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

**Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)
a eventos “piramidados” de milho que expressam proteínas inseticidas de
Bacillus thuringiensis Berliner**

Daniel Bernardi

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

**Piracicaba
2015**

Daniel Bernardi
Engenheiro Agrônomo

**Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a eventos
“piramidados” de milho que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*
Berliner**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

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

Bernardi, Daniel

Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a eventos "piramidados" de milho que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner / Daniel Bernardi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
120 p. : il.

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

1. Lagarta-do-cartucho 2. Milho Bt 3. Evento piramidado 4. Manejo da Resistência de Insetos I. Título

CDD 633.15
B523r

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

A Deus, pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

AGRADEÇO

*Aos meus pais Delvino Bernardi e Zeli Maschio Bernardi, ao meu irmão Oderlei Bernardi e a
minha noiva Vanessa Nogueira Soares pelo afeto, incentivo e apoio em minha formação
pessoal e profissional.*

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À empresa Monsanto do Brasil Ltda. pelo apoio logístico para realização deste estudo.

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

À Dra. Eloisa Salmeron pela ajuda em todas as etapas do trabalho, amizade, dedicação ao trabalho e preocupação para o bom funcionamento do laboratório.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), em especial, Oderlei Bernardi, Renato Jun Horikoshi e Daniela Miyuki Okuma pelo convívio, companheirismo e ajuda na condução dos trabalhos.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP): Antônio Rogério do Nascimento Bezerra, Rogério Machado, Natália Alves Leite, Mariana Regina Durigan, Dayana Rosalina de Souza, Douglas Amado, Felipe Antônio Domingues, Osmar Arias, Patrick Marques Dourado, Rodrigo José Sorgatto, Juliano Ricardo Farias, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva, Alex Sandro Poltronieri, Everaldo Batista Alves, José Bruno Malaquias, Rebeca da Silva Ribeiro, Dariane Sagasetta de Oliveira

Souza, Pablo Fresia Coronel e Danielle Thomazoni pelo convívio, companheirismo e auxílios prestados.

À técnica do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Gislaine Aparecida Amâncio de Oliveira Campos pelo convívio agradável e auxílios prestados.

Aos estagiários que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP): Aline Pereira da Silva, Renan Souza, Rodrigo Andrade Franciscatti, Fernando Amaral, Leonardo Miraldo, Alexandre Colli, Mariana Vicente, Guilherme Andrade Picarelli, Guilherme Giordano Paranhos, Luiz Victor Perazolo, Marcelo Mocheti, Luis Gustavo Bergamasco de Aguiar, Vitória Grisotto, Ricardo Ferraz Silveira, Amanda Lemes e Karen Komada pelo convívio e companheirismo no laboratório.

Aos amigos com quem morei em Piracicaba: Oderlei Bernardi, Márcio Blanco das Neves, Mário Borges Trzeciak, Juliano Ricardo Farias, Diogo Feliciano de Araujo e Douglas Amado pelo convívio agradável, apoio em todos os momentos, companheirismo e incentivo.

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

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

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

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências	19
2 SUSCETIBILIDADE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A PROTEÍNAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner EXPRESSAS EM MILHO YIELDGARD VT PRO™ E POWERCORE™.....	25
Resumo	25
Abstract.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Material e métodos	28
2.2.1 Populações de Insetos.....	28
2.2.2 Criação e manutenção de populações de <i>S. frugiperda</i>	31
2.2.3 Atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	32
2.2.3.1 Bioensaios com discos de folha, estilo-estigmas e grãos	32
2.2.3.2 Biologia de <i>S. frugiperda</i> em estilo-estigmas e grãos de milho Bt e não-Bt.....	34
2.2.4 Monitoramento da suscetibilidade de populações de <i>S. frugiperda</i> a Cry1A.105 e Cry2Ab2	35
2.2.4.1 Bioensaios com concentrações diagnósticas de Cry1A.105 e Cry2Ab2.....	35
2.3 Resultados.....	36
2.3.1 Bioensaios com discos de folha, estilo-estigmas e grãos	36
2.3.2 Biologia de <i>S. frugiperda</i> em estilo-estigmas e grãos de milho Bt e não Bt.....	37
2.3.3 Monitoramento da suscetibilidade de <i>S. frugiperda</i> a Cry1A.105 e Cry2Ab2.....	40
2.4 Discussão	48
2.5 Conclusões.....	50
Referências	51
ANEXOS	55
3 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ÀS TECNOLOGIAS DE MILHO YIELDGARD VT PRO™ E POWERCORE™	59
Resumo	59
Abstract.....	59

3.1 Introdução	60
3.2 Material e Métodos	62
3.2.1 Frequência fenotípica de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	62
3.2.1.1 Populações de insetos.....	62
3.2.1.2 Estabelecimento das isolinhas.....	63
3.2.1.3 Bioensaio com folhas de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	64
3.2.2 Seleção e manutenção das linhagens resistentes de <i>S. frugiperda</i> em laboratório	65
3.2.3 Padrão da herança da resistência de <i>S. frugiperda</i> a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F	65
3.2.3.1 Dominância da resistência	67
3.2.3.2 Número de genes associados à resistência de <i>S. frugiperda</i> a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F	67
3.2.4 Caracterização da resistência às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	68
3.2.5 Biologia de linhagens resistentes de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	68
3.3 Resultados	70
3.3.1 Frequência fenotípica da resistência de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	70
3.3.2 Herança da resistência de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™.....	73
3.3.3 Dominância da resistência	76
3.3.4 Número de genes associados à resistência de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	78
3.3.5 Sobrevivência de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™	82
3.3.6 Parâmetros biológicos das linhagens resistentes de <i>S. frugiperda</i> a eventos de milho Bt e não-Bt.....	83
3.4 Discussão	87
3.5 Conclusões	91
Referências	91

4 CUSTO ADAPTATIVO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ÀS TECNOLOGIAS DE MILHO YIELDGARD VT PRO™ E POWERCORE™	97
Resumo	97
Abstract.....	97
4.1 Introdução	98
4.2 Material e métodos	100
4.2.1 Linhagens de <i>S. frugiperda</i>	100
4.2.2 Custo adaptativo associado à resistência de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™.....	100
4.2.3 Sobrevivência larval de linhagens heterozigóticas de <i>S. frugiperda</i> em simulação de alimentação larval em milho não-Bt e Bt	101
4.2.4 Análise estatística	102
4.3 Resultados.....	103
4.3.1 Custo adaptativo associado à resistência de <i>S. frugiperda</i> às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™.....	103
4.3.2 Sobrevivência larval de linhagens heterozigóticas de <i>S. frugiperda</i> em simulação de alimentação larval em não-Bt e Bt	109
4.4 Discussão	112
4.5 Conclusões.....	115
Referências	115
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	119

RESUMO

Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a eventos “piramidados” de milho que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner

A estratégia de pirâmide de genes tem sido explorada para retardar a evolução da resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). No Brasil, às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ (VT PRO) e PowerCore™ (PW) que expressam as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F, respectivamente, foram liberadas para uso comercial em 2009. Para subsidiar programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) foram conduzidos trabalhos para avaliar o risco de evolução da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) ao milho VT PRO e PW. Inicialmente foram realizados estudos para avaliar a atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta de milho VT PRO e PW sobre *S. frugiperda* e monitorar a suscetibilidade a Cry1A.105 e Cry2Ab2 em populações da praga coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil durante as safras de 2011 a 2014. Houve 100% de mortalidade de neonatas de *S. frugiperda* quando expostas ao tecido foliar de milho VT PRO e PW. No entanto, em estilo-stigmas e grãos, a mortalidade foi inferior a 50 e 6% respectivamente. Variabilidade geográfica na suscetibilidade de populações *S. frugiperda* a Cry1A.105 e Cry2Ab2 foi detectada, com reduções significativas na suscetibilidade a essas proteínas para algumas populações de 2011 a 2014. A técnica de “F₂ screen” foi utilizada para a caracterização da resistência de *S. frugiperda* ao milho VT PRO e PW a partir de populações coletadas na safra de 2012. Verificou-se uma alta variabilidade na frequência fenotípica de isofamílias resistentes ao milho VT PRO e PW, sendo que as maiores frequências foram observadas em populações coletadas na região Central do Brasil. Com a técnica de “F₂ screen” foi possível selecionar linhagens resistentes ao milho VT PRO e PW, denominadas de RR-2 e RR-3 respectivamente. Tanto a linhagem RR-2 quanto a RR-3 que foram criadas por 18 gerações consecutivas nos respectivos eventos de milho Bt apresentaram razões de resistência superiores a 3300, 2700 e ≈ 10 vezes a Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2, respectivamente. Cruzamentos recíprocos das linhagens RR-2 e RR-3 com uma linhagem suscetível de referência revelaram que o padrão da herança da resistência é autossômica recessiva. A recessividade genética da resistência também foi confirmada pela mortalidade completa de indivíduos heterozigotos (descendentes provenientes de cruzamentos entre as linhagens RR-2 ou RR-3 com a linhagem suscetível) em tecidos de milho VT PRO e PW, demonstrando que esses eventos atendem ao conceito de alta dose para o MRI. Em retrocruzamentos da progênie F₁ dos cruzamentos recíprocos com as linhagens resistentes confirmou-se a hipótese de que a resistência é poligênica. A presença de custo adaptativo associado à resistência foi verificada para as linhagens RR-2 e RR-3, porém ausente para os indivíduos heterozigotos, baseado nos parâmetros biológicos avaliados. Neste estudo fornecemos a primeira evidência do potencial de evolução da resistência de *S. frugiperda* a eventos de milho Bt piramidados e informações para o refinamento das estratégias de MRI para preservar a vida útil das tecnologias de milho Bt para o controle de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Milho Bt; Evento piramidado; Manejo da Resistência de Insetos

ABSTRACT

***Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to “pyramided” corn events expressing insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner**

The strategy of pyramid of genes has been exploited to delay the evolution of insect resistance to genetically modified crops expressing insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). In Brazil, YieldGard VT Pro™ (VT PRO) and PowerCore™ (PW) corn technologies expressing Cry1A.105/Cry2Ab2 and Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F proteins respectively were released for commercial use in 2009. Resistance risk assessment were conducted to support an Insect Resistance Management (IRM) program of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to VT PRO and PW corn. Initially, studies were conducted to evaluate the biological activity of Bt proteins expressed in different plant structures of VT PRO and PW corn on *S. frugiperda* and to monitor the susceptibility to Cry1A.105 and Cry2Ab2 in pest populations collected from different geographical regions in Brazil from 2011 to 2014 growing seasons. The mortality of neonate larvae of *S. frugiperda* was 100% when fed on leaf tissue of VT PRO and PW corn. However, the larval mortality when fed on silks and grains was less than 50 and 6% respectively. A geographical variation in the susceptibility of *S. frugiperda* to Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins was detected among populations, with significant reduction in susceptibility to these proteins in some populations from 2011 to 2014. The F₂ screen technique was used to characterize the resistance of *S. frugiperda* to VT PRO and PW corn from populations sampled in 2012 growing season. High variability in the frequency of resistant phenotypic isofamilies to VT PRO and PW corn was obtained with higher frequencies in *S. frugiperda* populations from Midwestern region of Brazil. Resistant populations to VT PRO and PW corn were selected by using F₂ screen which were designated as RR-2 and RR-3 strains respectively. Both RR-2 and RR-3 strains reared on respective Bt maize events for 18 consecutive generations showed resistance ratios greater than 3,300; 2,700 and $\approx$ 10-fold to Cry1A.105, Cry1F and Cry2Ab2 respectively. Reciprocal crosses of RR-2 and RR-3 strains with a susceptible reference strain revealed that the inheritance of resistance is autosomal recessive. The genetic recessiveness of the resistance was also confirmed by the complete mortality of heterozygous individuals (offspring from the crosses between RR-2 or RR-3 strains with susceptible strain) on VT PRO and PW corn leaf tissues, indicating that these events meet the concept of high-dose for IRM strategies. Backcrosses of F₁ progenies with both resistant strains revealed that resistance is polygenic. Fitness costs associated with resistance were found in RR-2 e RR-3 strains but not in heterozygous individuals, based on life history traits. In this study, we reported the first evidence of the potential of *S. frugiperda* to evolve resistance to pyramided Bt corn events, as well as provide valuable information to support the current IRM strategies to preserve the useful life of Bt corn technologies for *S. frugiperda* control in Brazil.

Keywords: Fall armyworm; Bt corn; Pyramid event; Insect Resistance Management

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na biotecnologia possibilitaram a obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, conhecidas como plantas Bt (SOBERÓN; GILL; BRAVO, 2009; JAMES, 2013). As proteínas de Bt são expressas continuamente nos tecidos das plantas apresentando elevada especificidade sobre algumas pragas (SOBERÓN; GILL; BRAVO, 2009). A utilização de plantas Bt tem sido crescente na agricultura mundial desde 1996 (JAMES, 2011). Entretanto, no Brasil, somente em 2005, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a liberação comercial da primeira planta Bt para o controle de insetos, o algodão *Gossypium hirsutum* L. que expressa a proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* (Bollgard™). A primeira geração de milho Bt foi composta por plantas que expressam uma única proteína de Bt nos tecidos das plantas (CTNBio, 2007, 2008). Contudo, a partir de 2009, houve a liberação para cultivo comercial da segunda geração de plantas Bt que expressam mais de uma proteína e consideradas “piramidadas”, como às tecnologias de milho MON 89034 YieldGard VT PRO™ (Cry1A.105/Cry2Ab2), MON 89034 x TC 1507 PowerCore™ (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F); MIR 162 + Bt 11 (Cry1Ab/Vip3Aa20), TC1507 + MON 810 (Cry1F/Cry1Ab) (CTNBIO, 2009; CTNBIO, 2010).

Uma das pragas-alvo do milho Bt é a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Esta espécie é nativa das Américas com ocorrência predominante desde Uruguai e norte da Argentina até os Estados de Flórida e Texas, no sul dos Estados Unidos (SPARKS, 1979; ASHLEY et al., 1989; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Esta espécie é considerada um dos principais insetos-praga da cultura do milho no Brasil (CRUZ, 1995; POGUE, 2002; BARROS et al., 2010). Sua importância deve-se à elevada polifagia e capacidade de completar mais de oito gerações por ano em alguns sistemas de produção de cultivos do Brasil (POGUE, 2002; FITT, 2006), ocasionando danos de 20 a 100% quando medidas de controle não são adotadas (CRUZ, 1995; POGUE, 2002).

A vantagem da pirâmide de genes está na provável evolução da resistência de forma mais lenta em comparação com plantas que expressam uma única proteína inseticida (FERRÉ; VAN RIE, 2002; HUANG et al., 2011). Essa estratégia de manejo da resistência é baseada no conceito que a resistência para duas proteínas é conferida independentemente por diferentes genes (McGAUCHEY; WHALON, 1992; TABASHNIK, 1994). A piramidação de genes dentro de medidas de manejo de resistência pode ser classificada como estratégia de ataque múltiplo, no entanto, exige que os produtos apresentem modos de ação distintos e

ausência de resistência cruzada (GOULD, 1998; ROUSH, 1998; TABASHNIK et al., 2009; CARRIÈRE; CROWDER; TABASHNIK, 2010).

A premissa básica da piramidação de genes é que as proteínas inseticidas, isoladamente, ocasionem elevada mortalidade da praga-alvo, ou seja, que os insetos resistentes a uma proteína inseticida sejam controlados pela outra proteína e vice-versa, possibilitando assim o “controle redundante” (GOULD, 1986; McGAUCHEY; WHALON, 1992; ROUSH, 1998; ONSTAD; MEINKE, 2010; IVES et al., 2011; BRÉVAULT et al., 2013). Contudo há casos em que as plantas expressam mais de uma proteína, porém não atendem o conceito de evento piramidado (ROUSH, 1998; BRÉVAULT et al., 2013). Este fato ocorre quando as proteínas inseticidas presentes na planta Bt piramidada apresentam resistência cruzada com outra proteína de Bt e/ou a expressão de uma das proteínas não é suficiente para o controle de insetos resistentes a uma determinada proteína (GOULD, 1998; TABASHNIK; RENSBURG; CARRIÈRE, 2009; CARRIÈRE; CROWDER; TABASHNIK, 2010). Esse fato foi observado para as proteínas Cry1A e Cry2A expressas em algodão Bt para *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) (BRÉVAULT et al., 2013).

Um dos principais desafios do Manejo da Resistência de Insetos (MRI) é a sustentabilidade das tecnologias Bt devido à expressão contínua da(s) proteína(s) Bt nos tecidos da planta o que tem acarretado elevada pressão de seleção sobre as pragas-alvo, favorecendo a evolução da resistência (MCGAUGHEY; WHALON, 1992; ANDOW, 2008), a qual já foi reportada a campo para várias espécies de inseto (VAN RENSBURG, 2007; DHURUA; GUJAR, 2011; GASSMANN et al., 2011) e para *S. frugiperda* à proteína Cry1F em Porto Rico e no Brasil (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014a). Este fato, associado com o cultivo intensivo de plantas Bt com a expressão em baixa dose da proteína inseticida (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014a), baixa adoção de áreas de refúgio (GOULD, 1994) e com proteínas que compartilham o mesmo modo de ação (VÉLEZ et al., 2013a; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014), expõe a *S. frugiperda* à constante pressão de seleção durante todo o ano no Brasil, contribuindo para a evolução da resistência a campo.

Outro fator que pode contribuir para a evolução da resistência é a variação dos níveis de proteína durante o desenvolvimento e nas diferentes estruturas da planta (folha, estilo-estigma e grão) o que pode afetar a exposição das pragas-alvo e alterar a resposta biológica dos insetos permitindo a sobrevivência diferencial de alguns insetos e, consequentemente,

favorecer a evolução da resistência, uma vez que os indivíduos heterozigotos poderiam estar sobrevivendo nesta situação (EPA, 2010; HUANG et al., 2011).

A piramidação de genes, juntamente, com a expressão da alta dose das proteínas inseticidas associada com a presença de áreas de refúgio (plantas não-Bt) é a principal estratégia para evitar ou retardar a evolução da resistência (GOULD, 1994; ROUSH, 1994; GOULD, 1998; BRAVO; SOBERÓN, 2008; HUANG et al., 2011). Plantas Bt de alta dose são caracterizadas por causar a recessividade funcional da resistência, acarretando em uma baixa sobrevivência de insetos heterozigotos (RS), os quais, no início do processo de evolução da resistência são os principais carregadores dos alelos da resistência (MCGAUGHEY; WHALON, 1992; GOULD, 1998; SHELTON et al., 2000; TABASHNIK; GOULD; CARRIÈRE, 2004). Por sua vez, o refúgio compreende a área onde a praga não é exposta à pressão de seleção com proteína inseticida, na qual pode sobreviver reproduzir e acasalar-se com os indivíduos sobreviventes de áreas com plantas Bt. Uma forma direta de se avaliar se uma planta Bt é um evento de alta dose é obter os insetos-alvo resistentes à proteína inseticida, os quais poderiam ser cruzados com os insetos homozigotos suscetíveis para obtenção dos heterozigotos que poderiam ser testados diretamente sobre a planta Bt. Nessa situação se a sobrevivência dos heterozigotos for < 5% o evento atende ao conceito de alta dose (GOULD, 1998; GHIMIRE et al., 2011).

No início da evolução da resistência a frequência de indivíduos fenotipicamente resistentes é baixa (em geral inferior a 10^{-3}) (ROUSH, 1994; ANDOW; ALSTAD, 1998). A técnica do F₂ screen pode detectar alelos da resistência ou estimar a frequência fenotípica de indivíduos resistentes mesmo em baixa frequência (ANDOW; ALSTAD, 1998). Esta técnica permite a manutenção da variabilidade genética e, por um processo de endogamia na geração F₁, é possível detectar genótipos resistentes raros na geração F₂, mediante a utilização de bioensaios de concentrações discriminatórias de proteínas Bt com dieta artificial (MARÇON et al., 1999; LUTTRELL; WAN; KNIGHTE, 1999), inseticidas ou tecidos de planta Bt (ANDOW; IVES, 2002; HUANG et al., 2011). Este método tem sido amplamente usado em programas de monitoramento da resistência na Austrália (MAHON; OLSEN; DOWNES, 2008; MAHON et al., 2010; MAHON; DOWNES; JAMES, 2012) e para estimar a frequência alélica e fenotípica de indivíduos resistentes para validação de estratégias de manejo da resistência (ANDOW; ALSTAD, 1998; SIEGFRIED et al., 2007). Além do mais, com a técnica do F₂ screen, é possível selecionar em laboratório linhagens de insetos

resistentes para testar pressupostos para o MRI, como, padrão de herança, grau de dominância, número de alelos e custo adaptativo associado à resistência.

Estudos com base genética demonstraram que há um predomínio recessivo ou incompletamente recessivo da resistência para a proteína Cry, com herança autossômica e monogênica (TABASHNIK et al., 1997; MAHON et al., 2007; PEREIRA; STORER; SIEGFRIED, 2008; PETZOLD-MAXWELL et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Para *S. frugiperda* resistente a Cry1F em Porto Rico e no Brasil, a herança da resistência foi caracterizada como monogênica, incompletamente recessiva e autossômica (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014). Desta forma, se a resistência for recessiva e as plantas Bt expressarem a proteína inseticida em alta dose, os indivíduos heterozigotos seriam controlados em plantas Bt e sobreviveriam apenas em áreas de refúgio (plantas não-Bt) (TABASHNIK et al., 2008). No entanto, na ausência de pressão de seleção, os indivíduos heterozigotos podem apresentar desvantagens adaptativas associadas à resistência (TABASHNIK et al., 2008; GASSMANN et al., 2009). O custo adaptativo acarreta efeitos negativos nos parâmetros biológicos durante o desenvolvimento da praga, impedindo a multiplicação da praga no campo, e consequentemente, retardando a evolução da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977; GOULD, 1994; PEREIRA; STORER; SIEGFRIED, 2008; GASSMANN et al., 2009; VÉLEZ et al., 2013b; JAKKA et al., 2014).

