionar mecanismos de ação de produtos ou plantar áreas de refúgio, pois não haveria risco de ocorrer evolução de resistência nas populações. Uma vez que a variabilidade existe, é necessário conhecê-la e garantir que as táticas de controle sejam manejadas corretamente a fim de retardar o processo evolutivo de resistência. Consequentemente, é essencial se verificar qual é a variabilidade natural das pragas alvo às tecnologias *Bt*, e que sua suscetibilidade seja monitorada, como já vem sendo feito no Brasil e em outros países.

Além do monitoramento, é interessante que sejam realizados outros estudos que esclareçam a genética da resistência como um todo. Estudos com populações selecionadas resistentes que busquem verificar a herança de resistência através de cruzamentos recíprocos, e que busquem identificar os genes associados à resistência como uma possível forma de detecção e confirmação de resistência são fundamentais para o desenvolvimento da detecção e monitoramento de populações de campo, e também já vem sendo realizados ao redor do mundo.

Os estudos realizados no presente trabalho fornecem bases para o acompanhamento preventivo da suscetibilidade de *D. saccharalis* proteína Cry1F expressa em milho *Bt* e sugerem outros estudos genéticos mais profundos. O plano inicial deste trabalho era também realizar a estimativa da frequência inicial de alelos que conferem resistência a *D. saccharalis*, por meio da técnica de F₂Screen (ANDOW e ALSTAD, 1998). Porém devido à dificuldade de coleta de populações de *D. saccharalis* resultante da alta taxa de adoção da tecnologia *Bt* no Brasil associada à baixa adoção de áreas de refúgio, não foi possível realizar a estimativa da frequência inicial de alelos de resistência.

As plantas *Bt* são agora um elemento no cenário agrícola de muitos países e há contínua expansão em área plantada. Dessa forma, o desafio de resistência a plantas *Bt* sempre existirá enquanto estas forem cultivadas. Para enfrentar este desafio, é imprescindível que estudos básicos de suscetibilidade sejam feitos contribuindo para o MRI, e que associadas a isto, sejam desenvolvidas novas estratégias por parte do governo, interações por um bem comum entre empresas e uma maior exigência por parte dos próprios consumidores, garantindo assim a sustentabilidade não só da tecnologia *Bt*, mas da agricultura mundial como um todo.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- *Diatraea saccharalis* possui alta suscetibilidade à proteína Cry1F expressa em milho *Bt* com uma variação de até 15 vezes baseada na CL_{50} das populações de campo testadas.
- A concentração diagnóstica de 112 ng Cry1F/cm² aplicada superficialmente na dieta artificial foi efetiva para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *D. saccharalis*.
- Os dois híbridos de milho *Bt* (evento TC1507) testados (Pioneer30F35 e Dow 2B688) apresentaram alta atividade de controle sobre *D. saccharalis* em condições laboratoriais.

REFERÊNCIAS

ABEL, C.A.; ADAMCZYK Jr., J.J. Relative Concentration of Cry1A in Maize Leaves and Cotton Bolls with Diverse Chlorophyll Content and Corresponding Larval Development of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) on Maize Whorl Leaf Profiles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, USA, v.97, n 5, p.1737-1744, 2004.

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.18, p.265-266, 1925.

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

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

BAGLA, P. Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. **Science**, (Online), v.327, n.5972 p. 1439, 2010.

BAUM, J.A; JOHNSON, T.B.; CARLTON, B.C. *Bacillus thuringiensis*. Natural and recombinant bioinsecticide products **Methods in Biotechnology**. (Online), v.5, p.189-209, 1999.

BERLINER, E. Über die schlaffsucht der mehlmottenraupe (*Ephestiakiühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n.sp., **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Hamburg, v.2, p.29-56, 1915.

BLANCO, C. A.; STORER, N. P.; ABEL, C. A.; JACKSON, R.; LEONARD, R.; LOPEZ, JR J. D.; PAYNE, G.; SIEGFRIED, B. D.; SPENCER, T.; TERÁN-VARGAS, A. P. Baseline Susceptibility of Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F Toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, USA, v.101, n.1, p.168-173, 2008.

BOBROWSKI, V.L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; FIUZA, L.M. Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from South of Brazil and activity

against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.2, p.105-109, 2001.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; LARA, F. M. Resistência de genótipos de sorgo ao ataque de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.245-252, 1993.

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

BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, Binghamton, v.5, p.209-222, 2003.