Levando-se em conta o cenário agrícola brasileiro, onde milho, algodão e soja Bt podem ser cultivados com proteínas que compartilham o mesmo modo de ação, além do cultivo de milho no inverno com irrigação via pivô central em algumas regiões agrícolas do Brasil (BARROS; TORRES; BUENO, 2010), associado com a rápida evolução da resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F, o risco de evolução de resistência cruzada com as proteínas que compartilham o mesmo sítio de ligação é uma ameaça à sustentabilidade das tecnologias Bt reduzindo os benefícios das estratégias de pirâmide de genes. Dentre às tecnologias de milho Bt liberadas para uso comercial, destacam-se às tecnologias YieldGard VT PROTM e PowercoreTM que expressam as proteínas inseticidas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F respectivamente (CTNBIO, 2010). Nesse contexto, para avaliar o risco de evolução da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, objetivou-se:

- Avaliar a atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ sobre *S. frugiperda* e monitorar a suscetibilidade a Cry1A.105 e Cry2Ab2 em populações coletadas em diferentes regiões agrícolas do Brasil.
- Selecionar e caracterizar a resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™.
- Avaliar o custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™.

Referências

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

ANDOW, D.A.; IVES, A.R. Monitoring and adaptive resistance management. **Ecological Applications**, Tempe, v. 12, p. 1378-1390, 2002.

ANDOW, D.A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.

ASHLEY, T.R.; WISEMAN, B.R.; DAVIS, F.M.; ANDREWS, K.L. The fall armyworm: a bibliography. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 72, n. 1, p. 152-202, 1989.

BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. Oviposition, development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.

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

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

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

CARRIÈRE, Y.; CROWDER, D.W.; TABASHNIK, B. E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, New York, v. 3, n. 5, p. 561-573, 2010.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa - Embrapa Milho e Sorgo, 1995. 45p. (Circular Técnica, 21).

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos e Tolerante a herbicidas, MON 89034xTC1507xNK603**. In: Parecer Técnico nº 2753/2010. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15833.html>>. Acesso em: 22 Nov. 2014.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos da ordem lepidoptera e pragas do milho, evento TC1507**. In: Parecer Técnico nº 1679/2008. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12818.html>>. Acesso em: 25 Nov. 2014.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos evento MON810**. In: Parecer Técnico nº 1.100/2007. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/10930.html>>. Acesso em: 25 Nov. 2014.

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

EPA. US Environmental Protection Agency, Biopesticide Registration Action Document. **Bacillus thuringiensis Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in corn [PC Codes 006515 (Cry2Ab2), 006514 (Cry1A.105)]**, 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/mon-89034-brad.pdf>>. Acesso em: 20 Nov. 2014.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, n. 2, p. 150-158, 2014.

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

FITT, G.P.; OMOTO, C.; MAIA, A.H.; WAQUIL, J.M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; HUAN, N.H.; ANDOW, D.A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A.; FONTES, E.M.G. **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publishing, 2006. 393p. p. 300-345.

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

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

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

GOULD, F. Simulation models for predicting durability of insect-resistant germ plasm: A deterministic diploid, two-locus model. **Environmental Entomology**, College Park, v. 15, n. 1, p. 1-10, 1986.

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

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

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

HUANG, F.; 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**, Sussex, v. 67, n. 10, p. 1269–1276, 2011.

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

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

JAMES C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. International Service for the Acquisition of Ag-biotech Applications, Ithaca, New York. 2013. (**ISAAA Brief**,46)

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 1, p. 342-351, 2014.

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

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

MAHON, R.J.; OLSEN, K.M.; GARSIA, K.A.; YOUNG, S.R. Resistance to *Bacillus thuriengiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 3, p 894-902, 2007.

MAHON, R.J.; OLSEN, K.M.; DOWNES, S. Isolations of Cry2Ab resistance in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) are allelic. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 3, p. 909-914, 2008.

MAHON, R.J.; DOWNES, S.; JAMES, W.; PARKER, T. Why do F1 screens estimate higher frequencies of Cry2ab resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) than do F2 screens? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 2, p. 472-481, 2010.

MAHON, R.J.; DOWNES, S.; JAMES, B. Vip3A resistance alleles exist at high levels in Australian targets before release of cotton expressing this toxin. **Plos One**, Berkeley, v. 7, n. 6, p. e39192, 2012.

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

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

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

ROUSH, R.T. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays? **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 501-516, 1994.

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**, Farnham Royal, v. 98, p. 621–629, 2008.

PETZOLD-MAXWELL, J.L.; CIBILS-STEWART, X.; FRENCH, B.W.; GASSMANN, A.J. Adaptation by western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) to Bt maize: inheritance, fitness costs, and feeding preference. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 4, p. 1407-1418, 2012.

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

ROUSH, R.T. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: Can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? **Philosophical transactions of the Royal Society of London . Series B. Biological sciences**, London, v. 353, n. 35, p. 1777-1786, 1998.

SHELTON, A.M.; TANG, J.D.; ROUSH, R.T.; METZ, T.D.; EARLE, E.D. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 339-342, 2000.

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

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

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

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

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

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 1999-2002, 2008.

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

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 United States of America**, Washington, v. 94, n. 5, p. 1640-1644, 1997.

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

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

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

VÉLEZ, A.M.; SPENCER, T.A.; ALVES, A.P.; CRESPO, A.L.B.; SIEGFRIED, B.D. Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 138, n. 5, p. 315-325, 2013b.

ZHANG, H.; WU, S.; YANG, Y.; TABASHNIK, B.E.; WU, Y. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by an intracellular cadherin mutation in field-selected populations of cotton bollworm. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 7, n. 12, p. 1-10, 2012.

2 SUSCETIBILIDADE DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) A PROTEÍNAS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner EXPRESSAS EM MILHO YELDGARD VT PRO™ E POWERCORE™

Resumo

Para subsidiar um programa de manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ (VT PRO) e PowerCore™ (PW) que expressam as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner, respectivamente, foram conduzidos estudos para avaliar a atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta de milho VT PRO e PW sobre *S. frugiperda* e monitorar a suscetibilidade às proteínas inseticidas Cry1A.105 e Cry2Ab2 de *Bacillus thuringiensis* Berliner em populações da praga coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil durante as safras de 2011 a 2014. Houve 100% de mortalidade de neonatas de *S. frugiperda* quando expostas ao tecido foliar de milho VT PRO e PW. No entanto, em estilo-stigmas e grãos a mortalidade foi inferior a 50 e 6% respectivamente e cerca de 50% das lagartas completaram o ciclo biológico. Foi observada variabilidade geográfica na suscetibilidade de populações *S. frugiperda* a Cry1A.105 e Cry2Ab2, para algumas populações de 2011 a 2014. As populações de *S. frugiperda* coletadas durante a 1ª e 2ª safras de 2011 e 2012, 1ª safra de 2013 apresentaram elevada suscetibilidade a Cry1A.105 com sobrevivência < 7% e inibição do desenvolvimento larval > 85% nos bioensaios de aplicação da proteína na superfície da dieta na concentração diagnóstica de 5000 ng. cm² de dieta. Contudo, na 2ª safra de 2013 e 1ª safra de 2014 houve aumento significativo na sobrevivência. No entanto, foi verificadas inibição do desenvolvimento larval de 57 a 100%. Para Cry2Ab2, o melhor critério de resposta para avaliação da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* foi a inibição do desenvolvimento larval. Não houve redução significativa da suscetibilidade a Cry2Ab2 em populações de *S. frugiperda* ao longo do tempo, baseado nos bioensaios de incorporação da proteína na concentração diagnóstica de 100 µg/ml de dieta. Baseado nos resultados do presente trabalho, a variação na atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas vegetativas de milho VT PRO e PW pode acelerar a evolução da resistência. Reduções significativas na suscetibilidade de algumas populações de *S. frugiperda* a Cry1A.105 mas não para Cry2Ab2 foram constata no decorrer do tempo, indicando assim a necessidade de revisar as estratégias atuais de manejo da resistência.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; *Bacillus thuringiensis*; Milho Bt; Manejo da Resistência de Insetos

Abstract

To support a resistance management program of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) to YieldGard VT Pro™ (VT PRO) and PowerCore™ (PW) corn technologies expressing Cry1A.105/Cry2Ab2 and Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner respectively, we conducted studies to evaluate the biological activity of Bt proteins expressed in different plant structures of VT PRO and PW corn on *S. frugiperda* and to monitor the susceptibility to Cry1A.105 and Cry2Ab2 in pest populations collected from different geographical regions in Brazil from 2011 to 2014 growing seasons. The mortality of neonate larvae of *S. frugiperda* was 100% when fed on leaf tissue of VT Pro and

PW corn. However, the larval mortality when fed on silks and grains was less than 50 and 6% respectively and about of 50% of the larvae completed the biological cycle. A geographical variation in susceptibility of *S. frugiperda* to Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins was detected among populations, for some populations from 2011 to 2014. *S. frugiperda* populations collected during the 1st and 2nd seasons of 2011 and 2012 and the 1st season 2013 showed high susceptibility to Cry1A.105, with survival < 7% and inhibition of larval development > 85% at diagnostic concentration bioassays of 5.000 ng.cm² of diet (diet surface treatment bioassay). However, in the 2nd season 2013 and the 1st season of 2014 there was a significant increase in the larval survival. However, the larval growth inhibition was from 57 to 100%. The best response criterion for assessing the susceptibility of populations of *S. frugiperda* to Cry2Ab2 was the larval growth. There was no significant reduction in susceptibility to Cry2Ab2 in *S. populations* over time at diagnostic concentration bioassays of 100 µm/ml of diet (diet incorporation bioassay). In conclusion, the variation in the biological activity of Bt proteins in different plant structures of VT PRO and PW corn can favor the evolution of resistance. A significant reduction was detected in the susceptibility of some populations of *S. frugiperda* to Cry1A.105 but not to Cry2Ab2 over time, indicating the need to revise current resistance management strategies.

Keywords: Fall armyworm; *Bacillus thuringiensis*; Bt corn; Insect Resistance Management

2.1 Introdução

A lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é um dos principais insetos-praga do milho no Brasil (CRUZ, 1995). Na cultura do milho, os prejuízos ocasionados pela praga podem variar de 20 a 100% (CRUZ, 1995; POGUE, 2002). Além da desfolha, *S. frugiperda* também ataca as espigas, inicialmente alimentando-se de estilo-estigmas e, a partir do 2º instar larval, dos grãos de milho (CRUZ, 1995). Também, em instares larvais mais avançados, possuem o hábito de penetrar lateralmente nas espigas, atacando diretamente os grãos e ocasionando perdas diretas à produção (CRUZ, 1995; RODRÍGUEZ-DEL-BOSQUE; CANTÚ-ALMAGUER; REYES-MÉNDEZ, 2010).

Atualmente, a principal estratégia de controle de *S. frugiperda* tem sido o uso de milho Bt, que atualmente ocupa mais de 75% da área total de cultivo de milho no Brasil, ocupando aproximadamente 12 milhões de hectares anuais (CÉLERES, 2013). Dentre as tecnologias de milho Bt liberadas para uso comercial estão as tecnologias YieldGard VT PROTM e PowercoreTM que expressam as proteínas inseticidas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F respectivamente (CTNBIO, 2010). Em geral, híbridos de milho Bt piramidados são mais eficazes no controle *S. frugiperda* quando comparados a plantas que expressam uma única proteína inseticida (BURKNESS et al., 2010; SIEBERT et al., 2012; NIU et al., 2013). Além disso, possibilitam aumentar o espectro de controle, bem como

manejar de forma mais efetiva a resistência, especialmente, quando as proteínas inseticidas apresentam modo de ação distinto e, não há resistência cruzada entre as mesmas (IVES et al., 2011; VÉLEZ et al., 2013; BRÉVAULT et al., 2013; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). O uso de milho Bt piramidado pode ser enquadrado na estratégia de ataque múltiplo para o manejo da resistência, a qual se baseia na premissa que as proteínas Bt, isoladas ou em combinação apresentam elevada toxicidade contra a mesma praga-alvo (GOULD, 1998; ROUSH, 1998, ZHAO et al., 2003, STORER et al., 2012). No Brasil, o sistema de cultivo de milho, algodão e soja Bt possibilita a exposição de populações de *S. frugiperda* à constante pressão de seleção de proteínas Bt, aumentando a possibilidade da rápida evolução de resistência e, conseqüentemente, ameaçando a sustentabilidade das tecnologias de milho Bt. Um exemplo disso foi a rápida evolução da resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa em milho Bt em Porto Rico (STORER et al., 2010; 2012) e no Brasil (FARIAS et al., 2014a), com menos de 4 anos de uso comercial dessa tecnologia.

Outro fator que pode afetar a sustentabilidade dos eventos de milho Bt é as oscilações nos níveis de expressão das proteínas ao longo do desenvolvimento e entre estruturas da planta (EPA, 2010; HUANG et al., 2011). As oscilações nos níveis de proteína ao longo do desenvolvimento, associado com a elevada polifagia de *S. frugiperda*, pode expor a praga a sub-doses das proteínas inseticidas, favorecendo a sobrevivência de insetos e, conseqüentemente, a evolução da resistência, uma vez que os indivíduos heterozigotos poderiam estar sobrevivendo nesta situação (ANDOW, 2008). Fato observado em algodão Bt piramidado que expressa as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab para o controle de *H. zea*, onde os autores relatam uma menor eficiência de controle com o desenvolvimento da cultura devido à menor expressão das proteínas de Bt, o que pode favorecer a evolução da resistência (BRÉVAULT et al., 2013).

Para o estabelecimento de programas pró-ativos de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) é de suma importância entender a suscetibilidade da praga-alvo às tecnologias de Bt. O primeiro passo para a implementação desses programas de manejo é entender a suscetibilidade da praga-alvo mediante à condução de bioensaios para a avaliação da toxicidade das proteínas inseticidas expressas na planta (HUANG et al., 2011) ou isoladamente em bioensaios com dieta artificial (MARÇON et al., 1999; LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 2010; ALI et al., 2006), permitindo identificar potenciais diferenças na suscetibilidade e definir concentrações diagnósticas para o monitoramento da suscetibilidade para mensurar pequenas mudanças na frequência de resistência quando do uso dessa

tecnologia a campo (SIMS et al., 1996; MARÇON et al., 2000; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006).

Nesse sentido, para avaliar o risco de evolução da resistência e subsidiar programas de MRI para às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e Powercore™ foram realizados estudos para avaliar a atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta (folhas, estilo-estigmas e grãos) das tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ sobre *S. frugiperda* e monitorar a suscetibilidade às proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 em populações geograficamente distintas de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil durante as safras agrícolas de 2011 a 2014.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Populações de Insetos

Para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* às proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, foram coletadas populações em regiões geograficamente distintas de produção de milho durante a 1ª e 2ª safras de 2011, 2012, 2013 e 2014 (Tabela 1; Figura 1). As coletas foram realizadas em áreas de milho não-Bt, sendo coletadas 500 lagartas/local. Após a coleta as lagartas foram levadas ao laboratório, onde foram mantidas em dieta artificial. Além das populações de campo, se utilizou uma população suscetível de referência (SUS) de *S. frugiperda* sendo criada sobre dieta artificial há mais de 10 anos, livres de pressão de seleção por inseticidas e proteínas de Bt.

Tabela 1 - Populações de *S. frugiperda* utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade a Cry1A.105 e Cry2Ab2

(continua)				
Estado	Município	População	<i>n</i>	Data de coleta
1ª safra 2011				
Rio Grande do Sul	Santo Antonio do Planalto	RS-8	775	Novembro, 2010
São Paulo	Casa Branca	SP-6	659	Novembro, 2010
Goiás	Rio Verde	GO-15	630	Novembro, 2010
Bahia	São Desidério	BA-22	530	Dezembro, 2010
Mato Grosso	Campo Verde	MT-15	141	Dezembro, 2010
Paraná	Sabáudia	PR-23	838	Novembro, 2010
Paraná	Tibagi	PR-25	530	Dezembro, 2010
2ª safra 2011				
Mato Grosso	Campo Verde	MT-16	144	Abril, 2011

Tabela 1 - Populações de *S. frugiperda* utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade a Cry1A.105 e Cry2Ab2

(continuação)				
Estado	Município	População	<i>n</i>	Data de coleta
2ª safra 2011				
Goiás	Rio Verde	GO-16	680	Abril, 2011
Mato Grosso do Sul	Douradina	MS-4	462	Abril, 2011
Paraná	Londrina	PR-27	690	Maio, 2011
Bahia	Luiz Eduardo Magalhães	BAH-23	442	Maio, 2011
1ª safra 2012				
Rio Grande do Sul	Santo Ângelo	RS-9	485	Dezembro, 2011
Rio Grande do Sul	Passo Fundo	RS-10	363	Dezembro, 2011
São Paulo	Casa Branca	SP-11	923	Dezembro, 2011
Santa Catarina	Xanxerê	SC-1	371	Dezembro, 2011
Paraná	Cascavel	PR-30	795	Dezembro, 2011
Paraná	Castro	PR-32	251	Dezembro, 2011
Goiás	Rio Verde	GO-18	893	Dezembro, 2011
Minas Gerais	Uberlândia	MG-14	204	Dezembro, 2011
Bahia	Luiz Eduardo Magalhães	BA-26	643	Dezembro, 2011
Goiás	Planaltina	GO-20	337	Dezembro, 2011
2ª safra 2012				
Bahia	Barreiras	BA-29	615	Abril, 2012
Mato Grosso	Campo Verde	MT-18	505	Abril, 2012
Mato Grosso	Sinop	MT-19	568	Abril, 2012
Mato Grosso	Campo Novo do Parecis	MT-20	570	Abril, 2012
Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	MS-12	150	Abril, 2012
Mato Grosso do Sul	Dourados	MS-13	228	Maio, 2012
Goiás	Caiapônia	GO-23	524	Maio, 2012
São Paulo	Palmital	SP-14	740	Maio, 2012
Paraná	Sabáudia	PR-37	474	Maio, 2012
Paraná	Campo Mourão	PR-38	601	Maio, 2012
Paraná	Palotina	PR-39	435	Maio, 2012
1ª safra 2013				
São Paulo	Casa Branca	SP-15	445	Novembro, 2012
Paraná	Tibagi	PR-41	512	Novembro, 2012
Paraná	Cascavel	PR-43	330	Fevereiro, 2013
Bahia	São Desidério	BA-32	291	Dezembro, 2012
Goiás	Rio Verde	GO-24	636	Dezembro, 2012
Goiás	Flores de Goiás	GO-26	530	Dezembro, 2012
Minas Gerais	Araguari	MG-16	142	Janeiro, 2013
Santa Catarina	Chapecó	SC-2	549	Fevereiro, 2013
Rio Grande do Sul	Santo Ângelo	RS-13	473	Fevereiro, 2013
Rio Grande do Sul	Não me Toque	RS-14	593	Fevereiro, 2013

Tabela 1 - Populações de *S. frugiperda* utilizadas para o monitoramento da suscetibilidade a Cry1A.105 e Cry2Ab2

(conclusão)				
Estado	Município	População	<i>n</i>	Data de coleta
2ª safra 2013				
Mato Grosso	Campo Verde	MT-25	377	Março, 2013
Mato Grosso	Sorriso	MT-23	1015	Março, 2013
Mato Grosso	Sapezal	MT-26	467	Abril, 2013
Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	MS-16	587	Abril, 2013
Mato Grosso do Sul	Douradina	MS-17	361	Abril, 2013
Goiás	Montividiu	GO-28	520	Abril, 2013
Paraná	Palotina	PR-46	240	Maio, 2013
Paraná	Rolândia	PR-48	645	Maio, 2013
Paraná	Campo Mourão	PR-49	317	Maio, 2013
São Paulo	Palmital	SP-16	411	Maio, 2013
1ª safra 2014				
São Paulo	Casa Branca	SP-17	1100	Novembro, 2013
Minas Gerais	Araguari	MG-20	1205	Novembro, 2013
Rio Grande do Sul	Não me toque	RS-16	352	Dezembro, 2013
Rio Grande do Sul	Santo Ângelo	RS-17	816	Dezembro, 2013
Paraná	Castro	PR-51	1072	Dezembro, 2013
Paraná	Cascavel	PR-52	1200	Dezembro, 2013
Santa Catarina	Seara	SC-3	1232	Dezembro, 2013
Bahia	Correntina	BA-34	1008	Dezembro, 2013
Goiás	Jataí	GO-30	912	Dezembro, 2013
Goiás	Cabeceira	GO-31	1104	Janeiro, 2014
2ª safra 2014				
Paraná	Bela Vista do Parecis	PR-53	1072	Abril, 2014
Paraná	Palotina	PR-54	1024	Abril, 2014
Paraná	Engenheiro Beltrão	PR-55	992	Abril, 2014
Mato Grosso	Sorriso	MT-29	926	Abril, 2014
Mato Grosso	Campo Verde	MT-28	986	Abril, 2014
Mato Grosso	Sapezal	MT-30	560	Abril, 2014
São Paulo	Casa Branca	SP-18	960	Abril, 2014
Mato Grosso do Sul	Dourados	MS-19	944	Abril, 2014
Mato Grosso do Sul	Campo Grande	MS-18	1150	Março, 2014
Goiás	Rio Verde	GO-32	1056	Maio, 2014

Figura 1 - Populações de *S. frugiperda* usadas para o monitoramento da suscetibilidade à Cry1A.105 e Cry2Ab2. (A) 1ª e 2ª safra de 2011, (B) 1ª e 2ª safra de 2012, (C) 1ª e 2ª safra de 2013 e (D) 1ª e 2ª safra de 2014

2.2.2 Criação e manutenção de populações de *S. frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* foram mantidas em copos plásticos de 50 mL contendo dieta artificial (Tabela 2), vedados com uma placa acrílica. Nesses copos foram inoculadas 2 lagartas, as quais permaneceram até a fase de pupa. As pupas foram retiradas e acondicionadas em placas de Petri (12 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) forradas com papel filtro umedecido com água destilada e acondicionadas em gaiolas cilíndricas de PVC para emergência dos adultos. Após a emergência, os adultos foram repassados para gaiolas cilíndricas de PVC (24,0 cm altura × 14,5 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior com pratos plásticos (15 cm de diâmetro). O alimento dos adultos foi constituído de uma solução aquosa de mel a 10% fornecido via capilaridade por algodão hidrófilo. A cada 2 dias as posturas foram coletadas e

acondicionadas em recipientes plásticos (100 mL) contendo papel filtro umedecido com água destilada e mantidos em câmara climatizada (temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h). Após a eclosão, as lagartas foram repicadas para dieta artificial retornando à criação de manutenção, sendo o restante das neonatas utilizadas para realização dos bioensaios.

Tabela 2 - Composição da dieta artificial utilizada para criação de *S. frugiperda* em laboratório (KASTEN JR; PRECETI; PARRA, 1978)

Ingredientes	Quantidade
Feijão carioca (g)	75
Germe de trigo (g)	60
Proteína de soja (g)	30
Caseína (g)	30
Levedura de cerveja (g)	37,5
Ágar (g)	22,5
Ácido ascórbico (g)	3,96
Ácido sórbico (g)	1,98
Metilparahidroxibenzoato (nipagin) (g)	124
Cloridrato de tetraciclina 50% (mg)	3,30
Formaldeído 10% (mL)	15,9
Complexo vitamínico (mL)	9,9
Água (mL)	1200
Complexo vitamínico (composição)	
Niacinamida (g)	1,00
Pantotenato de cálcio (g)	1,00
Riboflavina (g)	0,50
Tiamina (g)	0,25
Piridoxina (g)	0,25
Ácido fólico (g)	0,10
Biotina (mg)	0,02
Vitamina B ₁₂ (mL)	2,00
Água (mL)	1000

2.2.3 Atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™

2.2.3.1 Bioensaios com discos de folha, estilo-estigmas e grãos

Para avaliar a suscetibilidade de *S. frugiperda* as folhas, estilo-estigma e grãos das tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ foi utilizada uma população suscetível de referência de *S. frugiperda*, a qual é mantida em laboratório por 10 anos, livre de pressão de seleção por inseticidas e proteínas de Bt. Para os bioensaios realizou-se a

semeadura em campo dos eventos de milho Bt YieldGard VT PRO™ (LH198 + LH172) e PowerCore™ (DKB™ 390) e isolinha não-Bt (DKB™ 390) na densidade de 5 plantas por metro linear e espaçamento entre linhas de 0,5 cm. Nos estádios fenológicos V3 e V8, folhas completamente expandidas da região do cartucho foram retiradas e, no laboratório, com auxílio de um vazador metálico, discos de folha de 2,2 cm de diâmetro foram obtidos e acondicionados sobre uma mistura geleificada de ágar-água a 2,5% (1 mL/célula) em placas de acrílico com 12 células (Costar™). Os discos de folha de milho foram mantidos separados da camada ágar-água por um disco de papel filtro. Posteriormente, em cada disco de folha, com auxílio de um pincel fino foi inoculada uma lagarta neonata (< 24 h de idade) de *S. frugiperda*.

Para os bioensaios de estilo-estigma e grãos, as plantas de milho foram cultivadas até os estágios fenológicos de VT/R1 (emissão de estilo-estigmas) e R2/R3 (grãos leitosos) a campo. Inicialmente, os estilo-estigmas foram retirados e acondicionados em placas de acrílico (Costar™) (1,5 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) de 6 células sobre uma mistura geleificada de ágar-água a 2,5% e papel filtro. A padronização da quantidade de estilos-estigma em cada repetição foi realizada por meio da pesagem em balança analítica (3 g de estilo-estigmas/célula). Posteriormente, foram transferidas 3 lagartas/célula de *S. frugiperda* (> 24 h de idade) com auxílio de um pincel fino. Para os bioensaios com grãos de milho, em laboratório, os grãos foram retirados das espigas e acondicionados em placas de acrílico (Costar™) com 6 células sobre uma mistura geleificada de ágar-água a 2,5% e papel filtro.

As placas de todos os bioensaios foram vedadas com filme plástico transparente (Magipack™) e em seguida pela tampa da placa, sendo acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h. A mortalidade larval foi avaliada após 5 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10, 5 e 5 repetições para os bioensaios com disco de folha, estilo-estigma e grão de milho e cada repetição constituída por 12, 18 e 18 lagartas/repetição respectivamente. A porcentagem de mortalidade das tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ foi corrigida a partir da mortalidade obtida no tratamento de milho não-Bt (ABBOTT, 1925). A porcentagem de mortalidade (x) foi transformada em $\sqrt{x + 0.5}$, posteriormente, submetida à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) (PROC ANOVA, SAS INSTITUTE, 2000).

2.2.3.2 Biologia de *S. frugiperda* em estilo-estigmas e grãos de milho Bt e não-Bt

Para os estudos de biologia de *S. frugiperda* em estilo-estigmas e grãos de milho foram utilizados os híbridos LH198 + LH172 e DKB™ 390 com a tecnologia de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente, e isolinha não-Bt (DKB™ 390). No estágio fenológico R1, estilo-estigmas foram retirados das espigas e acondicionados em placas de bioensaio de 16 células (5,5 centímetros de comprimento x 4,0 cm de profundidade x 3,0 centímetros de altura por poço) [(Advento do Brasil, São Paulo, Brasil)] sobre uma mistura de ágar-água (2,5%) e papel filtro. Posteriormente, foram infestadas 5 neonatas de *S. frugiperda* por célula, as quais foram alimentadas com estilo-estigmas até o segundo instar larval. A partir desse momento, as lagartas foram individualizadas e, os estilo-estigmas foram substituídos por grãos de milho retirados do terço inicial das espigas, no estágio fenológico R3. As lagartas foram alimentadas com grãos de milho até a fase de pupa, sendo substituídos a cada 48 h. As placas de bioensaio foram mantidas em câmara climatizada (temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 repetições, sendo cada repetição constituída por 10 lagartas. Para cada tratamento avaliou-se a duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa, período ovo-adulto, peso larval aos 12 dias, peso de pupas com 24 h de idade, razão sexual, duração dos períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, longevidade de machos e fêmeas, fecundidade e fertilidade. A duração e a viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto foram determinadas em observações diárias. A longevidade dos adultos, fecundidade e fertilidade foram avaliadas a partir da formação de 15 casais por tratamento, individualizados em gaiolas de PVC (23 cm altura x 10 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal para substrato de oviposição. Diariamente contabilizou-se o número de ovos e registrou-se a mortalidade dos adultos. Para determinação do período embrionário e viabilidade, 50 ovos da segunda postura foram obtidos de cada casal. Os ovos foram acondicionados em tubos de vidro (8.5 x 2.5 cm). No interior dos tubos foi colocado um papel filtro (2 x 1 cm), umedecido com água destilada, sendo fechados na parte superior com filme plástico. As posturas foram observadas diariamente registrando-se o número de lagartas eclodidas. Os dados de duração das fases de larva e pupa, peso larval e de pupas, período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição (x) foram transformados em $\sqrt{x + 0.5}$, por não apresentarem distribuição normal. Posteriormente, todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) (PROC ANOVA, SAS INSTITUTE, 2000). O possível desvio na proporção dos sexos foi comparado

pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$) (PROC FREQ, SAS INSTITUTE, 2000). Adicionalmente foi calculada a tabela de vida de fertilidade estimando-se o intervalo entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução (R_0), a taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a razão finita de crescimento (λ). Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade e respectivos erros padrão foram estimados por meio da programação “Lifetable.sas” (MAIA et al., 2000).

2.2.4 Monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a Cry1A.105 e Cry2Ab2

Para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* às proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, foram coletadas populações em regiões geograficamente distintas de produção de milho durante a 1ª e 2ª safras de 2011, 2012, 2013 e 2014 (Tabela 1; Figura 1). Após a coleta as lagartas foram levadas ao laboratório, onde foram mantidas em dieta artificial (Tabela 2).

2.2.4.1 Bioensaios com concentrações diagnósticas de Cry1A.105 e Cry2Ab2

As proteínas Cry1A.105 purificada (1.000 $\mu\text{g/mL}$ - 80% de pureza) e Cry2Ab2 expressa em tecido liofilizado de milho (concentração de 6.000 μg de Cry2Ab2/g) foram fornecidas pela empresa Monsanto do Brasil Ltda e armazenadas em ultra-freezer a -80 e -20 °C, respectivamente. Para o monitoramento da suscetibilidade das diferentes populações foram utilizadas as concentrações diagnósticas de 5.000 ng Cry1A.105/ cm^2 de dieta, (ANEXOS A e B) e 100 μg de Cry2Ab2/mL de dieta (ANEXO C) que foram definidas em trabalhos preliminares a partir de bioensaios de concentrações-resposta de populações de *S. frugiperda* coletadas durante a 1ª e 2ª safra de 2009. Para estimativa das concentrações diagnósticas de 5.000 ng Cry1A.105/ cm^2 , os dados de mortalidade e inibição de desenvolvimento das populações (ANEXOS A e B) foram agrupadas e analisadas conjuntamente, segundo método proposto por Sims et al. (1996). Devido à baixa atividade biológica da proteína Cry2Ab2 (tecido liofilizado) incorporada em dieta artificial sobre *S. frugiperda* não foi possível estimar as concentrações letais (CI) CL_{50} e CL_{90} , desta forma, a estimativa da concentração diagnóstica baseou-se na inibição do desenvolvimento larval (ANEXO C).

Para os bioensaios com Cry1A.105, inicialmente a dieta artificial foi preparada e vertida em bandejas de bioensaio com 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ) (1 mL de dieta por célula). Posteriormente, a proteína Cry1A.105 foi diluída em solução tampão (25 mM 3 - (Ciclohexilamino) – 1 -Propanosulfônico (CAPS) à pH 10,3, 1

mM Benzimidazole-HCl, 0,1 mM de Ácido Etileno Diamino Tetra Acético (EDTA) e 0,2 mM de Ditioneitol (DTT) e a essa solução adicionou-se 0,1% do surfactante Triton X-10 para obter espalhamento uniforme da solução na superfície da dieta. Após a secagem da dieta, com auxílio de uma pipeta de repetição essa solução foi aplicada na superfície da dieta (30 μ L/célula). A área de superfície da dieta em cada célula foi de 1, 887 cm^2 .

Para Cry2Ab2 utilizou-se o método de incorporação do tecido liofilizado em dieta artificial. Após a incorporação do tecido liofilizado em dieta artificial, essa foi distribuída em bandejas de bioensaio. O tratamento controle foi constituído somente de dieta. Após a secagem e esfriamento da dieta artificial, cada célula foi infestada com uma neonata (< 24 h de idade), com auxílio de um pincel fino. Para cada concentração diagnóstica foram testadas 1008 neonatas/população (9 repetições de 112 lagartas/concentração diagnóstica e 4 repetições de 16 neonatas no tratamento controle). Após infestação, as placas foram vedadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO-CV-16, CD International Inc.) e acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h. A sobrevivência larval e peso dos sobreviventes foram avaliados aos 7 dias. As lagartas sobreviventes que não ultrapassaram o primeiro instar larval também foram consideradas mortas. Os dados de porcentagem de sobrevivência e inibição de desenvolvimento larval foram transformados arc sen $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) (PROC ANOVA, SAS INSTITUTE, 2000).

2.3 Resultados

2.3.1 Bioensaios com discos de folha, estilo-estigmas e grãos

Houve 100% de mortalidade de neonatas de *S. frugiperda* em discos de folha de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM nos estádios fenológicos V3 ($F = 138,47$; g.l. = 6, 28; $P < 0,0001$) e V8 ($F = 70,53$; g.l. = 6, 28; $P < 0,0001$), sendo significativamente superior a mortalidade na isolinha não-Bt (< 15%) (Tabela 3). Contudo, quando as neonatas de *S. frugiperda* foram expostas a estilo-estigma e grãos de milho dos eventos de milho Bt YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM houve significativa mortalidade de 25 e 50%, respectivamente ($F = 42,53$; g.l. = 2, 12; $P < 0,0001$). A mortalidade na isolinha não-Bt foi inferior a 5% (Tabela 3). Em grãos de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, a mortalidade variou de 5-6% diferindo daquela observada em grãos da isolinha não-Bt (2%) ($F = 2,53$; g.l. = 2, 12; $P = 0,2680$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de mortalidade de *S. frugiperda* após cinco dias em disco de folha, estilo-estigma e grão de milho Bt e não-Bt

Tratamentos	Estrutura da planta ^a			
	Folha V3	Folha V8	Estilo-estigmas	Grãos de milho
YieldGard VT PRO TM	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	25,8 ± 3,9 b	6,0 ± 0,3 a
PowerCore TM	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	49,7 ± 7,8 a	5,0 ± 0,3 a
Isolinha não-Bt	5,0 ± 5,0 b	15,0 ± 4,8 b	4,6 ± 2,2 c	1,8 ± 0,2 b

^aValores representam médias ± EP. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey, $P < 0,05$.

2.3.2 Biologia de *S. frugiperda* em estilo-estigmas e grãos de milho Bt e não Bt

Não houve diferença significativa na duração da fase de ovo ($F = 0,14$; g.l. = 2, 29; $P = 0,8702$), larva ($F = 0,74$; g.l. = 2, 29; $P = 0,4874$), pupa ($F = 0,29$; g.l. = 2, 29; $P = 0,7526$) e período ovo-adulto ($F = 1,58$; g.l. = 2, 29; $P = 0,2236$) de *S. frugiperda* quando da alimentação em estilo-estigmas e grãos de milho YieldGard VT PROTM, PowerCoreTM, comparativamente à isolinha não-Bt (Figura 2). Também não houve diferenças significativas na viabilidade das fases de ovo ($F = 0,18$; g.l. = 2, 29; $P = 0,6502$) e pupa ($F = 0,77$; g.l. = 2, 29; $P = 0,4732$) de *S. frugiperda* em milho Bt, quando comparados a isolinha não-Bt (Figura 2). Por outro lado, a viabilidade larval de *S. frugiperda* ($F = 12,12$; g.l. = 2, 29; $P = 0,1238$) foi significativamente menor nas tecnologias de milho YieldGard VT PROTM (62%) e PowerCoreTM (50%), comparativamente a isolinha não-Bt (69%) (Figura 2). A redução na viabilidade larval impactou diretamente a viabilidade do período ovo-adulto, onde 54 e 44% dos insetos completaram o ciclo biológico nos eventos de Bt YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM ($F = 12,28$; g.l. = 2, 29; $P = 0,0253$) (Figura 2). No milho não-Bt a viabilidade deste período foi de 62% (Figura 2).

Figura 2 - Duração (dias) (A) e viabilidade (B) dos estágios de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto de *S. frugiperda* alimentadas com as tecnologias de milho YieldGard VT PRO™, PowerCore™ e isolinha não-Bt. Grupo de três colunas com mesma letra no mesmo estágio de desenvolvimento não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Houve redução significativa no peso larval de *S. frugiperda* na tecnologia de milho Bt PowerCore™, comparativamente à isolinha não-Bt ($F = 2,98$; g.l. = 2, 29; $P = 0,0511$) (Tabela 4). Em contraste, o peso larval em milho YieldGard VT PRO™ foi similar daquele observado para as larvas alimentadas com a isolinha não-Bt (Tabela 4). Entretanto, as diferenças no ganho de peso das lagartas não se refletiram no peso de pupas de *S. frugiperda*, o qual foi similar entre os tratamentos ($F = 0,51$; g.l. = 2, 29; $P = 0,6057$) (Tabela 4). A razão sexual não foi afetada devido à alimentação das lagartas em estilo-estigmas e grãos de milho Bt ($\chi^2 = 18,78$; g.l. = 2, 29; $P = 0,2802$) (Tabela 4). O desenvolvimento da fase imatura de *S. frugiperda* em estilos-estigmas e grãos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ não afetou os parâmetros biológicos da fase adulta, como a longevidade de fêmeas ($F = 5,02$; g.l. = 2, 40; $P = 0,0116$) e machos ($F = 8,42$; g.l. = 2, 40; $P = 0,0009$), período de pré-oviposição ($F = 1,01$; g.l. = 2, 40; $P = 0,3723$), oviposição ($F = 0,04$; g.l. = 2, 40; $P = 0,9573$). No entanto, *S. frugiperda* em milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ teve menor desempenho reprodutivo. Houve uma redução de 15% na fecundidade diária de fêmeas de *S. frugiperda* originadas de lagartas alimentadas com estilo-estigmas e grãos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, em comparação àquelas em milho não-Bt (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros biológicos de *S. frugiperda* em estilo-estigmas e grãos de milho em milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™

Parâmetros Biológicos	YieldGard VT PRO™	PowerCore™	Isolinha não-Bt
Peso larval 12 DAI (mg)	140,0 ± 0,12 a	100,0 ± 0,01 b	120,0 ± 0,01 ab
Peso pupa (mg)	150,0 ± 0,01 a	168,3 ± 0,05 a	169,0 ± 0,03 a
Razão sexual (♀ / ♀+♂)	0,53 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,54 ^{ns}
Longevidade fêmea (dias)	16,5 ± 0,3 a	15,8 ± 0,5 a	15,2 ± 0,6 a
Longevidade macho (dias)	14,6 ± 0,4 a	14,7 ± 0,4 a	14,2 ± 0,6 a
Pré-oviposição (dias)	6,1 ± 0,3 a	5,4 ± 0,2 a	5,3 ± 0,2 a
Oviposição (dias)	7,7 ± 0,3 a	8,2 ± 0,3 a	7,6 ± 0,2 a
Pós-oviposição (dias)	2,1 ± 0,2 a	2,2 ± 0,4 a	0,8 ± 0,4 b
Fecundidade diária	228,8 ± 8,6 b	233,6 ± 15,0 b	294,9 ± 29,9 a
Fecundidade total	2454,4 ± 141,3 ab	1898,8 ± 145,1 b	2528,1 ± 140,3 a

^aValores representam a média ± EP. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

^{ns}não significativo pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ($P > 0,05$).

Em geral, às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ afetaram negativamente os parâmetros da tabela de vida de fertilidade de *S. frugiperda* (Tabela 5). Isso se refletiu no tempo médio entre gerações (T) de *S. frugiperda*, o qual foi significativamente maior nos eventos de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, em comparação a isolinha não-Bt (Tabela 5). Em adição, a alimentação de *S. frugiperda* em estilo-estigmas e grãos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ reduziu em 27 e 42% a capacidade de aumento populacional (R_0) (Tabela 5). Com base nesses resultados, decorridos 42 dias (T) de desenvolvimento de *S. frugiperda* são esperadas 726 e 568 fêmeas resultantes de cada fêmea em fase de reprodução quando da alimentação em estilo-estigmas e grãos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente (Tabela 5). Na isolinha não-Bt, após 40 dias (T) são esperadas 1008 fêmeas/fêmea. Além disso, o desenvolvimento de *S. frugiperda* nas estruturas reprodutivas de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ afetou a taxa intrínseca de crescimento (r_m), indicando redução de 10 e 15% na capacidade de aumento populacional da praga (Tabela 5). No que se refere à razão finita de aumento (λ), o crescimento populacional diário de *S. frugiperda* foi menor em ambos os eventos Bt, comparativamente, à isolinha não Bt (Tabela 5).

Tabela 5 - Tabela de vida de fertilidade de *S. frugiperda* em estilo-estigmas e grãos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™

Parâmetro biológico ^a	YieldGard VT PRO™	PowerCore™	Isolinha não-Bt
T (dias)	41,96 ± 0,17 b	41,60 ± 0,15 b	39,98 ± 0,22 a
R ₀ (♀ / ♀)	621,16 ± 44,33 b	490,30 ± 56,50 c	854,16 ± 58,46 a
r _m (♀ / ♀*dias)	0,153 ± 0,003 b	0,146 ± 0,003 c	0,169 ± 0,002 a
λ	1,17 ± 0,002 b	1,16 ± 0,003 c	1,18 ± 0,002 a

^aValores representam a média ± EP.. T = duração de cada geração; R₀ = taxa líquida de reprodução; r_m = razão infinitesimal de aumento e λ = razão finita de aumento. Para cada parâmetro avaliado, valores seguidos pela mesma letra na linha não difere estatisticamente entre si pelo teste t bilateral.

2.3.3 Monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a Cry1A.105 e Cry2Ab2

Houve uma elevada variabilidade geográfica e temporal na suscetibilidade de populações de campo de *S. frugiperda* nas concentrações diagnósticas de 5.000 ng Cry1A.105/cm² (Tabela 6; Figura 3) e 100 µg Cry2Ab2/mL dieta (Tabela 7; Figura 4). Para Cry1A.105 houve baixa sobrevivência larval (< 7%) para as populações coletadas na 1^a e 2^a safra de 2011, 2012 e 1^a safra de 2013 (Tabela 6; Figura 3). Para essas safras, a maior sobrevivência larval foi constatada para uma população de *S. frugiperda* oriunda de São Desidério/BA (13%) (Tabela 6; Figura 3). No entanto, para as lagartas sobreviventes de todas as populações apresentaram inibição do desenvolvimento larval > 85% (Tabela 6). A partir da 2^a safra de 2013 e 1^a safra de 2014 houve uma diminuição na suscetibilidade de todas as populações de *S. frugiperda* a Cry1A.105 (Tabela 6; Figura 3), que foi constatada devido ao significativo aumento na sobrevivência larval que variou de 0,4 (população proveniente de Douradina, MS-11) a 41,5% (população proveniente de Cascavel, PR-52) (Tabela 6; Figura 3) e uma diminuição significativa na inibição do desenvolvimento larval de 63,7 (população proveniente de Não-me-Toque, RS) a 99,0 % (população proveniente de Sorriso, MT) (Tabela 6). Entretanto, na 2^a safra de 2014 constatou-se um aumento significativo na suscetibilidade a Cry1A.105 com significativo decréscimo da sobrevivência larval (inferior a 39 %) e um aumento significativo na redução do desenvolvimento larval (Tabela 6; Figura 3).

Para Cry2Ab2, todas as populações coletadas na 1^a e 2^a safra 2011, 2012, 2013 e 2014 apresentaram elevada variabilidade geográfica e temporal na sobrevivência e inibição do desenvolvimento larval, com uma significativa redução da sobrevivência larval ao longo do tempo (Tabela 7). Da mesma forma, em todas as populações avaliadas houve uma elevada inibição do desenvolvimento larval próximo a 100% (Tabela 7; Figura 4).