CAMERON, S.L.; WHITING, M.F. The complete mitochondrial genome of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, (Insecta; Lepidoptera: Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths. **Gene**, (Online), v.408, p.112-123, 2008.

CAMERON, S.L.; JOHNSON, K.P.; WHITING, M.F. The Mitochondrial genome of the screamer *Louse bothriometopus* (Phthiraptera: Ischnocera): effects of extensive gene rearrangement on the evolution of the genome. **Journal of Molecular Evolution**, (Online), v.65, p.589-604, 2007.

CAPINERA, J.L. North American Vegetable Pests: The pattern of invasion. **American Entomologist**, Philadelphia, v.48, n.1, p.20-39, 2002.

CAPRIO, M.A. Source-sink dynamics between transgenic and nontransgenic habitats and their role in the evolution of resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.3, p.698-705, 2001.

CAPRIO, M. A; SUMERFORD, D. V.; SIMS, S. R. Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. In: LACEY, L. A; KAYA, H. K. (Ed.). **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, Springer, 2000, p.805-828.

CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; PEDERSEN, B.; HALLER, S.; ELLERS-KIRK, C.; ANTILLA, L.; LIU, E. W.; TABASHNIK, B.E. Large-scale management of insect resistance to transgenic cotton in Arizona: can transgenic insecticidal crops be sustained? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.2 p.315-25, 2001.

CASTRO, B.A.; RILEY, T.J.; LEONARD, B.R.; BALDWIN, J. Borers galore: emerging pests in Louisiana corn, grain sorghum and rice. **Louisiana Department of Agriculture**, Louisiana, v.47, p.4–6, 2004.

CHA, S.Y.; YOON, H.J.; LEE, E.M.; YOON, M.H.; HWANG, J.S.; JIN, B.R.; HAN, Y.S.; KIM, I. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). **Gene**, (Online), 392, 206–220, 2007.

COATES, B. S.; SUMERFORD, D. V.; LOPEZ, M. V.; WANG, H.; FRASER, L. M.; KROEMER, J. A.; SPENCER, T.; KIM, K. S.; ABEL, C. A.; HELLMICH, R. L.; SIEGFRIED, B. D. A single major QTL controls expression of larval Cry1F resistance trait in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) and is independent of midgut receptor genes. **Genetics**, (Online), v.139, p.961–972, 2011.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. 2012. "**Bacillus thuringiensis** toxin nomenclature". Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em 28 nov, 2012.

CRUZ, I. A Broca da Cana-de-Açúcar, *Diatraea saccharalis*, em Milho, no Brasil. Local: EMBRAPA/CNPMS, 2007. 12p. (Circular Técnica, 90)

CTNBio, Resumo Geral de Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1736.pdf. Acesso em 19 fev, 2013. 2p.

DHURUA, S.; GUJAR, G.T. Field-envolved resistance to Bt toxin Cry1ac in the pink bollworm, *Pectynophoragossypiella*(Saunders) (Lepidoptera: Gelichiidae) from India. **Pest Management Science**, Hoboken, v.67, p.898-905, 2011.

DOWNES, S.; MAHON, R.J.; ROSSITER, L.; KAUTER, G.; LEVEN, T.; FITT, G.; BAKER, G. Adaptive management of pest resistance by *Helicoverpa* species (Noctuidae) in Australia to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II (R) cotton. **Evolutionary Applications**, (Online),v.3, p.574–584, 2010.

DOWNES, S.; PARKER, T.; MAHON, R. Incipient resistance of *Helicoverpapunctigerato* the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II (R) cotton. **PLoS ONE**, (Online), v.5, n.9, p.12567. doi:10.1371, 2010.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; WARREN, G. W.; DUCK, N. B.; KOZIEL, M. G. The expression of synthetic CryIA(b) gene in transgenic maize confers resistance to European corn borer,. In:MIHM, J. A. (Ed.).**Insect Resistant Maize: Recent advances and utilization**.Simpósioconduzido no“International Maize and Wheat Improvement Center” (CIMMYT), 27/11 à 3/12/1994. México, D.F.: CIMMYT, 1997.p.172-174.

FALCO, M.C.; MARBACH, P.A.S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**,Ribeirão Preto, v.24, p.113–122, 2001.

FARINÓS, G. P.; DE LA POZA, M.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P.Susceptibility to the Cry1F Toxin of Field Populations of *Sesamianonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) in Mediterranean MaizeCultivation Regions. **JournalofEconomicEntomology**, Lanham, v. 105, n. 1,p.214-221, 2012.