Tabela 6 - Sobrevivência e inibição do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 5000 ng de Cry1A.105/cm² de dieta

(continua)

População	Geração	% sobrevivência ^a	% inibição do desenvolvimento ^a
1ª safra 2011			
RS-8	F ₁	1,7 ± 0,5 b	99,0 ± 0,4 a
SP-6	F ₁	2,8 ± 0,8 b	98,2 ± 0,6 a
PR-23	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
PR-25	F ₁	0,4 ± 0,2 c	99,3 ± 0,3 a
GO-15	F ₁	0,2 ± 0,1 c	99,0 ± 0,4 a
BA-22	F ₁	0,1 ± 0,1 c	100,0 ± 0,0 a
MT-15	F ₁	4,3 ± 1,6 a	93,7 ± 2,6 b
2ª safra 2011			
MT-6	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
PR-27	F ₁	2,7 ± 1,1 a	88,4 ± 2,6 c
GO-16	F ₁	1,1 ± 0,5 ab	98,8 ± 0,7 a
MS-4	F ₁	0,5 ± 0,2 ab	93,6 ± 3,1 b
BAH-23	F ₁	0,9 ± 0,3 ab	94,7 ± 0,5 b
1ª safra 2012			
RS-9	F ₁	1,7 ± 0,7 b	99,3 ± 0,2 a
RS-10	F ₂	0,0 ± 0,0 b	100,0 ± 0,0 a
SP-11	F ₁	4,3 ± 0,9 a	97,5 ± 0,6 ab
SC-1	F ₂	0,0 ± 0,0 b	100,0 ± 0,0 a
PR-30	F ₁	0,0 ± 0,0 b	100,0 ± 0,0 a
PR-32	F ₁	0,4 ± 0,2 b	99,4 ± 0,3 a
GO-18	F ₁	1,0 ± 0,4 b	98,8 ± 0,4 ab
GO-20	F ₁	1,0 ± 0,5 b	99,5 ± 0,2 a
MG-14	F ₁	1,6 ± 0,5 b	99,8 ± 0,1 a
BA-26	F ₁	0,5 ± 0,3 b	99,6 ± 0,2 a
2ª safra 2012			
BA-29	F ₁	1,9 ± 0,6 b	98,3 ± 0,5 ab
MT-18	F ₁	0,2 ± 0,1 c	100,0 ± 0,0 a
MT-19	F ₁	4,0 ± 1,1 a	100,0 ± 0,0 a
MT-20	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
GO-23	F ₂	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
MS-12	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,00 a
MS-13	F ₂	0,2 ± 0,1 c	100,0 ± 0,0 a
SP-14	F ₂	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
PR-37	F ₂	0,5 ± 0,2 c	99,8 ± 0,1 a
PR-38	F ₂	0,2 ± 0,1 c	100,0 ± 0,0 a
PR-39	F ₁	2,4 ± 0,8 b	97,3 ± 1,0 b

Tabela 6 - Sobrevivência e inibição do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 5000 ng de Cry1A.105/cm² de dieta

(continuação)

População	Geração	% sobrevivência ^a	% inibição do desenvolvimento ^a
1ª safra 2013			
SUS	---	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
SP-15	F ₁	4,4 ± 0,2 b	97,5 ± 0,6 b
PR-41	F ₂	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
PR-43	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
BA-32	F ₁	13,3 ± 0,5 a	85,3 ± 2,1 c
GO-24	F ₂	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
GO-26	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
MG-16	F ₂	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
SC-2	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
RS-13	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
RS-14	F ₁	0,0 ± 0,0 c	100,0 ± 0,0 a
2ª safra 2013			
SUS	---	0,0 ± 0,0 f	100,0 ± 0,0 a
MT-23	F ₁	0,5 ± 0,1 f	99,0 ± 0,5 a
MT-25	F ₁	1,5 ± 0,1 f	98,6 ± 0,4 a
MS-16	F ₁	16,2 ± 0,4 c	92,0 ± 1,1 b
MS-17	F ₁ /F ₂	0,4 ± 0,3 f	98,9 ± 0,8 a
GO-28	F ₂	6,7 ± 0,5 e	71,5 ± 3,3 d
MT-26	F ₂	4,2 ± 0,4 e	73,2 ± 4,5 d
PR-46	F ₂	20,2 ± 0,3 b	66,7 ± 1,6 e
PR-48	F ₁	10,5 ± 0,2 d	70,7 ± 4,5 d
PR-49	F ₂	0,7 ± 0,1 f	98,9 ± 0,6 a
SP-16	F ₁	43,2 ± 0,3 a	88,1 ± 0,6 c
1ª safra 2014			
SUS	---	0,0 ± 0,0 e	100,0 ± 0,0 a
SP-17	F ₁	26,2 ± 0,6 c	80,6 ± 1,7 bc
MG-20	F ₁	43,3 ± 0,4 a	72,0 ± 1,4 d
RS-16	F ₁	46,8 ± 0,0 a	63,7 ± 2,3 e
PR-51	F ₁	43,4 ± 0,6 a	84,9 ± 1,4 bc
PR-52	F ₁	47,1 ± 0,5 a	78,1 ± 1,1 cd
SC-3	F ₁ /F ₂	47,5 ± 0,1 a	78,9 ± 0,9 cd
GO-30	F ₁ /F ₂	24,1 ± 0,2 c	91,1 ± 1,1 b
BA-34	F ₂	8,7 ± 0,2 d	83,3 ± 1,9 bc
GO-31	F ₁	38,4 ± 0,2 b	86,8 ± 1,0 b
2ª safra 2014			
SUS	---	0,0 ± 0,0 e	100,0 ± 0,0 a
MS-18	F ₂	2,7 ± 0,1 d	92,0 ± 2,0 b
MS-19	F ₁	17,6 ± 0,4 b	74,5 ± 3,5 d

Tabela 6 - Sobrevivência e inibição do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 5000 ng de Cry1A.105/cm² de dieta

(conclusão)

População	Geração	% sobrevivência ^a	% inibição do desenvolvimento ^a
2ª safra 2014			
PR-53	F ₁	13,6 ± 0,3 c	78,6 ± 2,8 d
PR-55	F ₁	18,5 ± 0,5 b	89,8 ± 1,2 bc
SP-54	F ₁	38,5 ± 0,6 a	87,5 ± 1,2 c
MT-18	F ₂	8,7 ± 0,2 cd	88,9 ± 0,8 c
MT-29	F ₁	3,4 ± 0,1 d	95,7 ± 1,2 b
MT-30	F ₁	16,5 ± 0,2 b	72,6 ± 2,4 d
SP-18	F ₁	0,0 ± 0,0 e	100,0 ± 0,0 a
GO-32	F ₁	8,6 ± 0,2 cd	88,9 ± 1,4 c

^aValores representam as médias ± EP. Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna e safra não diferem estatisticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Tabela 7 - Sobrevivência e inibição do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 100 µg de Cry2Ab2/mL de dieta

(continua)

População	Geração	% sobrevivência ^a	% inibição do desenvolvimento ^a
1ª safra 2011			
RS-8	F ₁	83,9 ± 1,5 a	84,8 ± 0,8 c
SP-6	F ₁	83,5 ± 2,0 a	73,9 ± 0,6 d
PR-23	F ₁	53,5 ± 2,0 c	93,6 ± 0,5 b
PR-25	F ₁	51,9 ± 2,6 c	94,3 ± 0,6 b
GO-15	F ₁	61,8 ± 3,7 b	91,8 ± 0,6 b
BA-22	F ₁	51,3 ± 2,8 c	93,1 ± 0,4 b
MT-15	F ₁	55,9 ± 2,8 c	98,8 ± 0,5 a
2ª safra 2011			
MT-16	F ₁	34,1 ± 3,3 b	96,9 ± 0,4 a
PR-27	F ₁	27,4 ± 2,1 c	95,8 ± 0,3 a
GO-16	F ₁	39,6 ± 6,6 ab	96,4 ± 0,7 a
MS-4	F ₁	41,1 ± 3,0 a	94,4 ± 0,5 a
BAH-23	F ₁	37,8 ± 2,8 ab	94,7 ± 0,5 a
1ª safra 2012			
RS-9	F ₁	36,7 ± 4,2 b	90,7 ± 1,6 c
RS-10	F ₂	7,9 ± 1,7 e	99,0 ± 0,3 a
SP-11	F ₁	19,3 ± 2,9 d	95,5 ± 1,5 b
SC-1	F ₂	27,1 ± 2,9 c	92,3 ± 0,9 c
PR-30	F ₁	28,1 ± 2,0 c	65,9 ± 2,9 e
PR-32	F ₁	20,9 ± 4,0 cd	98,1 ± 0,2 a
GO-18	F ₁	3,8 ± 1,1 f	96,5 ± 1,2 ab
GO-20	F ₁	48,1 ± 4,3 a	94,5 ± 0,9 bc

Tabela 7 - Sobrevivência e inibição do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 100 µg de Cry2Ab2/mL de dieta

(continuação)

População	Geração	% sobrevivência ^a	% inibição do desenvolvimento ^a
1ª safra 2012			
MG-14	F ₁	39,0 ± 1,7 b	85,7 ± 0,9 d
BA-26	F ₁	25,1 ± 3,8 c	85,4 ± 2,6 d
2ª safra 2012			
BA-29	F ₁	23,4 ± 3,4 b	96,2 ± 0,7 abc
MT-18	F ₁	23,8 ± 2,9 b	91,8 ± 1,0 d
MT-19	F ₁	0,0 ± 0,0 e	99,8 ± 0,1 a
MT-20	F ₁	22,8 ± 3,3 b	96,1 ± 0,9 abc
GO-23	F ₂	18,7 ± 2,2 b	95,6 ± 0,5 bcd
MS-12	F ₁	0,1 ± 0,1 e	98,3 ± 1,5 ab
MS-13	F ₂	8,9 ± 2,1 c	98,8 ± 0,2 ab
SP-14	F ₂	7,4 ± 1,6 c	98,6 ± 0,2 ab
PR-37	F ₂	27,1 ± 3,1 b	87,7 ± 1,1 d
PR-38	F ₂	4,3 ± 1,2 d	96,1 ± 1,1 abc
PR-39	F ₁	53,8 ± 4,1 a	94,2 ± 0,6 cd
1ª safra 2013			
SP-15	---	40,6 ± 0,7 a	82,7 ± 1,2 c
PR-41	F ₁	29,1 ± 0,7 b	94,3 ± 0,9 b
PR-43	F ₁	23,0 ± 0,5 b	93,2 ± 1,1 b
BA-32	F ₂	2,4 ± 0,2 d	97,6 ± 0,7 ab
GO-24	F ₁	0,8 ± 0,1 e	99,1 ± 0,5 a
GO-26	F ₂	13,4 ± 0,8 c	93,4 ± 1,3 b
MG-16	F ₂	2,6 ± 0,2 d	98,2 ± 0,6 a
SC-2	F ₁	0,5 ± 0,0 e	99,5 ± 0,2 a
RS-13	F ₁	15,4 ± 0,8 c	93,4 ± 1,3 b
RS-14	F ₁	26,9 ± 0,7 b	74,7 ± 2,3 d
2ª safra 2013			
SP-16	F ₁	26,4 ± 1,0 c	78,6 ± 3,6 c
MT-23	F ₁	12,6 ± 0,6 d	94,7 ± 1,1 ab
MT-25	F ₁	41,4 ± 0,8 b	67,8 ± 1,9 d
MT-26	F ₂	0,0 ± 0,0 f	100,0 ± 0,0 a
MS-16	F ₁	0,0 ± 0,0 f	100,0 ± 0,0 a
MS-17	F ₁	21,8 ± 0,6 c	81,5 ± 2,3 c
GO-28	F ₁ /F ₂	0,1 ± 0,1 f	100,0 ± 0,0 a
PR-46	F ₂	62,3 ± 0,8 a	57,6 ± 2,7 e
PR-48	F ₂	29,5 ± 0,9 c	91,0 ± 0,9 b
PR-49	F ₁	7,1 ± 0,4 e	94,3 ± 1,6 ab

Tabela 7 - Sobrevivência e inibição do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 100 µg de Cry2Ab2/mL de dieta

(conclusão)

População	Geração	% sobrevivência ^a	% inibição do desenvolvimento ^a
1ª safra 2014			
SP-17	F ₂	15,2 ± 0,4 a	94,0 ± 0,8 c
MG-20	F ₁	14,7 ± 0,7 a	96,5 ± 0,6 b
RS-16	F ₁	0,0 ± 0,0 e	100,0 ± 0,0 a
RS-17	F ₁	1,6 ± 0,41 d	99,4 ± 0,5 a
PR-51	F ₁	0,5 ± 0,1 e	99,7 ± 0,2 a
PR-52	F ₁	2,3 ± 0,2 c	98,2 ± 0,5 ab
SC-3	F ₁	4,9 ± 0,4 b	98,5 ± 0,4 ab
GO-30	F ₁	0,0 ± 0,0 e	100,0 ± 0,0 a
GO-31	F ₁ /F ₂	4,8 ± 0,8 b	98,0 ± 0,4 ab
BA-34	F ₁ /F ₂	1,1 ± 0,2 d	99,5 ± 0,3 a
2ª safra 2014			
MS-18	F ₁	5,8 ± 0,4 bc	98,5 ± 0,4 ab
MS-19	F ₂	3,8 ± 0,2 c	96,2 ± 0,9 b
PR-53	F ₂	0,4 ± 0,1 d	99,5 ± 0,4 a
PR-55	F ₂	0,2 ± 0,0 d	99,7 ± 0,2 a
PR-54	F ₁	6,4 ± 0,3 b	96,9 ± 0,7 b
MT-28	F ₁	1,0 ± 0,1 d	99,0 ± 0,4 a
MT-29	F ₁	13,6 ± 0,5 a	95,9 ± 0,6 b
MT-30	F ₁	0,0 ± 0,0 e	100,0 ± 0,0 a
SP-18	F ₁	0,6 ± 0,1 d	99,7 ± 0,2 a
GO-32	F ₁	0,0 ± 0,0 e	100,0 ± 0,0 a

^aValores representam as médias ± EP. Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna e safra não diferem estatisticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 3 - Sobrevivência larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 5000 ng de Cry1A.105/cm² de dieta

Figura 4 - Inibição do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* na concentração diagnóstica de 100 µg de Cry2Ab2/mL de dieta

2.4 Discussão

As proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F expressas em folhas de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ respectivamente, apresentaram elevada toxicidade para *S. frugiperda*. Contudo, quando neonatas e larvas de 2º instar de *S. frugiperda* foram expostas à alimentação inicialmente em estilos-estigmas e, posteriormente, em grãos desses eventos de milho Bt houve elevada sobrevivência larval. Isso se deve a menor expressão das proteínas inseticidas em estilo-estigmas e grãos quando comparado à expressão nas folhas de milho (CTNBIO, 2010; EPA, 2010; HUANG et al., 2011). Em estilo-estigmas e, posteriormente, em grãos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, 54 e 44% dos insetos completaram o ciclo biológico, respectivamente. No contexto de MRI, quando do ataque de *S. frugiperda* as espigas, dentre os insetos sobreviventes e que chegam à fase adulta haverá uma fração significativa de insetos de genótipo homozigoto suscetível. No entanto, em um processo de evolução da resistência também podem ocorrer os insetos de genótipos heterozigotos e resistentes. O ataque de *S. frugiperda* as espigas é relativamente baixo no campo ($\approx 10\%$), podendo variar com a época de cultivo e pressão populacional da praga (RODRÍGUEZ-DEL-BOSQUE, CANTÚ-ALMAGUER, REYES-MÉNDEZ, 2010).

Nessa situação, a elevada sobrevivência larval de *S. frugiperda* em estilo-estigmas e grãos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ se configura numa ameaça a sustentabilidade dos híbridos de milho, devido essas estruturas serem fonte de alimento para a multiplicação e dispersão da praga no campo. Essa constatação em associação com o sistema de produção de cultivos no Brasil, elevada polifagia e sobreposição de gerações da praga, possibilita a manutenção de altas populações e infestações da praga em qualquer época de cultivo e fase de desenvolvimento da cultura. A variação na concentração das proteínas expressas na planta pode alterar a resposta biológica da praga, permitindo a sobrevivência de alguns indivíduos suscetíveis, assim como genótipos heterozigotos e resistentes poderiam estar sobrevivendo nessa situação e dispersar alelos da resistência no campo, favorecendo a evolução da resistência. Diferentes níveis de expressão de proteína Bt foram observados em plantas de algodão Bt piramidado (Cry1Ac/Cry2A) com o desenvolvimento da cultura (BRÉVAULT et al., 2013). Esses autores verificaram que uma linhagem de *H. zea* resistentes a proteína Cry1Ac aumentou significativamente a sobrevivência larval após a alimentação em folhas de algodão Bt piramidado com o desenvolvimento da cultura, favorecendo a evolução da resistência da praga para a cultura (BRÉVAULT et al., 2013; CARRIÈRE; CROWDER; TABASHNIK, 2010).

No Brasil, a rápida evolução de resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa no milho HerculexTM (TC1507), associado com a elevada movimentação larval e polifagia da praga, podem favorecer a dispersão de alelos de resistência no campo, uma vez que insetos heterozigotos e resistentes à proteína Cry1F ao alimentar em estruturas como estilo-estigmas e grãos de milho das tecnologias YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM não serão mortos devido à baixa atividade biológica das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F expressas nessas estruturas, favorecendo a sobrevivência e multiplicações de insetos (suscetíveis, heterozigotos e resistentes), assim como, selecionando indivíduos resistentes que poderão favorecer a evolução da resistência às tecnologias YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM.

O risco de evolução da resistência aos híbridos YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM fica mais evidente devido às diferenças na variabilidade geográficas observadas na suscetibilidade da praga nas populações de *S. frugiperda* mediante bioensaios de aplicação superficial (Cry1A.105) e incorporação (Cry2Ab2) em dieta artificial. As diferenças significativas na suscetibilidade a Cry1A.105 observadas nas diferentes populações de *S. frugiperda* pode estar associado ao sistema de agricultura intensiva com o cultivo de milho TC1507 que expressa proteína Cry1F, chegando a uma adoção de $\approx 80\%$ da área cultivada com esta tecnologia durante as safras de 2012 e 2013 (CÉLERES, 2013), o que acarretou o surgimento de elevados níveis de resistência de populações de campo de *S. frugiperda* à proteína Cry1F, com sobrevivência larval superior a 50% (FARIAS et al., 2014b), podendo ser um do principal motivo para a diminuição significativa na suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* coletadas durante este período de tempo.

Este fato é reforçado devido à proteína Cry1A.105 apresentar ligações nos mesmos domínios da proteína Cry1F (FERRÉ; VAN RIE, 2002; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; US-EPA 2010). Desta forma, certo grau de resistência cruzada pode existir entre estas proteínas por causa das associações nas suas estruturas de genes, fazendo com que os insetos diminuam a suscetibilidade à proteína Cry1A.105 (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014). O risco de evolução da resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1A.105, fica mais evidente quando não foram observadas diferenças na suscetibilidade das mesmas populações mediante o critério de resposta de inibição do desenvolvimento larval em bioensaios de incorporação da proteína Cry2Ab2 em dieta artificial, onde todas as populações apresentaram uma tendência significativa no aumento da suscetibilidade à proteína Cry2Ab2 ao longo do tempo. Estes resultados reforçam ainda mais os princípios de resistência cruzada da proteína Cry1A.105 e Cry1F, uma vez que a proteína Cry2Ab2 apresenta estrutura que difere das proteínas Cry1 e, conseqüentemente, diferentes locais de

ligação e modos de ação no intestino médio dos insetos, ocasionando a mortalidade das lagartas (FERRÉ; VAN RIE, 2002; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014). A alta sobrevivência larval observada para a proteína Cry2Ab2 deve-se à baixa atividade biológica da proteína inseticida expressa no tecido liofilizado, remetendo em uma alta variabilidade natural na resposta nas diferentes populações de *S. frugiperda*, não caracterizando um processo de evolução da resistência da praga para esta proteína, uma vez com que as mesmas populações apresentaram elevada inibição do desenvolvimento larval. Devido à baixa atividade biológica da proteína Cry2Ab2, as tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ não atendem os princípios de piramidação de genes, uma vez que a proteína Cry2Ab2 não apresenta capacidade de causar elevada mortalidade de *S. frugiperda* quando avaliada isoladamente.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram uma série ameaça de risco de evolução da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™. Contudo, há necessidade de considerar os diferentes regimes de seleção aos quais os insetos serão expostos devido à diversidade de cultivos com plantas Bt e o sistema de produção de cultivos em cada região do Brasil para direcionar e tornar mais efetivas as estratégias de MRI. Assim, o contínuo monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a Cry1A.105 e Cry2Ab2 é fundamental para preservar a vida útil dessas proteínas para o controle desse inseto-praga.

2.5 Conclusões

- A atividade biológica das tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ sobre *S. frugiperda* é alta em folhas e baixa em estilo-estigmas e grãos em condições de laboratório.
- Há perda de suscetibilidade de algumas populações de *S. frugiperda* à proteína Cry1A.105, porém não para Cry2Ab2, no decorrer das safras agrícolas de 2011 a 2014.

Referências

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, n. 1, p. 265-267, 1925.
- ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. The F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 572-578, 1998.
- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G.; YOUNG, S.Y. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 1, p. 164-175, 2006.
- BRÉVAULT, T.; S. HEUBERGER, M.; ZHANG, C. ; ELLERS-KIRK, X. ; NI, L.; MASSON, X.; LI, B. ;TABASHNIK.; CARRIÈRE, Y. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington , v. 110, n. 15, p. 5806-5811, 2013.
- BURKNESS, E.C.; DIVELY, G.; PATTON, T.; MOREY, A.C.; HUTCHISON, W.D. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management. **GM Crops**, Ithaca, v. 1, p. 337-343, 2010.
- CARRIÈRE, Y.; CROWDER, D.W.; TABASHNIK, B.E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, New York, v. 3, n. 5, p. 561-573, 2010.
- CÉLERES. **Relatório de biotecnologia**. In: Boletim Técnico, 5 agosto 2013. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/post.php?p=179&lang=pt>>. Acesso em: 9 Nov. 2014.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa - Embrapa Milho e Sorgo, 1995. 45p. (Circular Técnica, 21).
- CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberção Comercial de Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos e Tolerante a herbicidas, MON 89034xTC1507xNK603**. In: Parecer Técnico nº 2753/2010. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15833.html>>. Acesso em: 22 Nov. 2014.
- EPA. US Environmental Protection Agency, Biopesticide Registration Action Document. **Bacillus thuringiensis Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in corn [PC Codes 006515 (Cry2Ab2), 006514 (Cry1A.105)]**, 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/mon-89034-brad.pdf>>. Acesso em: 20 Nov. 2014.
- FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford , v. 64, n. 2, p. 150-158, 2014a.

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

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

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

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

HUANG, F.; GUIMIRE, 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**, Sussex, v. 67, n. 10, p. 1269-1276, 2011.

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

IVES, A.R.; GLAUM, P.R.; ZIEBARTH, N.L.; ANDOW, D.A. The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. **Ecological Applications**, Tempe, v. 21, n. 2, p. 503-15, 2011.

KASTEN Jr, P.; PRECETI, A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, n. 1/2, p. 68-78, 1978.

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

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

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

NIU, Y.; MEAGHER JR, R.L.; YANG, F.; HUANG, F. Susceptibility of Field Populations of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to Purified Cry1f Protein and Corn Leaf Tissue Containing Single and Pyramided Bt Genes. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 96, n. 3, p. 701-713, 2013.

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

RODRÍGUEZ-DEL-BOSQUE, L.A.; CANTÚ-ALMAGUER, M.A.; REYES-MÉNDEZ, C.A. Effect of planting date and hybrid selection on *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) damage on maize ears in Northeastern México. **Southwestern Entomologist**, Coit Road, v. 35, n. 2, p. 157-164, 2010.

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

SAS INSTITUTE INC. **Statistical analysis system: getting started with the SAS learning**. SAS Institute, Cary, NC. 2000.

SIEBERT, M.W.; NOLTING, S.P.; HENDRIX, W.; DHAVALA, S. CRAIG, C.; LEONARD, B.R.; STEWART, S.D.; ALL, J.; MUSSER, F.R.; BUNTIN, G.D.; SAMUEL, L. Evaluation of corn hybrids expressing Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry34Ab1/Cry35Ab1, and Cry3Bb1 against southern United States insect pests. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 5, n. 2, p. 1825-1834, 2012.

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

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

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

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

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

ANEXOS

ANEXO A - Concentração-mortalidade de neonatas de *S. frugiperda* exposta a proteína Cry1A.105 purificada de *B. thuringiensis* incorporada ou aplicada superficialmente em dieta artificial

População	G ⁽¹⁾	n	Coefficiente Angular ($\pm$ EP)	CL ₅₀ (IC 95%) ⁽²⁾	CL ₉₀ (IC 95%) ⁽²⁾	χ^2 ⁽³⁾	d.f. ⁽⁴⁾
Bioensaio de incorporação da proteína ($\mu\text{g/mL}$)							
PR-16	F ₁	1408	1,06 $\pm$ 0,22	10,04 (2,66 - 25,51)	158,75 (53,34 - 262,02)	13,88	7
MG-6	F ₃	1118	1,18 $\pm$ 0,08	3,56 (2,72 - 4,54)	43,77 (32,40 - 63,00)	6,31	8
GO-11	F ₁	1104	1,33 $\pm$ 0,10	7,29 (3,61 - 11,79)	66,67 (38,93 - 161,02)	19,72	6
RS-5	F ₂	1024	1,25 $\pm$ 0,09	1,62 (1,20 - 2,10)	17,04 (12,65 - 24,44)	3,05	7
BA-12	F ₂	864	1,57 $\pm$ 0,15	21,36 (16,38 - 26,84)	139,19 (102,35 - 211,00)	6,31	5
MT-8	F ₁	1696	2,65 $\pm$ 0,17	11,51 (10,27 - 12,85)	35,03 (29,90 - 42,59)	11,88	7
PR-19	F ₁	768	1,29 $\pm$ 0,13	49,45 (38,17 - 66,19)	478,78 (280,19 - 609,50)	1,98	5
MT-10	F ₁	1008	1,08 $\pm$ 0,12	81,87 (60,63 - 121,88)	*	9,84	6
MS-1	F ₁	1021	1,20 $\pm$ 0,24	10,41 (3,57 - 18,53)	119,75 (55,89 - 884,00)	16,35	6
BA-16	F ₁	1104	0,95 $\pm$ 0,13	7,80 (2,96 - 16,32)	164,50 (64,02 - 205,02)	12,11	6
Bioensaio de aplicação superficial (ng/cm^2)							
PR-16	F ₂	720	1,66 $\pm$ 0,15	22,99 (18,11 - 28,77)	135,02 (96,35 - 216,20)	4,08	4
BA-16	F ₂	896	0,97 $\pm$ 0,08	23,12 (16,44 - 31,79)	475,53 (284,51 - 961,38)	4,40	4
MT-10	F ₄	1040	1,70 $\pm$ 0,14	89,42 (66,36 - 115,53)	504,90 (362,07 - 803,34)	11,26	6

⁽¹⁾Geração da população; ⁽²⁾CL₅₀: concentração letal de Cry1A.105 ($\mu\text{g/mL}$ ou ng/cm^2 de dieta) que mata 50% das lagartas testadas no período de observação de 7 dias. Similarmente, CL₉₀ é a concentração de Cry1A.105 requerida para matar 90% das lagartas testadas; ⁽³⁾Valores de qui-quadrado. ⁽⁴⁾Graus de liberdade.; *dados não anotados devido a baixa resposta na mortalidade.

ANEXO B - Concentração efetiva (CE) que inibe o desenvolvimento de neonatas de *S. frugiperda* expostas a proteína Cry1A.105 purificada de *B. thuringiensis* incorporada ou aplicada superficialmente em dieta artificial

População	G ⁽¹⁾	n	CE ₅₀ (IC 95%) ⁽²⁾	CE ₉₀ (IC 95%) ⁽²⁾
Bioensaio de incorporação da proteína ($\mu\text{g/mL}$)				
PR-16	F ₁	857	3,04 (2,26 - 4,05)	28,83 (17,32 - 53,32)
MG-6	F ₃	573	0,25 (0,14 - 0,41)	15,45 (6,43 - 51,31)
GO-11	F ₁	812	1,16 (0,77 - 1,80)	32,03 (14,39 - 89,47)
RS-5	F ₂	471	0,54 (0,44 - 0,67)	15,07 (9,40 - 26,67)
BA-12	F ₂	862	0,41 (0,39 - 0,44)	11,60 (10,40 - 12,96)
MT-8	F ₁	1051	0,28 (0,18 - 0,42)	30,81 (15,63 - 70,15)
PR-19	F ₁	825	1,59 (0,88 - 2,90)	59,87 (23,92 - 194,27)
MT-10	F ₁	993	1,65 (0,71 - 3,12)	37,78 (13,39 - 193,86)
MS-1	F ₁	665	0,96 (0,87 - 1,06)	21,45 (17,96 - 25,87)
BA-16	F ₁	862	0,40 (0,19 - 0,83)	32,25 (8,96 - 214,33)
Bioensaio de aplicação superficial (ng/cm^2)				
PR-16	F ₂	285	1,36 (0,08 - 3,59)	122,76 (68,6 - 377,5)
BA-16	F ₂	430	1,54 (0,86 - 2,33)	42,78 (19,13 - 136,58)
MT-10	F ₄	554	32,41 (23,25 - 45,66)	177,75 (61,05 - 321,90)

⁽¹⁾Geração da população; ⁽²⁾CE₅₀: concentração efetiva de Cry1A.105 ($\mu\text{g/mL}$ ou ng/cm^2 de dieta) que causa 50% de inibição de desenvolvimento larval no período de observação de 7 dias. Similarmente, CE₉₀ é a concentração efetiva de Cry1A.105 requerida para inibir 90% do desenvolvimento larval;

ANEXO C - Concentração efetiva (CE) que inibe o desenvolvimento de neonatas de *S. frugiperda* expostas a proteína Cry2Ab2 de *B. thuringiensis* incorporada em dieta artificial

População	G ⁽¹⁾	N	CE ₅₀ (IC 95%) ⁽²⁾	CE ₉₀ (IC 95%) ⁽²⁾
PR-16	F ₁	1471	2,34 (1,95 - 2,80)	169,89 (125,34 - 235,79)
MG-6	F ₁	658	4,28 (2,72 - 6,63)	108,00 (55,25 - 241,26)
GO-11	F ₁	875	3,93 (2,41 - 6,44)	40,83 (16,99 - 119,51)
RS-5	F ₁	1038	4,35 (2,25 - 8,33)	176,86 (67,40 - 421,02)
BA-12	F ₁	1804	5,18 (3,83 - 6,93)	111,49 (68,33 - 195,11)
MT-8	F ₄	1108	3,42 (1,95 - 5,86)	80,71 (20,41 - 161,24)
PR-19	F ₁	970	4,28 (2,19 - 8,34)	171,72 (64,25 - 318,93)
MT-10	F ₂	1209	3,93 (2,08 - 7,25)	195,59 (79,89 - 318,00)
MS-1	F ₁	1003	3,67 (1,75 - 5,86)	69,73 (23,96 - 276,24)
BA-16	F ₁	1053	3,98 (1,92 - 6,04)	72,31 (31,98 - 194,78)

⁽¹⁾Geração da população; ⁽²⁾CE₅₀: concentração efetiva de Cry2Ab2 (µg/mL de dieta) que causa 50% de inibição de desenvolvimento larval no período de observação de 7 dias. Similarmente, CE₉₀ é a concentração efetiva de Cry2Ab2 requerida para inibir 90% do desenvolvimento larval.

3 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ÀS TECNOLOGIAS DE MILHO YIELDGARD VT PRO™ E POWERCORE™

Resumo

A técnica de “F₂ screen” foi utilizada para a caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) ao milho YieldGard VT PRO™ (VT PRO) e PowerCore™ (PW) que expressam, respectivamente, as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Foram testadas 552 isofamílias a partir de populações de *S. frugiperda* coletadas na safra de 2012. Verificou-se uma alta variabilidade na frequência fenotípica de isofamílias resistentes ao milho VT PRO e PW, sendo que as maiores frequências foram observadas em populações coletadas na região Central do Brasil, com estimativas de até 41% e 19% das isofamílias positivas para VT PRO e PW respectivamente. Com a técnica de “F₂ screen” foi possível selecionar linhagens resistentes ao milho VT PRO e PW, denominadas de RR-2 e RR-3 respectivamente. Tanto a linhagem RR-2 quanto a RR-3 que foram criadas por 18 gerações consecutivas nos respectivos eventos de milho Bt e apresentaram razões de resistência superiores a 3300, 2700 e ≈ 10 vezes a Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2, respectivamente. As linhagens RR-2 e RR-3 apresentaram a capacidade de sobreviver e completar o ciclo biológico em milho VT PRO e PW respectivamente, deixando descendentes férteis. Cruzamentos recíprocos das linhagens RR-2 e RR-3 com uma linhagem suscetível de referência revelaram que o padrão da herança da resistência é autossômica recessiva. A recessividade genética da resistência também foi confirmada pela mortalidade completa de indivíduos heterozigotos (descendentes provenientes dos cruzamentos entre as linhagens RR-2 ou RR-3 com a linhagem suscetível) em tecidos de milho VT PRO e PW, demonstrando que esses eventos atendem ao conceito de alta dose para o MRI. Em retrocruzamentos da progênie F₁ dos cruzamentos recíprocos com as linhagens resistentes confirmou-se a hipótese de que a resistência é poligênica. Neste estudo fornecemos a primeira evidência do potencial de evolução da resistência de *S. frugiperda* a eventos de milho Bt piramidados no Brasil.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*; Milho piramidado; F₂ screen; Manejo da Resistência de Insetos.

Abstract

The F₂ screen technique was used to characterize the resistance of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) to YieldGard VT Pro™ (VT PRO) and PowerCore™ (PW) corn technologies expressing Cry1A.105/Cry2Ab2 and Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner respectively. A total of 552 isofamilies were tested from *S. frugiperda* populations sampled in 2012 growing season. High variability in the frequency of resistant phenotypic isofamilies to VT PRO and PW corn was obtained with higher frequencies in populations samples from Midwest region of Brazil, estimates up to 41% and 19% of positive isofamilies to VT PRO and PW respectively. Resistant populations to VT PRO and PW corn were selected by using F₂ screen which were designated as RR-2 and RR-3 strains, respectively. Both RR-2 and RR-3 strains reared on respective Bt maize events for 18 consecutive generations showed resistance ratios greater than 3,300; 2,700 and ≈ 10 -fold to Cry1A.105, Cry1F and Cry2Ab2, respectively. Both RR-2 and RR-3 strains

were able to survive and complete the biological cycle in VT PRO and PW corn technologies by producing viable offspring. Reciprocal crosses of RR-2 and RR-3 strains with a susceptible reference strain revealed that the inheritance of resistance is autosomal recessive. The genetic recessiveness of the resistance was also confirmed by the complete mortality of heterozygous individuals (offspring from the crosses between RR-2 or RR-3 strains with susceptible strain) on VT P PRO and PW corn leaf tissues, indicating that these events meet the concept of high-dose for IRM strategies. Backcrosses of F1 progenies with both resistant strains revealed that resistance is polygenic. There was no fitness cost associated with resistance in heterozygous and resistant individuals when were reared on non-Bt corn. In this study, we reported the first evidence of the potential of *S. frugiperda* to evolve resistance to pyramided Bt corn events in Brazil.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Pyramided corn; F₂ screen; Insect Resistance Management

3.1 Introdução

A evolução da resistência é o resultado da constante pressão de seleção que, consequentemente, pode ocasionar mudanças na composição genética das populações de insetos aumentando a frequência relativa de alguns indivíduos “pré-adaptados” (CROW, 1957; TABASHNIK 1994). A resistência é definida como o desenvolvimento de uma habilidade herdada de um organismo de tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria dos indivíduos da espécie (CROFT; VAN DE BANN, 1988), no entanto, ainda existem várias divergências para definir a resistência a campo (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). No caso de plantas Bt, significa dizer que um indivíduo pode crescer e se desenvolver se alimentando apenas da planta Bt, e em seguida, acasalar e produzir descendentes viáveis (ANDOW, 2008), acarretando em falhas de controle da praga-alvo no campo (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011a).

No contexto do Manejo da Resistência de Insetos (MRI), um dos principais desafios à sustentabilidade da tecnologia de plantas Bt é manejar a resistência de forma eficiente e evitar ou retardar falhas de controle no campo (GOULD, 1998; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Para o MRI a plantas Bt, uma das principais estratégias tem sido a piramidação de genes, ou seja, a expressão de duas ou mais proteínas com elevada ação inseticida contra a mesma praga-alvo (TABASHNIK et al., 2009; IVES et al., 2011; STORER et al., 2012). No entanto, uma planta Bt piramidada não reflete necessariamente as proteínas de alta dose (ANDOW, 2008; BRÉVAULT et al., 2013). A premissa básica dessa estratégia é que as proteínas de Bt expressas nas plantas devem apresentar níveis elevados de expressão, cuja quantidade deve ser suficientemente alta para causar a recessividade funcional nos indivíduos heterozigotos (TAYLOR; GEORGHIOU, 1979; GOULD, 1998), fazendo com

que o acasalamento dos possíveis indivíduos resistentes sobreviventes da área Bt com os indivíduos suscetíveis da área de refúgio produzam progênes suscetíveis (GOULD, 1998; TABASHNIK et al., 2004). Além disso, as proteínas de Bt piramidadas devem compartilhar sítios de ligações distintos, uma vez que perdem efetividade na presença de resistência cruzada (TABASHNIK et al., 2009; DOWNES et al., 2010; BRÉVAULT et al., 2013; HUANG et al., 2014b). Contudo, essa estratégia somente é eficiente quando associada com o cultivo de áreas de refúgio (milho não-Bt) (GOULD, 1998; SHELTON et al., 2000; HUANG et al., 2011; TABASHNIK et al., 2013), a resistência deve ser de caráter recessivo (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977) e a frequência inicial de alelos da resistência deve ser baixa (ROUSH, 1994).

O conhecimento de fatores genéticos que afetam a evolução da resistência, como, frequência inicial de alelos, padrão da herança da resistência, grau de dominância e o número de alelos associado à evolução da resistência são de suma importância para avaliar o risco de evolução de resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977) e elaborar estratégias eficientes de manejo da resistência de insetos (TABASHNIK; CROFT, 1982).

No início da evolução da resistência a frequência inicial de indivíduos resistentes é considerada baixa (10^{-3}) e a estimativa desta frequência é uma das importantes etapas para avaliar a evolução da resistência a campo (IVES; ANDOW, 2002). Este fato torna-se ainda mais importante quando são observadas reduções significativas na suscetibilidade da praga ao longo do tempo as proteínas de Bt (Capítulo 2). Uma maneira para detectar alelos recessivos em baixa frequência é pela técnica do F₂ Screen (ANDOW; ALSTAD, 1998). Esta técnica a manutenção da variabilidade genética e, por um processo de endogamia na geração F₁, é possível detectar genótipos resistentes raros na geração F₂ (ANDOW; IVES, 2002). Além disso, possibilita selecionar e estabelecer, em laboratório, linhagens de insetos homozigotos resistentes o que possibilita testar pressupostos para a adoção das estratégias de MRI, os quais são difíceis de ser validados se não caracterizados com as linhagens resistentes em laboratório (PEREIRA; STORER; SIEGFRIED, 2008). Além disso, permite avaliar o padrão da herança genética para verificar a taxa de aumento de alelos que conferem a resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977), assim como, permite determinar bioquímica e fisiologicamente as bases genéticas da resistência, desenvolver diagnósticos moleculares (MORIN et al., 2004) e verificar se os indivíduos resistentes compartilham o mesmo locus com outras pragas-alvo de controle de culturas Bt (FABRICK et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

A resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F foi recentemente documentada no Brasil (FARIAS et al., 2014a). Uma das estratégias de manejo da resistência para preservar a vida útil das tecnologias Bt tem sido a exploração de eventos piramidados, ou seja, eventos que expressam mais de uma proteína Bt com diferentes mecanismos de ação para as pragas-alvo. No caso da cultura de milho, vários eventos que expressam mais de uma proteína Bt já foram aprovados para uso comercial no Brasil, destacando-se às tecnologias YieldGard VT PROTM e PowercoreTM que expressam as proteínas inseticidas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F respectivamente (CTNBIO, 2010).

Devido à constatação na variabilidade da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* às proteínas inseticidas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (Capítulo 2), o objetivo deste estudo foi estimar a frequência fenotípica de isofamílias resistentes às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM a partir da técnica do F₂ screen, assim como, selecionar linhagens de insetos resistentes em laboratório para caracterizar e estudar o padrão da herança da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM para avaliar o risco de evolução da resistência da *S. frugiperda* a estas tecnologias.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Frequência fenotípica de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM

3.2.1.1 Populações de insetos

A frequência fenotípica da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM foi estimada em 11 populações de *S. frugiperda*, através do método de F₂ screen proposta por ANDOW; ALSTAD (1998). As populações foram coletadas durante a 1^a safra de 2012 em áreas de cultivo de milho não-Bt, com exceção da população BA27, que foi coletada em área de produção de milho Cry1F (Tabela 8; Figura 5). Em laboratório, as lagartas foram mantidas até a fase de pupa em dieta artificial (KASTEN JR; PRECETI; PARRA, 1978).

Tabela 8 - Identificação, localização (cidade e estado) e data de coleta de populações *S. frugiperda* para estudos do F₂ Screen

Identificação	Localização	Milho ^a	Mês, Ano
BA-27	São Desidério/BA	Bt	Janeiro, 2012
PR-34	Sabáudia/PR	Não-Bt	Fevereiro, 2012
GO-22	Montividiu/GO	Não-Bt	Março, 2012
MS-11	São Gabriel do Oeste/MS	Não-Bt	Março, 2012
MT-19	Sinop/MT	Não-Bt	Abril, 2012
MT-20	Campo Novo dos Parecis/MT	Não-Bt	Abril, 2012
GO-23	Caiapônia/GO	Não-Bt	Maió, 2012
MS-12	Chapadão do Sul/MS	Não-Bt	Maió, 2012
MS-13	Dourados/MS	Não-Bt	Maió, 2012
PR-37	Sabáudia/PR	Não-Bt	Maió, 2012
PR-38	Campo Mourão/PR	Não-Bt	Maió, 2012
BA-31	Luís Eduardo Magalhães/BA	Não-Bt	Junho, 2012

^aHospedeiro de coleta das lagartas

Figura 5 - Distribuição das populações de *S. frugiperda* utilizadas nos bioensaios de F₂ screen

3.2.1.2 Estabelecimento das isolinhas

Em laboratório, as pupas foram sexadas e individualizadas em copos plásticos (50 mL) invertidos sobre papel filtro umedecido, onde permaneceram até a emergência dos adultos. À medida que os adultos emergiram, os casais foram separados em copos plásticos transparentes (500 mL) (gaiolas), os quais foram colocadas invertidos sobre um prato plástico (15 cm de

diâmetro) para a constituição das isofamílias (1 casal por copo). O alimento dos adultos foi fornecido por meio de algodão hidrófilo embebido em mel a 10%. A cada dois dias foram retiradas as posturas e o mel foi substituído. Após a eclosão, as neonatas (< 24 h de idade) foram transferidas para copos plásticos (100 ml) contendo 20 mL de dieta artificial, onde permaneceram até o segundo ínstar larval. Posteriormente, as lagartas foram separadas em copos plásticos (100 mL) contendo 30 mL de dieta (5 lagartas/copo), em um total de 120 lagartas por isofamília, onde permaneceram até a fase de pupa. Após a pupação, todas as pupas de cada isofamília foram retiradas e acondicionadas em gaiolas de PVC (20 cm de altura × 10 cm de diâmetro) (1 isofamília por gaiola), revestidas internamente com papel jornal. As gaiolas foram acondicionadas sobre pratos plásticos (15 cm de diâmetro), contendo um disco de papel jornal. A cada três dias as posturas foram retiradas das gaiolas e acondicionadas em copos plásticos (100 mL) com um papel filtro umedecido com água destilada. As lagartas eclodidas das posturas dos adultos da geração F₁ representaram a geração F₂, as quais foram usadas para determinar a frequência fenotípica da resistência às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM.

3.2.1.3 Bioensaio com folhas de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM

Inicialmente, o milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM e respectivas isolinhas não-Bt foram semeadas a campo na densidade de 5 plantas/m e espaçamento entre linhas de 0,60 m. Para os bioensaios foram retiradas folhas de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM da região do cartucho nos estádios fenológicos V₄-V₈ e, em laboratório, foram cortadas em pedaços de 4 cm² e acondicionados sobre uma mistura não geleificada de ágar-água a 2,5% em placas de acrílico (1,0 cm de altura × 9,0 cm de diâmetro), seguindo a metodologia proposta por HUANG et al. (2011). Posteriormente, cada placa foi infestada com 20 neonatas (< 24 h de idade) da geração F₂ (120 neonatas/isofamília). Após a infestação, as placas foram vedadas com filme plástico (MagipackTM) e acondicionadas em câmara climatizada a 27 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase 14 h. A cada 2 dias avaliou-se a sobrevivência larval, quando também se substituiu o tecido vegetal. Foi considerada isofamília resistente somente aquela cujas lagartas da geração F₂ sobreviveram nas tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, durante todo o ciclo biológico. A partir disso foi calculada a porcentagem e a frequência fenotípica de isofamílias positivas de indivíduos resistentes para cada híbrido de milho.