FERREIRA, E.; BARRIGOSSI, J. A. F.; CASTRO, E.M.; SANTOS, A. B. Perdas de produção pela broca-do-colmo (*Diatraeasaccharalis*Fabr. 1794) (lepidóptera: Pyralidae) em genótipos de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v.34, n.2, p.99-103, 2004.

- FIGUEIREDO, M. L.C.; CRUZ, I.; SILVA, R.B. Aspectos Bioecológicos de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) em Plantas de Milho (*Zea mays* L.). CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Anais. Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. p. 230-235.
- FISCHHOFF, D.A. Insect tolerant transgenic tomato plants, **Biotechnology**, London, v.5, p.807-813, 1987.
- FLOYD, E. H. Survival of the sugarcane borer overwintering in cornstalks in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 59, p. 825-827, 1966.
- FRENCH-CONSTANT, R.H.; ROUSH, R.T. Resistance detection and documentation: the relative role of pesticidal and biochemical assays, In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.), **Pesticide resistance in arthropods**, New York, Chapman Hall, 1990. p. 4-37.
- GAHAN, L.J.; GOULD, F.; LÓPEZ, J. D. Jr.; MICINSKI, S.; HECKEL, D. G. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, p.187-194, 2007.
- GASSER, C. S.; FRALEY, R.T. Genetically engineering plants for crop improvement. **Science**, (Online), v.244, p.1293-1299, 1989.
- GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; KEWESHAN, R.S.; DUNBAR, M.W. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. **PLoS ONE**, (Online), v.6, n 7, p.22629. doi:10.1371/journal.pone.0022629, 2011.
- GASPERS, C.; SIEGFRIED, B. D.; SPENCER, T.; ALVES, A. P.; STORER, N. P.; SCHUPHAN, I.; EBER, S. Susceptibility of European and North American populations of the European corn borer to the Cry1F insecticidal protein. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.135, p.7-16, 2011.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Factors influencing the evolution of resistance, In: COUNCIL, N.R. (Ed.). **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. National Academy Press, Washington, D.C., 1986. P. 157-169.

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

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

GOULD, F.; RAMIREZ, A. M.; ANDERSON, A.; FERRE, J.; SILVA, F.J.; MOAR, W.J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.89, p.7986–7990, 1992.

HAYWARD, K.J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.22, n.11, p.69-74, 1943.

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

HONG, G.Y.; JIANG, S.T.; YU, M.; YANG, Y.; LI, F.; XUE, F.S.; WEI, Z.J. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the cabbage butterfly, *Artogeia melete* (Lepidoptera: Pieridae). **Acta Biochim Biophys Sin**, Shanghai, v.41, p.446–455, 2009.

HUANG, F.; LEONARD, B.R.; GABLE, R.H. Comparative susceptibility of European corn borer, southwestern corn borer, and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1ab protein in a commercial Bt-corn hybrid. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.99, p.194–202, 2006.

HUANG, F.; LEONARD, B.R.; ANDOW, D.A. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, p.164–171, 2007.

HUANG, J.; RUIFA, H; ROZELLE, P.; PRAY, C. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China. **Science**, (Online), v.308, p.688-90, 2005.

HUANG, F.; GHIMIRE, M.N.; LEONARD, B.R.; ZHU, Y.; HEAD, G.P. Susceptibility of field populations of sugarcane borer from non-Bt and Bt maize plants to five individual Cry toxins. **Insect Science**, Tucson, v.19, p.570-578, 2012.

HUANG, F.; GHIMIRE, M.N.; LEONARD, B. R.; WANG, J.; DAVES, C.; LEVY, R.; COOK, D.; HEAD, G.P.; YANG, Y.; TEMPLE, J.; FERGUSON, R. F₂ screening for resistance to pyramided *Bacillus thuringiensis* maize in Louisiana and Mississippi populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science**, Hoboken, v.67, p.1269–1276, 2011.

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

ISHIWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease), Dainihon Sanshi Kaiho, Japan, v.114, p.1-5, 1901.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, Ithaca, New York: ISAAA, 2011. (ISAAA Brief n. 43).

KAUR, S. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. England, v.16, p.781-793, 2000.

KIM, I.; LEE, E.M.; SEOL, E.R.; YUN, E.Y.; LEE, Y.B. The mitochondrial genome of the Korean hairstreak, *Coreanaraphaelis* (Lepidoptera: Lycaenidae). **Insect Molecular Biology**, U.K., v.15, p.217–225, 2006.