3.2.2 Seleção e manutenção das linhagens resistentes de *S. frugiperda* em laboratório

Pelo método de F₂ screen (descrito anteriormente) foi possível selecionar uma linhagem resistente as tecnologias de milho YieldGard VT PROTM (Linhagem RR-2) e ao PowerCoreTM (Linhagem RR-3). Durante 18 gerações, nos instares larvais as linhagens RR-2 e RR-3 foram criadas em folhas de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, respectivamente, as quais foram acondicionadas em placas de bioensaio com 16 células (5,5 cm de comprimento x 4,0 cm de profundidade x 3,0 cm de altura por poço) [(Advento do Brasil, São Paulo, Brasil)]. Em cada célula, seções de folha de milho YieldGard VT PROTM ou PowerCoreTM foram depositadas sobre uma camada não-geleificada de ágar-água a 2,5%. Em seguida, cada célula foi infestada com 6 neonatas. Após 6 dias, as lagartas sobreviventes foram transferidas para copos de 50 mL (duas lagartas/copo), contendo dieta artificial (KASTEN JR; PRECETTI; PARRA, 1978), onde permaneceram até a fase de pupa. Após a pupação, as pupas foram retiradas e acondicionadas em gaiolas cilíndricas de PVC (24 cm altura x 14,5 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior com tecido tipo “voil” até a emergência dos adultos. Em cada gaiola foram mantidos ~ 30 casais. O alimento dos adultos foi constituído de algodão saturado com solução aquosa de mel a 10%. As gaiolas foram mantidas a 25 ± 1°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotofase de 14h. A cada 2 dias os ovos foram coletados e acondicionados em recipientes plásticos (100 mL) contendo papel filtro umedecido com água destilada e incubados em câmara climatizada. Esse procedimento foi realizado por 18 gerações consecutivas, quando se realizou os estudos de caracterização da resistência as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F.

3.2.3 Padrão da herança da resistência de *S. frugiperda* a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F

Para a caracterização do padrão da herança da resistência de *S. frugiperda* às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, as linhagens resistentes RR-2, RR-3, suscetível SUS, e heterozigóticas SUS ♂ × RR-2 ♀, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀, SUS ♀ × RR-3 ♂ foram submetidas a bioensaios de concentrações-respostas com tratamento superficial em dieta artificial com as toxinas purificadas Cry1A.105 (Monsanto do Brasil Ltda, com 1,000 µg/mL e 80% de pureza), Cry2Ab2 (Monsanto do Brasil Ltda, com 0,36 µg/mL e 87 % de pureza) e Cry1F (Dow AgroSciences, com 35% de pureza). A linhagem SUS consistiu de uma população mantida em laboratório por mais de 10 anos, livres de pressão de seleção com inseticidas ou proteínas de Bt. Para obtenção das linhagens heterozigóticas (SUS ♂ × RR-2 ♀, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀, SUS ♀ × RR-3 ♂), pupas das linhagens SUS, RR-2 e

RR-3 foram sexadas e individualizadas em copos plásticos (25 mL). À medida que os adultos emergiram, cruzamentos recíprocos foram realizados em gaiolas cilíndricas de PVC (20 cm de altura × 15 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior com placas de Petri, num total de 20 casais por gaiola.

Para realização dos bioensaios, a dieta artificial foi vertida em bandejas (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), contendo 128 células (1 mL/célula). Posteriormente, diferentes concentrações das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 ou Cry1F foram diluídas em solução tampão (25 mM de CAPS, 1 mM de benzimidine H-Cl, 0,1 mM de EDTA; 0,2 mM de DTT a pH ~10,3; 50 mM de CAPS, 2 mM de DTT a pH ~11 e 10 mM de fosfato de potássio dibásico, respectivamente). O tratamento controle foi constituído apenas de dieta artificial. Ao volume final de cada concentração foi adicionado 0,1% do surfactante Triton X-100, para obter espalhamento uniforme da solução sobre a superfície da dieta. Para cada linhagem de *S. frugiperda* foram realizados bioensaios distintos, sendo testadas de 5-8 concentrações de Cry1A.105, Cry2Ab2 ou Cry1F, aplicadas na superfície da dieta por uma pipeta de repetição (30 µL por célula). A área da superfície da dieta considerada em cada célula foi de 1,878 cm². Após o período de secagem, com auxílio de um pincel fino foi infestada uma neonata de *S. frugiperda* por célula. Após a infestação, as bandejas foram vedadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO-CV-16, CD International Inc.) que permite as trocas gasosas com o ambiente externo e acondicionadas em câmara climatizada a 27 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase 14 h.

A mortalidade e o peso das lagartas sobreviventes foram avaliados após sete dias. As lagartas sobreviventes que não ultrapassaram o 1º instar larval também foram consideradas mortas. Para estimativa das CL₅₀ (CL – Concentração Letal) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%), os dados de concentração-mortalidade de cada linhagem foram submetidos à análise de Probit (PROC PROBIT, SAS INSTITUTE, 2000). A razão da resistência foi estimada pela divisão da CL₅₀ das linhagens resistentes RR-2, RR-3 e heterozigóticas pela CL₅₀ da linhagem SUS (ROBERTSON; PREISLER, 2007). Para estimativa das CE₅₀ (CE – Concentração Efetiva) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%), o peso das lagartas sobreviventes em cada concentração foi submetido à uma análise de regressão não-linear no software JMP (SAS INSTITUTE, 2012). O modelo logístico não-linear utilizado para o cálculo de CE₅₀ (SIMS et al., 1996) foi:

$$Weight = Wo/[1 + (dose/EC_{50})^b]$$

Para a estimativa da razão de resistência a partir da concentração efetiva dividiu-se a CE_{50} das linhagens resistentes RR-2, RR-3 e heterozigóticas pela CE_{50} da linhagem SUS, de acordo com ROBERTSON; PREISLER (2007).

3.2.3.1 Dominância da resistência

A partir da porcentagem de mortalidade das lagartas dos cruzamentos recíprocos SUS ♂ × RR-2 ♀, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀, SUS ♀ × RR-3 ♂ em cada concentração-resposta das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F foi estimado o grau de dominância da resistência seguindo procedimento proposto por BOURGUET; GENISSEL; RAYMOND (2000):

$$D = \frac{M_{RS} - M_{SS}}{M_{RR} - M_{SS}}$$

Sendo, M_{RR} , M_{SS} e M_{RS} , as mortalidades das linhagens resistente, suscetível e heterozigoto, respectivamente, nas concentrações avaliadas. Valor de D próximos a 0 ($D = 0$) foi admitido como herança completamente recessiva, valores próximos a 1 ($D = 1$) foi considerada como uma resistência completamente dominante e próximos a 0,5 ($D = 0.5$) a resistência é caracterizada como co-dominante ou aditiva (BOURGUET; GENISSEL; RAYMOND, 2000).

3.2.3.2 Número de genes associados à resistência de *S. frugiperda* a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F

Nesse estudo foram realizados retrocruzamentos das linhagens F_1 (SUS ♂ × RR-2 ♀, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀, SUS-♀ × RR-3 ♂) com os parentais fenotipicamente mais distantes (RR-2 ou RR-3), respectivamente, seguindo metodologia proposta por ROUSH; DALY (1990). Após a obtenção dos descendentes, bioensaios distintos foram conduzidos com as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, aplicadas em diferentes concentrações na superfície da dieta artificial, conforme procedimento descrito acima. A possibilidade da herança ser monogênica foi avaliada mediante teste de Qui-quadrado (χ^2), comparando-se a mortalidade observada e esperada da progênie dos retrocruzamentos em diferentes concentrações de cada proteína inseticida, conforme o modelo proposto por SOKAL (1995):

$$\chi^2 = \frac{(Ni - pni)^2}{pqni}$$

Sendo: N_i mortalidade observada na concentração i , p a mortalidade esperada calculada a partir do modelo Mendeliano (GEORGHIOU, 1969), n_i número de indivíduos testados e $q = 1 - p$.

$$p = \frac{a+b}{2}$$

A hipótese da herança da resistência ser monogênica foi rejeitada quando o χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelada a 1 grau de liberdade.

3.2.4 Caracterização da resistência às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM

Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas plantas de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM e isolinha não-Bt, as quais foram cultivadas em casa de vegetação em vaso plástico (1 planta/vaso) de 4L contendo terra e substrato vegetal na proporção de 1:1. No estágio fenológico V₄ todas as plantas foram infestadas com uma neonata (< 24 h de idade) de *S. frugiperda* proveniente das linhagens resistentes (RR-2 e RR-3), suscetível (SUS) e heterozigóticas (SUS ♂ × RR-2 ♀, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀, SUS-♀ × RR-3 ♂). Após a infestação, para evitar a movimentação larval, as plantas foram acondicionadas no interior de tubos plásticos transparentes (110 cm de altura × 0,25 cm de diâmetro), os quais foram fixados na borda dos vasos e vedados na parte superior por um tecido “voil”. Após 7 dias as lagartas sobreviventes de cada tratamento foram recuperadas e, em laboratório, criadas em folhas de milho dos respectivos tratamentos até a emergência dos adultos. O delineamento foi inteiramente casualizado utilizando 100 plantas/linhagem. Os dados de porcentagem de sobrevivência foram submetidos à análise de normalidade de distribuição (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade de variância (HARTLEY, 1950). Posteriormente, sobrevivência de cada estágio de desenvolvimento foi determinada através da análise de variância (ANOVA) usando o procedimento PROC GLM (SAS INSTITUTE, 2000) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a um nível de 0.05% de significância (PROC GLM, SAS INSTITUTE, 2000).

3.2.5 Biologia de linhagens resistentes de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM

Para avaliar os parâmetros biológicos das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, respectivamente, e isolinha não-Bt, em casa de vegetação, as plantas foram cultivadas conforme descrito anteriormente. No

estádio fenológico V6, folhas de milho Bt e não-Bt foram retiradas do terço superior da planta e, em laboratório, cortadas em pedaços de 40 cm^2 , e acondicionadas em placas de bioensaio com 16 células (5,5 centímetros de comprimento x 4,0 cm de profundidade x 3,0 centímetros de altura por poço) [(Advento do Brasil, São Paulo, Brasil)] sobre uma mistura não-geleificada de ágar-água (2,5%). As folhas de milho foram separadas da camada de ágar-água por um papel filtro. Posteriormente, com o auxílio de um pincel fino, foi transferida uma neonata (< 24 h de idade) das linhagens resistentes RR-2 e RR-3. As placas foram mantidas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. As folhas foram trocadas a cada 48h durante todo o período larval.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição constituída de 16 lagartas, totalizando 160 neonatas/linhagem. Para cada tratamento foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa, ovo-adulto, peso de pupas com 24 h de idade, razão sexual, longevidade de fêmeas, período de oviposição e número de ovos por fêmea. A razão sexual foi calculada pela fórmula: $rs = \frac{\text{fêmeas}}{\text{machos} + \text{fêmeas}}$. A duração e a viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto foram determinadas em observações diárias. A longevidade e o número de ovos por fêmea foram avaliados a partir da formação de 20 casais/linhagem ou cruzamento em gaiolas de PVC (23 cm altura x 10 cm de diâmetro), revestidas internamente com folha de papel jornal (substrato de oviposição) e fechadas na parte superior com tecido “voile”. Diariamente, contou-se o número de ovos e registrou-se a mortalidade dos adultos. Para determinação do período embrionário e viabilidade foram obtidos ≈ 100 ovos da segunda postura de cada casal. Os ovos foram acondicionados em tubos de vidro de fundo chato ($8,5 \times 2,5 \text{ cm}$). No interior dos tubos foi colocado um pedaço de papel filtro ($2 \times 1 \text{ cm}$), o qual foi umedecido diariamente com água destilada, sendo fechados na parte superior com filme plástico. As posturas foram observadas diariamente contando-se o número de lagartas eclodidas.

A duração das fases de ovo, lagarta, pupa e período ovo-adulto, biomassa de pupas, período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição (x) foram transformados em $\arcsen \sqrt{x + 0,5}$. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ($P \leq 0.05$) (PROC TTEST, SAS INSTITUTE, 2000). O possível desvio na proporção dos sexos foi comparado utilizando o teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P \leq 0,05$) (PROC FREQ, SAS Institute, 2000). Adicionalmente foi calculada a tabela de vida de fertilidade estimando-se o intervalo médio entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução

(Ro), a taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a razão finita de crescimento (λ). Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade e respectivos erros padrão foram estimados pelo método "Jackknife" usando "Lifetable.sas" (MAIA et al., 2000) e comparados pelo teste t bilateral ($P \leq 0.05$) pelo software SASTM (SAS INSTITUTE, 2000).

3.3 Resultados

3.3.1 Frequência fenotípica da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM

Do total de 552 isofamílias testadas foi observado que houve a ocorrência de 75 e 49 isofamílias fenotipicamente positivas para as tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, respectivamente (Tabela 9 e 10). As populações provenientes do Estado da Bahia apresentaram as maiores frequências de isofamílias resistentes às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM quando comparadas com as demais populações de insetos avaliadas (Tabela 9 e 10). Os insetos provenientes do município de São Desidério (população BA27) coletados em área de milho Bt HerculexTM TC 1507 (que expressa a proteína Cry1F), que foi altamente danificado pelas lagartas durante o período de coleta, apresentaram as maiores frequências de isofamílias fenotipicamente positivas aos híbridos YieldGard VT PROTM ($\approx 41\%$) e PowerCoreTM ($\approx 23\%$) (Tabela 9 e 10). Contudo, quando os insetos foram coletados no mesmo Estado, em área de milho não-Bt (população BA31) a frequência fenotípica de isofamílias positivas foi de ≈ 30 e 19% às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM (Tabela 9) e PowerCoreTM (Tabela 10), respectivamente. Para o Estado de Goiás e Mato Grosso do Sul a frequência fenotípica de isofamílias positivas foi semelhante para os híbridos YieldGard VT PROTM (Tabela 9) e PowerCoreTM (Tabela 10), com valores inferiores daqueles observados para o Estado da Bahia e superiores aqueles verificados para os Estados de Mato Grosso e Paraná. De todas as populações de *S. frugiperda* avaliadas, os insetos coletados no Estado do Mato Grosso (população MT19 e MT20) e do Estado do Paraná (população PR38) não foram observado isofamílias fenotipicamente resistentes aos híbridos YieldGard VT PROTM (Tabela 9) e PowerCoreTM (Tabela 10), com exceção da população PR34 (Campo Mourão, PR) que apresentou uma frequência fenotípica de isofamílias positivas de 5,7 e 2,9% aos híbridos YieldGard VT PROTM (Tabela 9) e PowerCoreTM (Tabela 10), respectivamente.

Tabela 9 - Frequência fenotípica de *S. frugiperda* resistente à tecnologia de milho Bt YieldGard VT PRO™ através da técnica do F₂ screen

Estado	Cidade	População	Número de testados			Adulto	Isofamílias Positivas	Frequência fenotípica
			Isofamílias	Lagartas	Sobrevivência ^a			
Bahia	São Desidério	BA27	99	11820	168	98	41	41,1
	Luís Eduardo Magalhães	BA31	56	6720	23	19	17	30,3
Goiás	Montividiu	GO22	74	8880	17	17	7	9,4
	Caiapônia	GO23	56	6620	2	2	1	1,7
Mato Grosso	Sinop	MT19	26	3120	0	0	0	0,0
	Campo Novo do Parecis	MT20	34	3840	0	0	0	0,0
Mato Grosso do Sul	São Gabriel do Oeste	MS11	51	6120	8	8	4	7,8
	Chapadão do Sul	MS12	21	2460	7	3	1	4,7
	Dourados	MS13	27	3240	0	0	0	0,0
Paraná	Sabáudia	PR34	69	7820	11	10	4	5,7
	Campo Mourão	PR38	39	4600	0	0	0	0,0
Total	-	-	552	65240	236	157	75	13,6

^aLagartas sobreviventes após 6 dias alimentando-se somente com tecido de milho YieldGard VT PRO™.

Tabela 10 - Frequência fenotípica de *S. frugiperda* resistente à tecnologia de milho Bt PowerCore™ através da técnica do F₂ screen

Estado	Cidade	População	Número de testados			Adulto	Isofamílias Positivas	Frequência fenotípica
			Isofamílias	Lagartas	Sobrevivência ^a			
Bahia	São Desidério	BA27	99	11820	90	46	23	23,3
	Luís Eduardo Magalhães	BA31	56	6720	11	11	11	19,6
Goiás	Montividiu	GO22	74	8880	15	14	7	9,4
	Caiapônia	GO23	56	6620	6	6	3	5,3
Mato Grosso	Sinop	MT19	26	3120	0	0	0	0,0
	Campo Novo do Parecis	MT20	34	3840	0	0	0	0,0
Mato Grosso do Sul	São Gabriel do Oeste	MS11	51	6120	7	7	2	3,9
	Chapadão do Sul	MS12	21	2460	4	4	1	4,7
	Dourados	MS13	27	3240	0	0	0	0,0
Paraná	Sabáudia	PR34	69	7820	11	10	2	2,9
	Campo Mourão	PR38	39	4600	0	0	0	0,0
Total	-	-	552	65240	236	98	49	8,8

^aLagartas sobreviventes após 6 dias alimentando-se somente com tecido de milho PowerCore™.

3.3.2 Herança da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™

As linhagens resistentes RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* selecionadas em laboratório às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ apresentaram elevada razão de resistência a Cry1A.105, mais de 3300 vezes ($CL_{50} > 16.000 \text{ ng/cm}^2$). Para essa proteína, a linhagem SUS apresentou CL_{50} de $4,75 \text{ ng/cm}^2$ (Tabela 11). Uma elevada razão de resistência também foi constatada quando as linhagens selecionadas foram expostas a Cry1F, superior a 2700 vezes ($CL_{50} > 16.000 \text{ ng/cm}^2$) (Tabela 11). Para Cry1F a CL_{50} da linhagem SUS foi de $5,92 \text{ ng/cm}^2$, sendo próxima aquela obtida para Cry1A.105 (Tabela 11). Para ambas as linhagens resistentes não foi possível estimar a CL_{50} de Cry1A.105 e Cry1F, pois a resposta na máxima concentração testada (16.000 ng/cm^2), ocasionou mortalidade inferior a 50%. Ao contrário, uma baixa razão de resistência próximo a 10 vezes foi verificada para Cry2Ab2 para as linhagens RR-2 ($CL_{50} = 146,96 \text{ ng/cm}^2$) e RR-3 ($CL_{50} = 134,35 \text{ ng/cm}^2$) (Tabela 11). Para a linhagem SUS a CL_{50} foi de $14,04 \text{ ng Cry2Ab2/cm}^2$ (Tabela 11). A concentração-mortalidade dos indivíduos heterozigotos resultantes de cruzamentos recíprocos foram similares, independentemente da ordem do cruzamento, com valores de CL_{50} variando de 25,05 a 37,32; 26,09 a 48,35 e 24,86 a 47,60 ng/cm^2 para Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, respectivamente (Tabela 11), sendo significativamente inferiores daqueles observados para as linhagens resistentes RR-2 e RR-3 e, próximo aos valores de CL_{50} observados na linhagem SUS (Tabela 11). A razão de resistência dos indivíduos heterozigotos foi similar para Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, variando de 5,27 a 7,85; 1,85 a 3,43 e 4,20 a 7,80, respectivamente (Tabela 11).

Em adição à concentração letal, também se estimou a concentração que inibe o crescimento larval (CE_{50}). Para a CE_{50} , a razão de resistência de *S. frugiperda* a Cry1A.105 foi de 206,56 vezes para a linhagem RR-2 ($CE_{50} = 138,40 \text{ ng/cm}^2$), mas não foi estimada para a linhagem RR-3, devido à baixa resposta de inibição de crescimento larval (Tabela 11). Para Cry2Ab2, a CE_{50} variou de 19,05 a 39,56 ng/cm^2 para as linhagens RR-2 e RR-3, respectivamente. Isso representa uma razão de resistência variando de 11 a 22 vezes (Tabela 11). Para ambas as linhagens resistentes não foi possível estimar a CE_{50} a Cry1F, pois houve baixa resposta de inibição de crescimento na máxima concentração testada (16.000 ng/cm^2). Para a linhagem SUS, a CE_{50} foi de 0,67, 0,39 e 1,76 ng/cm^2 para Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2, respectivamente. Para os cruzamentos recíprocos a razão de resistência com base nos valores de CE_{50} foi maior daqueles verificados para a estimativa a partir dos valores de CL_{50} , variando de 13,13 a 27,41; 6,36 a 9,09 e 12,05 a 57,12 ng/cm^2 para Cry1A.105, Cry2Ab2 e

Cry1F, respectivamente (Tabela 11). Devido a sobreposição dos intervalos de confiança dos valores de CL_{50} e CE_{50} dos cruzamentos recíprocos, pode-se afirmar que os genes relacionados à resistência de *S. frugiperda* a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F expressas nas tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM estão situados em regiões autossômicas do cariótipo (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentração-resposta de uma linhagem suscetível (SUS), linhagens resistentes (RR-2 e RR-3) e progênie dos cruzamentos recíprocos de *S. frugiperda* a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F aplicadas na superfície da dieta artificial

Conc. (ng/cm ²) ^a	n	Mortalidade					Inibição do desenvolvimento	
		Coeficiente angular (± SE)	CL ₅₀ (IC 95%) ^b	χ ² ^c	g.l. ^d	RR ^e	CE ₅₀ (IC 95%) ^f	RR ^e
Proteína Cry1A.105								
SUS	448	1,20 ± 0,19	4,75 (2,67 - 7,04)	8,63	4	-	0,67 (0,53 - 0,84)	-
RR-2	384	NC	> 16000	NC	NC	> 3368	138,40 (102,21 - 191,02)	206,56
RR-3	448	NC	> 16000	NC	NC	> 3368	NC	-
SUS ♂ × RR-2 ♀	502	1,14 ± 0,11	25,05 (18,80 - 32,06)	4,18	5	5,27	8,80 (5,96 - 12,80)	13,13
SUS ♀ × RR-2 ♂	445	1,42 ± 0,12	32,62 (23,98 - 42,67)	6,14	5	6,86	18,37 (15,87 - 29,38)	27,41
SUS ♂ × RR-3 ♀	448	1,21 ± 0,09	37,32 (29,88 - 46,46)	2,96	5	7,85	15,76 (5,66 - 21,65)	23,52
SUS ♀ × RR-3 ♂	512	1,25 ± 0,10	32,30 (26,36 - 39,31)	4,06	6	6,79	14,42 (11,34 - 17,33)	21,52
Proteína Cry2Ab2								
SUS	576	1,27 ± 0,09	14,06 (11,64 - 16,96)	2,63	7	-	1,76 (1,23 - 2,49)	-
RR-2	540	0,96 ± 0,09	146,96 (83,37 - 330,35)	16,83	5	10,44	19,05 (10,77 - 35,56)	10,82
RR-3	460	1,07 ± 0,12	134,35 (94,17 - 210,41)	5,82	4	9,55	39,56 (22,60 - 72,40)	22,47
SUS ♂ × RR-2 ♀	448	1,51 ± 0,12	48,35 (26,17 - 90,48)	18,07	4	3,43	16,01 (12,72 - 24,36)	9,09
SUS ♀ × RR-2 ♂	512	1,07 ± 0,12	45,63 (28,48 - 76,28)	17,24	6	3,24	13,51 (8,68 - 20,53)	7,67
SUS ♂ × RR-3 ♀	448	1,81 ± 0,15	31,50 (23,69 - 40,72)	5,55	4	2,24	14,64 (12,90 - 16,75)	8,31
SUS ♀ × RR-3 ♂	447	1,39 ± 0,11	26,09 (16,99 - 39,21)	13,97	5	1,85	11,20 (3,30 - 36,87)	6,36
Proteína Cry1F								
SUS	576	1,14 ± 0,19	5,92 (4,72 - 7,29)	5,78	7	-	0,39 (0,23 - 0,59)	-
RR-2	576	NC	> 16000	NC	NC	> 2702	NC	-
RR-3	576	NC	> 16000	NC	NC	> 2702	NC	-
SUS ♂ × RR-2 ♀	576	1,52 ± 0,12	24,86 (21,04 - 29,18)	4,35	6	4,20	5,17 (4,52 - 10,28)	13,25
SUS ♀ × RR-2 ♂	576	1,32 ± 0,12	27,71 (23,15 - 33,13)	5,77	7	4,68	4,70 (3,14 - 7,02)	12,05
SUS ♂ × RR-3 ♀	512	1,34 ± 0,09	47,60 (35,16 - 56,11)	7,00	6	7,53	17,71 (10,04 - 23,81)	57,12
SUS ♀ × RR-3 ♂	512	1,21 ± 0,10	42,92 (29,52 - 61,20)	13,12	6	7,80	8,93 (4,10 - 19,47)	22,89

^aConcentração de proteína (ng/cm²); ^bCL₅₀: Concentração de proteína (ng/cm²) requerida para causar 50% de mortalidade larval 7 dias após a infestação. ^cQui-quadrado ($P < 0,05$); ^dg.l. = graus de liberdade; ^eRR = Razão de Resistência; ^fCE₅₀: Concentração de proteína (ng/cm²) que causa 50% de inibição de desenvolvimento larval; NC = não calculado por causa da insuficiente dose resposta.