KRUGER, M.; VAN RENSBURG, J.B.J.; VAN DEN BERG, J. Perspective on the development of stem borer resistance to *Bt* maize and refuge compliance at the Vaalharts irrigation scheme in South Africa. **Crop Protection**, (Online), v. 28, p.684- 689, 2009.

LEORA SOFTWARE. POLO-PC: a user's guide to Probit or logit analysis. Berkeley, 1987. 20p.

LI, J.; CARROL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, (Online), v.353, p.815-821, 1991.

LI, W.; ZHANG, X.; FAN, Z. YUE, B.; HUANG, F.; KING, E.; RAN, J. Structural Characteristics and Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **DNA and Cell Biology**, (Online), v. 30, n.1, p. 3-8, 2011.

LIU, Y.B.; TABASHNIK, B.E.; DENNEHY, T.J.; PATIN, A.L.; SIMS, M.A.; MEYER, S.K.; CARRIERE, Y. Effects of *Bt* cotton and Cry1Ac toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, p.1237–1242, 2001.

LONG, W. H.; HENSLEY, S. D. Insect pests of sugar cane. **Annual Review of Entomology**, v.17, Stanford, n.1, p.149 -176, 1972.

MACEDO, N.; MACEDO, D. Manejo da broca protege produtividade. **Correio Agrícola**, São Paulo, n.1, p.26-27, 2007.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPERI, N.; ALMEIDA, L.C.; ARAÚJO, J.R.; MAGRINI, E.A. **Controle biológico da broca da cana-de-açúcar: manual de instrução**. Piracicaba: IAA, Planalsucar, 1983. 22p.

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

MARQUES, M.O.; MUTTON, M.A.; AZANIA, A.A.P.M.; JUNIOR, L.C.T.; NOGUEIRA, G.A.; VALE, D.W. **Tópicos em tecnologia sucroalcooleira**. Jaboticabal: Multipress, cap. 7, p. 101-120, 2006.

MÉLO, A.B.P.; PARRA, J.R.P. Exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de broca da cana-de-açúcar em quatro localidades canavieiras de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.23, n.7, p.691-695, 1988.

MENDONÇA, A.F. **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia, 1996. 200p.

MONTEIRO, A.O.; FERREIRA, E.S. Projeto rotação de culturas - principais resultados obtidos. In: Seminário de Tecnologia Agronômica, 3., 1986. Piracicaba, **Annais..** São Paulo: Copersucar, 1986. p.87-200.

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

ONSTAD, D.W.; GOULD, F. Modeling the dynamics of adaptation to transgenic maize by European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.91, p.585-593, 1998.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 137p.

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

PECK, S.; GOULD, F.; ELLNER, S. Spread of resistance in spatially extended regions of transgenic cotton: implications for management of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.92, p.1–16, 1999.

PEREIRA, E.J.G; STORER, N.P.; SIEGFRIED, B.D. Inheritance of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. **Bulletin of Entomological Research**, London, v.98, p.621–629, 2008.

PEREIRA, E. J.G.; SIQUEIRA, H. A. A.; ZHUANG, M.; STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.103, p.1–7, 2010.

PEREIRA, E. J. G.; STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. Fitness costs of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.135, p.17–24, 2011.

PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; PETERSEN, L.J.; PARKER, J.B.; McPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles, **Plant Molecular Biology**, (Online), v.22, p.313–321, 1993.

PLAPP, Jr. F.W.; CAMPANHOLA, C.; BAGWELL, R.D.; McCUTCHEON, B.F. Management of pyrethroid-resistant tobacco budworms on cotton in the United States. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Eds.), **Pesticide resistance in arthropods**. Chapman Hall New York, p. 237–261, 1990.

QUINTANA-MUÑIZ, V.; WALKER, D. W. Oviposition preference by gravid sugarcane borer moths in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 63, p.987–988, 1970.

REAGAN, T.E. Integrated pest management in sugarcane. **Louisiana Department of Agriculture**, Louisiana, v.44, n.4, p.16–18, 2001.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 127p.

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

ROUSH, R.T., McKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.32, p.361–380, 1987.

SAS INSTITUTE. SAS user's guide statistics. Cary, 2010.

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

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.78, p.2893-2897, 1981.

SCHNEPF, H.E.; WONG, H.C.; WHITELEY, H.R. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.25, n.260, p.6264-6272, 1985.