3.3.3 Dominância da resistência

A partir do grau de dominância dos cruzamentos recíprocos das linhagens RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* em comparação a linhagem SUS constatou-se que a dominância é completamente recessiva nas maiores concentrações de Cry1A.105 e Cry1F e dominante nas concentrações menores (Tabela 12). Isso indica que a distância fenotípica entre os indivíduos heterozigotos e homozigotos suscetíveis foi constante nas concentrações testadas. Ao contrário, para Cry2Ab2 a resistência se comporta como co-dominante nas concentrações baixas a intermediárias, sendo completamente recessiva somente na máxima concentração testada (Tabela 12).

Tabela 12 - Grau de dominância da resistência em cruzamentos recíprocos das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* em função da concentração de Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F aplicadas na superfície da dieta artificial

^a Conc. (ng/cm ²)	SUS	SUS ♀ × RES-2 ♂		SUS ♂ × RES-2 ♀		SUS ♀ × RES-3 ♂		SUS ♂ × RES-3 ♀	
	Sobrevivência (%)	Sobrevivência F ₁ (%)	D ^b	Sobrevivência F ₁ (%)	D ^b	Sobrevivência F ₁ (%)	D ^b	Sobrevivência F ₁ (%)	D ^b
Proteína Cry1A.105									
89	29,8	77,8	0,7	75,0	0,5	73,4	0,6	75,0	0,7
160	29,1	62,5	0,5	64,1	0,5	64,1	0,5	64,1	0,5
500	16,6	34,4	0,3	48,4	0,4	49,44	0,5	48,4	0,5
890	3,1	25,0	0,2	31,3	0,2	31,3	0,4	31,3	0,4
1600	0,0	20,3	0,3	25,0	0,2	21,9	0,3	25,0	0,4
5000	0,0	7,9	0,1	9,3	0,2	9,3	0,2	9,4	0,2
16000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteína Cry2Ab2									
160	46,9	71,9	0,6	85,9	1,0	61,3	0,4	70,3	0,4
500	25,0	59,4	0,5	65,6	0,8	50,0	0,5	34,4	0,5
890	17,0	45,3	0,5	49,4	0,8	39,1	0,6	29,7	0,6
1600	9,5	26,6	0,5	14,1	0,1	22,0	0,4	26,3	0,5
4890	0,0	1,5	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteína Cry1F									
160	32,8	0,5	60,9	70,3	0,6	65,7	0,5	68,8	0,5
500	14,1	0,4	39,1	32,8	0,3	56,3	0,6	53,1	0,5
890	12,5	0,3	29,7	15,6	0,0	40,6	0,5	39,0	0,5
1600	6,3	0,2	20,3	10,9	0,1	26,6	0,4	26,6	0,4
5000	0,0	0,1	0,0	3,1	0,0	0,0	0,1	1,7	0,0
16000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^aConcentração de proteína (ng/cm²); ^bD = Dominância calculada a partir do modelo proposto por BOURGUET; GENISSEL; RAYMOND (2000).

3.3.4 Número de genes associados à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™

A partir da mortalidade observada e esperada dos retrocruzamentos das linhagens heterozigóticas com o parental mais distante das linhagens RR-2 e RR-3 rejeitou-se a hipótese de que a resistência está ligada a apenas um gene. Todos os valores de mortalidade observada e esperada foram significativos pelo testes de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0.001$) em todas as concentrações de Cry1A.105 (Tabela 13), Cry2Ab2 (Tabela 14) e Cry1F (Tabela 15). Isso permite rejeitar a possibilidade de efeito monogênico e caracterizar um efeito poligênico da resistência de *S. frugiperda* a essas proteínas inseticidas.

Tabela 13 - Valores de Qui-quadrado (χ^2) entre a mortalidade observada e esperada para um modelo monogênica (d.f.= 1) dos retrocruzamentos dos heterozigotos com as linhagens RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* quando expostas a Cry1A.105

^a Conc. (ng/cm ²)	Linhagem RR-2											
	RR-2 ♀ × F1 ♂ (SUS ♀ × RR-2 ♂)			RR-2 ♂ × F1 ♀ (SUS ♀ × RR-2 ♂)			RR-2 ♀ × F1 ♂ (SUS ♂ × RR-2 ♀)			RR-2 ♂ × F1 ♀ (SUS ♂ × RR-2 ♀)		
	^b Obs.	^c Exp.	χ^2	^b Obs.	^b Exp.	χ^2	^b Obs.	^c Exp.	χ^2	^b Obs.	^c Exp.	χ^2
160	3,1	24,5	20,68*	12	27	21,12*	11	27	21,1*	12	27	21,1*
500	3,1	38,5	39,96*	7	35,5	30,60*	4	15	30,6*	7	35,5	30,6*
890	12,5	41	44,06*	23	41	43,69*	12	35,5	44,0*	23	41	43,6*
1600	26,5	43,5	48,35*	42,5	43,5	47,79*	43	43,5	47,7*	42	43,5	47,7*
5000	39	55	76,49*	66	54	67,59*	50	54	68,2*	66	54	67,5*
16000	45	73,5	171,89*	80	73,5	168,75*	73	73,5	169,3*	80	73,5	168,7*

^a Conc. (ng/cm ²)	Linhagem RR-3											
	RR-3 ♀ × F1 ♂ (SUS ♀ × RR-3 ♂)			RR-3 ♂ × F1 ♀ (SUS ♀ × RR-3 ♂)			RR-3 ♀ × F1 ♂ (SUS ♂ × RR-2 ♀)			RR-3 ♂ × F1 ♀ (SUS ♂ × RR-2 ♀)		
	^b Obs.	^c Exp.	χ^2	^b Obs.	^b Exp.	χ^2	^b Obs.	^c Exp.	χ^2	^b Obs.	^c Exp.	χ^2
160	1	19,5	15,47*	1	27	21,4*	0,0	23,4	17,81*	1	27	21,4*
500	5	32,5	30,66*	14	35,5	30,4*	3,0	31,5	25,66*	14	35,5	30,4*
890	14	48	58,53*	15	41	43,9*	23,0	37,5	37,66*	15	41	43,9*
1600	32	56	80,00*	46	43,5	47,6*	50,0	49	59,54*	46	43,5	47,6*
5000	67	63,5	107,70*	57	54	67,9*	65,0	58	79,79*	53	54	77,9*
16000	81	75,5	190,66*	77,7	73,5	168,9*	84,0	73,5	168,45*	78,7	73,5	178,9*

^aConcentração de proteína (ng/cm²); ^bObs.= Percentual de mortalidade observada; ^cExp.= percentual de mortalidade esperada baseada em herança mendeliana; *Diferença significativa entre mortalidade esperada e observada ($P = 0.001$, graus de liberdade = 1).

Tabela 14 - Qui-quadrado (χ^2) entre a mortalidade observada e esperada para um modelo monogênica (d.f = 1) dos retrocruzamentos dos heterozigotos com as linhagens RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* quando expostas Cry2Ab2

^a Conc. (ng/cm ²)	Linhagem RR-2											
	RR-2 ♀ × F1 ♂ (SUS ♀ × RR-2 ♂)			RR-2 ♂ × F1 ♀ (SUS ♀ × RR-2 ♂)			RR-2 ♀ × F1 ♂ (SUS ♂ × RR-2 ♀)			RR-2 ♂ × F1 ♀ (SUS ♂ × RR-2 ♀)		
	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^b Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2
160	0,0	2,0	15,5*	9,0	20,0	21,1*	6,0	27,0	23,5*	12,0	27,0	21,1*
290	1,0	18,0	13,1*	17,0	16,0	30,6*	23,0	55,0	34,51*	25,0	35,5	30,0*
500	1,0	31,0	26,9*	26,0	23,5	43,6*	31,0	35,5	43,4*	45,0	41,0	42,9*
890	8,0	51,0	60,0*	45,0	31,0	47,7*	46,0	43,5	47,7*	48,0	43,5	47,6*
1600	50,0	65,0	116,0*	62,0	45,5	67,5*	78,0	54,0	71,7*	71,0	54,0	67,3*
4890	84,0	84,5	338,1*	89,0	72,5	168,7*	95,0	73,5	170,4*	93,0	73,5	167,7*

^a Conc. (ng/cm ²)	Linhagem RR-3											
	RR-3 ♀ × F1 ♂ (SUS ♀ × RR-3 ♂)			RR-3 ♂ × F1 ♀ (SUS ♀ × RR-3 ♂)			RR-3 ♀ × F1 ♂ (SUS ♂ × RR-3 ♀)			RR-3 ♂ × F1 ♀ (SUS ♂ × RR-3 ♀)		
	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^b Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2
160	8	12	11,78*	9,0	20,0	21,12*	7,0	20,5	16,3*	12,0	25,0	22,1*
290	27	25	18,98*	17,0	16,0	30,6*	15,0	20,5	15,6*	7,0	35,5	30,6*
500	36	45	32, 22*	26,0	23,5	43,6*	23,0	36,0	35,2*	21,0	41,0	43,6*
890	54	48	66,01*	44,0	31,0	46,7*	50,0	39,0	39,2*	40,0	46,5	45,7*
1600	67	71	128,6*	62,0	45,5	67,5*	70,0	45,5	50,8*	64,0	56,0	68,5*
4890	85,0	93	364,6*	87,0	72,5	164,7*	92,0	73,5	170,3*	82,0	74,5	164,7*

^aConcentração de proteína (ng/cm²); ^bObs.= Percentual de mortalidade observada; ^cEsp.= percentual de mortalidade esperada baseada em herança mendeliana; *Diferença significativa entre mortalidade esperada e observada ($P = 0.001$, graus de liberdade = 1).

Tabela 15 - Valores de Qui-quadrado (χ^2) entre a mortalidade observada e esperada para um modelo monogênica (d.f = 1) dos retrocruzamentos dos heterozigotos com as linhagens RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* quando expostas a Cry1F

^a Conc. (ng/cm ²)	Linhagem RR-2											
	RR-2 ♀ × F1 ♂ (SUS ♀ × RR-2 ♂)			RR-2 ♂ × F1 ♀ (SUS ♀ × RR-2 ♂)			RR-2 ♀ × F1 ♂ (SUS ♂ × RR-2 ♀)			RR-2 ♂ × F1 ♀ (SUS ♂ × RR-2 ♀)		
	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^b Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2
160	9,0	22,5	18,3*	12,0	25,5	18,2*	21,5	20,5	16,2*	15,0	20,5	16,1*
500	14,0	35,0	34,0*	17,0	36,0	33,9*	35,4	39,5	41,2*	25,0	39,5	40,9*
1600	18,0	51,0	65,8*	28,0	43,5	65,4*	48,3	48,5	59,2*	29,0	48,5	59,1*
5000	37,0	62,5	104,7*	48,0	58,5	87,9*	43,0	56,5	81,2*	45,0	56,5	81,0*
16000	43,0	74,0	178,8*	53,0	74,0	178,0*	65,0	74,0	177,1*	59,0	74,0	177,7*
^a Conc. (ng/cm ²)	Linhagem RR-3											
	RR-3 ♀ × F1 ♂ (SUS ♀ × RR-3 ♂)			RR-3 ♂ × F1 ♀ (SUS ♀ × RR-3 ♂)			RR-3 ♀ × F1 ♂ (SUS ♂ × RR-3 ♀)			RR-3 ♂ × F1 ♀ (SUS ♂ × RR-3 ♀)		
	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^b Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2	^b Obs.	^c Esp.	χ^2
160	12,0	17,0	12,8*	15,0	19,5	15,1*	12,0	19,5	15,2*	15,0	19,5	15,1*
500	21,0	28,5	24,9*	21,0	32,5	30,2*	15,0	32,5	30,4*	23,0	32,5	30,1*
1600	35,0	55,0	76,6*	29,0	56,0	80,1*	23,0	54,5	75,6*	32,0	54,5	75,2*
5000	54,0	71,0	156,8*	48,0	63,5	108,72*	50,0	63,5	108,6*	46,0	63,5	108,8*
16000	64,0	74,0	177,26*	54,0	75,5	192,8*	43,0	75,5	193,7*	57,0	75,5	192,6*

^aConcentração de proteína (ng/cm²); ^bObs.= Percentual de mortalidade observada; ^cEsp.= percentual de mortalidade esperada baseada em herança mendeliana; *Diferença significativa entre mortalidade esperada e observada ($P = 0.001$, graus de liberdade = 1).

3.3.5 Sobrevivência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM

Houve significativa sobrevivência e, conseqüentemente, fixação larval das linhagens RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* aos híbridos YieldGard VT PROTM (> 90% sobrevivência) e PowerCoreTM (> 75% sobrevivência), não diferindo da sobrevivência larval na isolinha não-Bt ($F_{2, 57} = 0,09$, $P = 0,9152$) (Figura 6A e B). Em contraste, não houve larvas sobreviventes da linhagem SUS e dos heterozigotos dos cruzamentos recíprocos quando da exposição às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, enquanto que em plantas de milho não-Bt a sobrevivência larval foi próximo a 70% (Figura 6A e B). Após serem recuperadas, em laboratório, mais de 90% das larvas sobreviventes das linhagens RR-2 e RR-3 em milho YieldGard VT PROTM, PowerCoreTM e isolinhas não-Bt originaram adultos, sendo a taxa de emergência das linhagens resistente similar àquela da linhagem SUS quando mantida somente em milho não-Bt ($F_{2,57} = 0,07$, $P = 0,9311$) (Figura 6 A e B).

Figura 6 - Sobrevivência larval das linhagens resistentes (RR-2 e RR-3), SUS e progênie dos cruzamentos recíprocos de *S. frugiperda* em milho YieldGard VT PRO™ (A) e PowerCore™ (B) e respectivas isolinhas não-Bt em casa de vegetação

3.3.6 Parâmetros biológicos das linhagens resistentes de *S. frugiperda* a eventos de milho Bt e não-Bt

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) na duração (dias) e viabilidade (%) das fases de ovo, larva, pupa e ovo-adulto das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 quando alimentadas com milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente, comparativamente quando ambas as linhagens foram alimentadas com milho não-Bt (Figura 7).

Figura 7 - Duração média (dias) e viabilidade (%) ($\pm$ EP) das fases de ovo, lagarta, pupa e período de ovo a adulto das linhagens resistentes RR-2 (A) e RR-3 (B) alimentadas com milho Bt e não-Bt

Adicionalmente, não foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) no peso de pupa, razão sexual e longevidade de fêmeas, período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 quando alimentadas com os híbridos YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente, e milho isolinha não-Bt (Tabela 16). Contudo, os adultos da linhagem RR-2 apresentaram menor ($P < 0,05$) longevidade de macho (11,20 dias) e fêmeas (12,60 dias), quando comparado os insetos que se alimentaram de milho não-Bt longevidade de macho (13,60) e fêmea (14,95) (Tabela 16). Entretanto, essas diferenças não foram observadas na linhagem RR-3 quando as lagartas se alimentaram em no híbrido de milho PowerCore™ ou isolinha não-Bt (Tabela 16).

Tabela 16 - Parâmetros biológicos das linhagens resistentes RR-2, RR-3 de *S. frugiperda* alimentadas com milho Bt e não-Bt

Parâmetros biológicos ^a	Linhagem RR-2		Linhagem RR-3	
	YieldGard VT PRO TM	Isolinha não-Bt	PowerCore TM	Isolinha não-Bt
Peso de pupa (mg)	169,02 ± 4,01 a	166,83 ± 2,14 a	166,37 ± 2,76 a	166,37 ± 2,09 a
Razão sexual (♀/♀+♂)	0,49 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,44 ^{ns}
Longevidade machos (dias)	11,10 ± 0,36 b	13,60 ± 0,69 a	11,13 ± 0,55 a	11,47 ± 0,36 a
Longevidade fêmeas (dias)	12,60 ± 0,32 b	14,95 ± 0,37 a	12,19 ± 0,45 a	12,73 ± 0,23 a
Pré-oviposição (dias)	3,90 ± 0,38 a	4,05 ± 0,28 a	3,74 ± 0,21 a	3,33 ± 0,23 a
Oviposição (dias)	7,55 ± 0,28 a	8,37 ± 0,42 a	7,65 ± 0,19 a	7,33 ± 0,19 a
Pós-oviposição (dias)	2,35 ± 0,33 a	2,53 ± 0,31 a	1,94 ± 0,24 a	2,07 ± 0,23 a

^aValores representam médias ±EP. As diferenças significativas entre as linhagens resistentes alimentadas com milho Bt e não-Bt foram obtidas a partir do Teste - *t* ($P < 0,05$). ^{ns}. não significativo pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$).

O fato de as lagartas das linhagens RR-2 e RR-3 apresentarem bom desenvolvimento biológico nas fases iniciais após a alimentação nos híbridos de milho Bt YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, respectivamente, ambas as linhagens demonstraram elevada capacidade reprodutiva na fase adulta, com fecundidade diária e total de ovos significativamente semelhante ($P < 0,05$) àquelas alimentadas em milho não-Bt (Figura 8).

Figura 8 - Fecundidade diária e total ($\pm$ EP) das linhagens RR-2 (A) e RR-3 (B) alimentadas com milho Bt e isolinha não-Bt

A elevada capacidade reprodutiva verificada nas linhagens resistentes RR-2 e RR-3 após a alimentação nas tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente, refletiu positivamente na tabela de vida de fertilidade em todos os parâmetros biológicos avaliados. Os valores de T foram significativamente semelhantes ($P < 0,05$) para as linhagens resistentes RR-2 e RR-3, indicando um contínuo desenvolvimento das gerações em milho Bt e não-Bt (Tabela 17). Os valores da taxa líquida de reprodução (R_0) indicaram que as linhagens RR-2 e RR-3 selecionadas em YieldGard VT PRO™, PowerCore™, respectivamente, não foram afetadas negativamente ($P < 0,05$) pela presença da proteína inseticida, onde não foi verificada redução na capacidade de gerar descendentes fêmeas (Tabela 17). Com base nesses resultados, decorridos ≈ 35 dias (T) de desenvolvimento das linhagens de *S. frugiperda* RR-2 e RR-3 em milho Bt e não-Bt são esperados ≈ 500

fêmeas resultantes de cada fêmea em fase de reprodução (Tabela 17). Assim como, independentemente da fonte de alimento das linhagens RR-2 e RR-3, os valores da taxa intrínseca de crescimento (r_m) e razão finita de aumento (λ) foram positivos (Tabela 17), indicando aumentos populacionais de *S. frugiperda* em qualquer regime de alimentação em que os insetos serão submetidos.

Tabela 17 - Tabela de vida e fertilidade das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* em milho Bt e não-Bt

Parâmetros Biológicos ^a	Linhagem RR-2		Linhagem RR-3	
	YieldGard VT PRO TM	Isolinha não-Bt	PowerCore TM	Isolinha não-Bt
T (dias)	35,1 ± 0,2 a	35,7 ± 0,2 a	36,1 ± 0,2 a	36,5 ± 0,2 a
R _o (♀ / ♀)	514,8 ± 17,2 a	503,4 ± 27,7 a	501,9 ± 31,6 a	487,9 ± 45,4 a
r _m (♀ / ♀*dias)	0,16 ± 0,003 a	0,17 ± 0,001 a	0,17 ± 0,002 a	0,165 ± 0,003 a
λ	1,19 ± 0,003 a	1,19 ± 0,002 a	1,18 ± 0,002 a	1,17 ± 0,003 a

^aValores representam a média ± EP obtidos a partir do método de Jackknife através do programa SAS. T = duração de cada geração; R_o = taxa líquida de reprodução; r_m = razão infinitesimal de aumento e λ = razão finita de aumento. Para cada parâmetro avaliado, valores seguidos pela mesma letra na linha não difere estatisticamente entre si ($P > 0,05$) para cada tratamento e linhagem de inseto.