SIEBERT, M.W.; TINDALL, K.V.; LEONARD, B.R.; VAN DUYN, J.W.; BABCOCK, J. M. Evaluation of corn hybrids expressing Cry1F (Herculex I Insect Protection) against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the southern United States. **Journal of Entomological Science**, Kyoto, v.43, p.41-51, 2008.

SIEGEL, J. P., Bacteria. In: LACEY, L. L.; KAYA, H. K. (Eds.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Scientific, Publishers, 2000. p. 209-230.

SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.P.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.L. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M(Ed). **Molecular genetics and evolution pesticides resistance**. Washington: American Chemical Society, 1996, p.229-242. (Symposium Series, 645).

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

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: *Spodopterafrugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 103, 1031-1038, 2010.

SZÉKÁCS, A.; LAUBER, E.; TAKÁCS, E. Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, (Online), v. 396, p. 2203-2211, 2010.

SZÉKÁCS, A.; LAUBER, E.; JURACSEK, J.; DARVAS, B. Cry1Ab toxin production of MON 810 transgenic maize. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 182–190, 2010.

TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.39, p. 47–94, 1994.

TABASHNIK, B.E.; CROFT, B.A. Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes: interactions between biological and operational factors. **Environmental Entomology**, Lanham, v.11, p.1137–1144, 1982.

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

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, (Online), v.26, p.199–202, 2008.

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y-B; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D.G. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 94, p.1640–1644, 1997.

TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; MORIN, S.; SISTERSON, M.S.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M.; ZHAO, J.K.. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.96, p.1031–1038, 2003.

TABASHNIK, B. E.; FABRICK, J.A.; HENDERSON, S.; BIGGS, R.W.; YAFUSO, C.M.; NYBOER, M.E.; MANHARDT, N.M.; COUGHLIN, L.A.; SOLLOME, J.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; MORIN, S. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p.1525-1530, 2006.

TABASHNIK, B. E.; SISTERSON, M. S.; ELLSWORTH, P. C.; DENNEHY, T. J.; ANTILLA, L.; LIESNER, L.; WHITLOW, M.; STATEN, R. T.; FABRICK, J. A.; UNNITHAN, G. C.; YELICH, A. J.; ELLERS-KIRK, C.; HARPOLD, V. S.; LI, X.; CARRIÈRE, Y. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. **Nature Biotechnology**, (Online), v.28, p.1304-7, 2010.

TAN, S.Y.; CAYABYAB, B.F.; ALCANTARA, E.P.; IBRAHIM, Y.B.; HUANG, F.; BLANKENSHIP, E.E.; SIEGFRIED, B.D. Comparative susceptibility of *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. **Crop Protection**, (Online), v.30, p.1184-1189, 2011.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY . Biopesticide Registration Action Document *Bacillus thuringiensis* Cry1F Corn, Office of Pesticide Programs. 2005.56 p.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H. Protein engineering in plants: expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein genes. In: J. SCHELL, J.; VASIL, I. K.(Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, London:Academic Press, 1989, v. 6, p.425-439.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; BEUCKELEER, M. DE; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M. V.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, London, v.327, p.33-37, 1987.

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

WU, X.; LEONARD, R.B.;ZHU, Y. C.; CRAIG, A.A.; HEAD, G. P.; HUANG, F. Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis*toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.100, p.29–34, 2009.

XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpaarmigera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.948–954, 2005.

XU, Z.; LIU, F.; CHEN, J.; HUANG, F.;ANDOW, D.A.; SHEN, J.; ZHU, Y.C. Using an F2 screen to monitor resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpaarmigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Hoboken, v.65, p.391–397, 2009.

YANG, Y.; CHEN, H.;WU, Y.; YANG, Y.; WU, S. Mutatedcadherin alleles from a field population of *Helicoverpaarmigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxinCry1Ac. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p.6939-6944, 2007.

YANG, Y. H., YANG, Y. J.; GAO, W. Y.; GUO, J. J.; WU, Y. H.; WU, Y. D.Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible*Helicoverpaarmigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. **Bulletin of Entomological Research**, London, v.99, p.175–181, 2009.

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

ZAKHARYAN, R. A. Plasmid DNA from *Bacillus thuringiensis*. **Microbiologiya**, Russia, v.48, p.226-229, 1979.

ZHAO, J.-Z.; CAO, J.; COLLINS, H.L.; BATES, S.L.; ROUSH, R.T.; EARLE, E.D.; SHELTON, A.M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.102, p.8426-8430, 2005.