3.4 Discussão

A partir do método do F₂ screen utilizando diretamente o tecido vegetal das plantas foi possível estimar a frequência fenotípica de isofamílias positivas de *S. frugiperda* resistentes às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM. A partir desta técnica, foi verificado elevada frequência fenotípica de isofamílias positivas para as tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM nas populações de insetos coletados na região central do Brasil (Bahia e Goiás), principalmente, para a população coletada no município de São Desidério, BA (população BA27) proveniente de área de milho HerculexTM TC 1507 (expressa a proteína Cry1F). As razões para a elevada frequência fenotípica nestas regiões podem ser reflexo da seleção direta de insetos resistentes a campo a partir da elevada pressão de seleção exercida pelas culturas que expressam proteínas que compartilham o mesmo sítio de ligação, principalmente, algodão BollgardTM (Cry1Ac), e os híbridos de milho YieldGardTM (Cry1Ab) e HerculexTM (Cry1F), as quais foram amplamente utilizadas para o manejo de *S. frugiperda* nos campos de produção em safras anteriores.

A elevada pressão de seleção exercida sobre *S. frugiperda* com as proteínas que compartilham o mesmo sítio de ação (FERRE; VAN RIE, 2002; HERNÁNDEZ-MARTINEZ et al., 2009; TABASHNIK et al., 2009; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; VÉLEZ et

al., 2013; BRÉVAULT et al., 2013) foi uma das principais hipóteses discutida para a elevada sobrevivência de *S. frugiperda* em cultivo comercial de milho Herculex™ TC 1507 (Cry1F) (FARIAS et al., 2014a). Durante a primeira safra 2012, período de coleta das populações de *S. frugiperda* a campo foram cultivados aproximadamente 70% da área brasileira com milho Herculex™ (CELERES, 2013). Este aspecto, associado à expressão da proteína Cry1F em baixa dose (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014a), recessividade parcial da resistência (TABASHNIK & CROFT, 1982; TABASHNIK et al., 2004; FARIAS et al., 2014a) apontam para a rápida evolução da resistência para os híbridos YieldGard VT PRO™ e PowerCore™.

Para os estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, a frequência fenotípica de indivíduos resistentes foi baixa ou zero como observada nas populações provenientes do Estado do Mato Grosso. Esta diferença quando comparada com as demais áreas amostradas pode estar associada ao sistema de cultivo da região, uma vez com que a primeira safra (verão) é cultivada com soja que não é o hospedeiro ideal para o desenvolvimento de *S. frugiperda* (BERNARDI et al., 2014), acarretando em uma diminuição na população da praga durante este ciclo da cultura e, conseqüentemente, uma menor infestação durante a segunda safra que é cultivada com milho. Da mesma forma para o Estado do Paraná, que devido ao clima subtropical da região, tem a prevalência de baixas temperaturas durante o inverno, acarretando em baixas infestações da praga durante as safras de verão.

A prévia pressão de seleção ao cultivo de YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ pode ter ocasionado a sobrevivência de indivíduos heterozigóticos portadores do alelo da resistência para a proteínas do grupo Cry1, pré-selecionando indivíduos que contribuíram para o rápido aumento da frequência fenotípica de indivíduos resistentes para aos híbridos de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ que expressa conjuntamente as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F, respectivamente, nos tecidos da planta. Em adição, o uso de plantas Bt com expressão em baixa dose das proteínas Cry1Ab e Cry1F (STORER et al., 2010; STORER et al., 2012; FARIAS et al., 2014a) podem ter desencadeado redução na suscetibilidade para a proteína que compartilham o mesmo sítio de ligação (proteína Cry1A.105) (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). Uma situação similar ocorreu em Porto Rico devido ao grande cultivo de milho Cry1Ab antes da introdução de Cry1F, favorecendo a evolução da resistência ao milho Herculex™ (TC1507) (STORER et al., 2012; HUANG et al., 2014). Este fato é reforçado quando as lagartas das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 foram expostas à proteína Cry2Ab2, a razão de resistência foi de aproximadamente 10 vezes, demonstrando que as proteínas Cry1A e Cry2A compartilham

sítios de ação distintos (VÉLEZ et al., 2013). A ausência de resistência cruzada com Cry2Ab2 tem implicações importantes para o MRI, principalmente, para a rotação e piramidação de toxinas de Bt em plantas transgênicas (ZHAO et al., 2003). Entretanto, lagartas de *H. zea* resistentes a proteína Cr1Ac, diminuíram a suscetibilidade quando alimentadas com folhas de algodão piramidado que expressam as proteínas Cry1Ac + Cry2Ab, demonstrando indícios de resistência cruzada com a proteína Cry2Ab (BRÉVAULT et al., 2013). Fato preocupante para às tecnologias de milho Bt piramidado devido a rápida evolução da resistência de *S. frugiperda* a proteína Cry1F expressa no milho Herculex™ (TC1507), uma vez com que as proteínas expressas em YieldGard VT PRO™ (Cry1A.105/Cry2Ab2) e PowerCore™ (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F) compartilham o mesmo sítio de ligação da proteína Cry1F (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014).

Outro fator que pode contribuir para a evolução da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, é o fato de os eventos não atenderem o conceito de piramidação de genes (Capítulo 2). Desta forma, a possibilidade de resistência cruzada entre as proteínas Cry1A.105 e Cry1F podem acarretar em uma elevada sobrevivência de indivíduos de *S. frugiperda* a estas proteínas, os quais não serão mortos pela proteína Cry2Ab2, devido a baixa atividade biológica quando utilizada isoladamente (Capítulo 2). Contudo, uma grande vantagem do milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ foi proporcionar a mortalidade completa de indivíduos heterozigóticos, tornando a resistência funcionalmente recessiva com o aumento da concentração de proteína (Cry1A.105, Cry2Ab2 ou Cry1F) em bioensaios com dieta artificial. Isso foi confirmado em estudo de casa de vegetação, em que as descendências dos cruzamentos recíprocos apresentaram 100% de mortalidade quando da alimentação em YieldGard VT PRO™ e PowerCore™. Estes resultados permitem concluir que a resistência das linhagens RR-2 e RR-3 de *S. frugiperda* é funcionalmente recessiva para as tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, indicando que ambos os híbridos apresentam a capacidade de proporcionar a recessividade funcional dos indivíduos heterozigóticos, resultando em uma baixa sobrevivência de insetos heterozigotos (RS), os quais, no início do processo de evolução da resistência são os principais carreadores dos alelos da resistência (GOULD, 1998). Em termos de MRI, estes resultados sugerem que, mesmo que haja insetos sobreviventes de áreas com cultivo de milho Bt, ao acasalar-se com indivíduos suscetíveis provenientes da área de refúgio, a descendência será morta pelas proteínas Bt expressas nas plantas de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, retardando ou evitando a evolução da resistência. Além disso, a expressão de alta dose das proteínas inseticidas na planta Bt piramidada permite maiores opções de MRI

como a utilização de áreas de refúgio de menor tamanho (STORER et al., 2003), uma vez com que está prática agrícola ainda não foi regulamentada no Brasil.

Entretanto, quando as linhagens resistentes RR-2 e RR-3 foram expostas às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente, foram observadas elevada sobrevivência e viabilidade larval em planta, corroborando com os estudos de laboratório onde verificou-se elevada capacidade biológica e reprodutiva das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 quando as lagartas foram alimentadas com milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente, em toda a fase imatura da praga. Esse fato demonstrou grande capacidade de desenvolvimento e habilidade de tolerar a toxicidade das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F expressas conjuntamente nos tecidos da planta, as quais foram tóxicas para linhagens suscetíveis e heterozigóticas. A elevada pressão de seleção exercida (18 gerações) sobre as linhagens RR-2 e RR-3 com às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, respectivamente, aumentou a frequência relativa dos indivíduos “pré-adaptados” presentes na população, que por um processo de endogamia na geração F₂, proporcionou a seleção de genótipos resistentes, os quais foram capazes de se adaptar aos híbridos YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, crescer e desenvolver alimentando-se dos tecidos das plantas Bt, e em seguida, acasalar e produzir descendentes viáveis (ANDOW, 2008).

No Brasil, até o momento não há registros de populações de *S. frugiperda* resistentes ao híbrido de milho com às tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ a campo. Contudo, fatores como: (i) cultivo intensivo de milho em duas safras anuais; (ii) uso de proteínas Bt que compartilham mesmo sítio de ação expressas em milho e algodão para o controle de *S. frugiperda*; (iii) baixa adoção de áreas de refúgios e (iv) grande disponibilidade de hospedeiros alternativos, as quais de “ponte verde” podem permitir uma diminuição da dominância funcional da resistência dos indivíduos heterozigotos, aumentando a probabilidade de seleção de indivíduos resistentes, acelerando o processo de evolução da resistência. Coletivamente, os dados do presente estudo, indicam que *S. frugiperda* apresenta potencialmente um risco elevado de evolução da resistência para o YieldGard VT PRO™ e PowerCore™. Este fato ficou mais evidente após o surgimento de populações de campo de *S. frugiperda* resistentes ao híbrido Herculex™ (TC 1507) que expressa a proteína inseticida Cry1F com elevada razão de resistência superior a > 5500 (FARIAS et al., 2014a). Entretanto, a regulamentação e conscientização de uso de áreas de refúgio são indispensáveis para manter eficácia dessas tecnologias para o controle de *S. frugiperda* uma vez com que esta estratégia

associada com a expressão de alta dose das plantas Bt pode ser suficientemente robusta para evitar ou retardar a evolução da resistência para as tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM por acarretar recessividade funcional na dominância dos indivíduos heterozigóticos.

Nesse contexto, para uma melhor compreensão da evolução da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM é importante dar continuidade a estudos de custo adaptativo, os quais podem afetar a presença do alelo da resistência. Em adição, a linhagem resistente também pode ser utilizada em estudos moleculares para auxiliar na identificação de possíveis mecanismos de resistência e tomadas de decisões sobre quais proteínas inseticidas de Bt são compatíveis para futuras piramidações que auxiliarão no refinamento das estratégias de MRI para evitar ou retardar a evolução da resistência às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, bem como em futuros planos de mitigação caso houver seleção de populações resistentes em condições de campo.

3.5 Conclusões

- A partir da técnica de “F₂ screen”, a frequência fenotípica de isofamílias positivas de *S. frugiperda* as tecnologias de milho YieldGard VT ProTM e PowerCoreTM é alta, principalmente, para as populações de *S. frugiperda* coletadas da região Central do Brasil.
- As linhagens de *S. frugiperda* resistentes as tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM, selecionadas a partir da técnica de “F₂ screen”, apresentou elevada razão de resistência a Cry1A.105 e Cry1F, porém baixa para Cry2Ab2.
- O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* resistentes às tecnologias de milho YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM é autossômica recessiva e poligênica.

Referências

ANDOW, D.A. The risk of *resistance* evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.

- ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. The F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 572-578, 1998.
- ANDOW, D.A.; IVES, A.R. Monitoring and adaptive resistance management. **Ecological Applications**, Tempe, v. 12, p. 1378-1390, 2002.
- BERNARDI, O.; SORGATO, R. J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F.A.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop protection**, Guildford, v. 5, n. 4, p. 33-40, 2014.
- BRÉVAULT, T., S. HEUBERGER, M. ZHANG, C. ELLERS-KIRK, X. NI, L. MASSON, X. LI, B. TABASHNIK, AND Y. CARRIÈRE. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington , v.110, n.15, p. 5806-5811, 2013.
- BOURGUET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1588-1595, 2000.
- CÉLERES. **Relatório de biotecnologia**. In: Boletim Técnico, 5 agosto 2013. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/post.php?p=179&lang=pt>>. Acesso em: 9 Nov. 2014.
- CROFT, B.A.; VAN DE BANN, H.E. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 4, p. 277-300, 1988.
- CROW, J.F. 1957. Genetics of insecticide resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Standfort, v. 2, p. 227-246, 1957.
- DOWNES, S.; PARKER, T.; MAHON, R. Incipient Resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt Toxin in Bollgard II™ Cotton. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 5, n. 9, p. e12567, 2010.
- FABRICK, J.A.; TABASHNIK, B.E. Similar genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in Boll-selected and diet-selected strains of pink bollworm. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 7, n. 4, p. e35658, 2012.
- FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford , v. 64, n. 2, p. 150-158, 2014a.
- FARIAS, J. R.; Horikoshi, R. J.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 6, p. 2182-2189, 2014b.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 501–533, 2002.

GEORGHIOU, G.P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. **Parasitological Review**, San Diego, v. 26, n. 2, p. 224-255, 1969.

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

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

HARTLEY, H.O. The use of range in analysis of variance. **Biometrika**, v. 37, n. s/n, p. 271-280, 1950.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Broad spectrum cross-resistance in *Spodoptera exigua* from selection with a marginally toxic Cry protein. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, n. 6, p. 645-650, 2009.

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

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

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**, Sussex, v. 67, n. 10, p. 1269-1276, 2011.

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

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

IVES, A.R.; ANDOW, D.A. Evolution of resistance to Bt crops: directional selection in structured environments. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, p. 792-801, 2002.

KASTEN Jr, P.; PRECETTI, A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, n. 1/2, p. 68-78, 1978.

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

MORIN, S.; BIGGS, R.W.; SISTERSON, M.S.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; HIGGINSON, D.; HOLLEY, D.; GAHAN, L.J.; HECKEL, D.G.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; BROWN, J.K.; TABASHNIK, B.E. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 9, p. 5004–5009, 2004.

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**, Farnham Royal, v. 98, p. 621-629, 2008.

ROUSH, R. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays? **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 501-516, 1994.

ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E (Ed). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

SAS INSTITUTE. Statistical Analysis System: getting started with the SAS learning. Cary, 2000. 81p.

SAS INSTITUTE INC. **SAS JMP: Introductory guide**, Version 10. Cary, NC: SAS Institute, 2012.

SHAPIRO S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SHELTON, A. M.; TANG, J.D.; ROUSH, R.T.; METZ, T.D.; EARLE, E.D. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 339-342, 2000.

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

SOKAL, R.R; ROHLF, F.J. **Biometry**: the principles and practices of statistics in biological research. San Francisco: WH Freeman, 1995. 880p.

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

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

STORER, N.P.; PECK, S.L.; GOULD, F.; VAN DUYN, J.W.; KENNEDY, G.G. Spatial processes in the evolution of resistance in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt transgenic corn and cotton in a mixed agro-ecosystem: a biology-rich stochastic simulation model. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 156-172, 2003.

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

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

TABASHNIK, B.E.; CROFT, B.A. Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes: interactions between biological and operational factors. **Environmental Entomology**, College Park, v. 11, n. 6, p. 1137-1144, 1982.

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y.B.; UNNITHAN, D.C.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; MORIN, S. Shared genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 3, p. 721-726, 2004.

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

TAYLOR, C.E.; GEORGHIOU, G.P. Suppression of insecticide resistance by alternation of gene dominance and migration. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 72, n. 1, p. 105-109, 1979.

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

ZHANG, H.; WU, S.; YANG, Y.; TABASHNIK, B.E.; WU, Y. Non-recessive Bt toxin resistance conferred by an intracellular cadherin mutation in field-selected populations of cotton bollworm. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 7, n. 12, p. e53418, 2012.

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

4 CUSTO ADAPTATIVO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ÀS TECNOLOGIAS DE MILHO YIELDGARD VT PRO™ E POWERCORE™

Resumo

O custo adaptativo associado à resistência de pragas a pesticidas pode ser explorado em programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Neste estudo objetivou-se avaliar o custo adaptativo associado à resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) às tecnologias de milho YieldGard VT Pro™ (VT PRO) e PowerCore™ (PW) que expressam, respectivamente, as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Foram avaliados os parâmetros biológicos das linhagens resistentes a VT PRO (linhagem RR-2) e PW (linhagem RR-3) em comparação com a da linhagem suscetível de referência (SUS) e dos indivíduos heterozigotos (descendentes provenientes do cruzamento entre as linhagens RR-2 ou RR-3 com a linhagem SUS). Além disso, foram conduzidos estudos para avaliar a sobrevivência larval de linhagens heterozigóticas em simulação de alimentação larval em diferentes períodos com milho não-Bt seguida de milho VT PRO ou PW. As linhagens RR-2, RR-3, heterozigóticas e SUS não apresentaram diferenças na duração do período ovo-adulto. No entanto, a presença de custo adaptativo associado à resistência foi verificada para as linhagens RR-2 e RR-3 com a redução da viabilidade total de ovo a adulto (10 e 15% respectivamente) e da capacidade de aumento populacional ($\approx 30\%$). Não foram verificadas diferenças significativas nos parâmetros de tabela de vida de fertilidade dos indivíduos heterozigotos, em relação à linhagem SUS. Em simulação de alimentação larval, os eventos de milho VT PRO e PW ocasionaram mortalidade completa de neonatas das linhagens heterozigóticas. Contudo, foi verificado um aumento significativo na sobrevivência larval de heterozigotos quando as lagartas iniciaram a alimentação em milho VT PRO e PW do segundo ao sexto instar larval. Portanto, apesar da presença de custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* para os eventos de milho VT PRO e PW baseado em parâmetros biológicos, os indivíduos heterozigotos foram igualmente adaptados à linhagem SUS na ausência da pressão seletiva o que poderia acelerar a evolução da resistência. Contudo, a dominância funcional da resistência a VT PRO e PW para neonatas foi completamente recessiva, indicando que os eventos de milho podem ser considerados de alta dose para MRI.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho; Milho Bt; alta dose; Manejo da Resistência de Insetos

Abstract

Fitness costs associated with pest resistance to pesticides can be exploited in Insect Resistance Management (IRM) programs. The objective of this study was to evaluate the fitness costs associated with resistance of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) to YieldGard VT Pro™ (VT PRO) and PowerCore™ (PW) corn technologies expressing Cry1A.105/Cry2Ab2 and Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner respectively. Life history traits of strains resistant to VT PRO (RR-2 strain) and PW (RR-3 strain) in compare with those of the susceptible reference strain (SUS) and heterozygous strains (offspring from the crosses between RR-2 or RR-3 strains with SUS strain). In addition, we conducted studies to evaluate larval survival of heterozygous strains

under simulation of different feeding time on non-Bt corn followed by VT PRO or PW corn. No difference in the duration of egg-adult period was detected in the RR-2, RR-3, heterozygous and SUS strains. However, fitness costs associated with resistance were found in RR-2 and RR-3 strains with reduction in the total viability from egg to adult (10 and 15% respectively) and the capacity of population increase ($\approx 30\%$). There were no significant differences in fertility life table parameters of heterozygous strains in compare to the SUS strain. In larval feeding simulation, VT PRO and PW corn events caused complete mortality of neonates from heterozygous strains. However, a significant increase in heterozygous larval survival was detected when larvae started feeding on VT PRO e PW from second to sixth instar. Therefore, although we detected fitness costs associated with *S. frugiperda* resistance to VT PRO and PW corn events based on life history traits, heterozygous individuals were as fit as SUS strain in the absence of selection pressure which could favor the evolution of resistance. However, the functional dominance of neonate larvae to VT PRO and PW was completely recessive, indicating these corn events can be considered as high-dose to IRM.

Keywords: Fall armyworm; Bt corn; High-dose; Insect Resistance Management

4.1 Introdução

Um dos fatores que podem contribuir para retardar a evolução da resistência é a presença de custo adaptativo associado à resistência de pragas na ausência de pressão de seleção (GASSMANN et al., 2009; JAKKA et al., 2014). Esse fator associado com a expressão de alta dose das proteínas de Bt expressas nas tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e Powercore™ (Capítulo 3) associado com a presença de áreas de refúgios pode auxiliar no restabelecimento da suscetibilidade de populações resistentes, diminuindo a dominância funcional da resistência dos indivíduos portadores de alelos da resistência (insetos heterozigotos “RS” e homozigotos resistentes “RR”) (GEORGHIOU, 1972; ROUSH; MCKENZIE, 1987), evitando ou retardando a evolução da resistência (GOULD, 1998; TABASHNIK et al., 2009; HUANG et al., 2011; IVES et al., 2011; TABASHNIK et al., 2013).

A presença de custo adaptativo limita o desenvolvimento de organismos na ausência de pressão de seleção, uma vez com que os genótipos portadores de alelos da resistência podem sofrer efeitos pleiotrópicos permitindo que o custo interfira no metabolismo, afetando diretamente os parâmetros biológicos e deixando os insetos portadores de alelos da resistência menos competitivos que os insetos suscetíveis (CARRIÈRE et al., 1994; GOULD, 1998; GASSMANN et al., 2009). Este fato ocorre devido os genes associados à resistência serem raramente fixos na população e a manutenção genética é resultado da constante pressão de seleção (GASSMANN et al., 2009).

Nesse cenário, o cultivo de áreas de refúgio (plantas não-Bt) externamente as áreas com milho Bt, além de serem responsáveis pelo fornecimento de indivíduos suscetíveis para minimizar o acasalamento não-aleatório entre os raros indivíduos homozigotos resistentes que poderiam sobreviver na área com às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e Powercore™, garante que a progênie seja formada por indivíduos heterozigóticos (GOULD, 1998), que serão mortos pela expressão de alta dose das proteínas de Bt destas tecnologias, que no início da evolução da resistência, são os principais responsáveis pela dispersão dos alelos da resistência (GOULD, 1998; TABASHNIK et al., 2008).

No Brasil, devido à baixa adoção de áreas de refúgio, tem sido proposto pelas empresas de biotecnologia o uso de mistura de sementes. Um dos aspectos positivos da mistura de sementes é a semeadura de refúgio adequado e distribuição uniforme das plantas dentro do campo Bt (CARROLL; HEAD; CAPRIO, 2012). Contudo, a elevada polifagia e mobilidade larval de *S. frugiperda* pode desfavorecer esta estratégia, elevando a sobrevivência dos insetos portadores de alelos da resistência “RS” em instares maiores, aumentando a herdabilidade da resistência (CAPRIO, 2001; SISTERTON et al., 2005). Essa constatação demonstra que os indivíduos heterozigotos passam a ter vantagens adaptativas aumentando a dominância funcional da resistência e contribuir para a evolução da resistência (TABASHNIK, 1994; ANDOW, 2008; GASSMANN et al., 2009).

A avaliação do custo adaptativo é comumente realizada pela comparação de parâmetros biológicos (sobrevivência, períodos de desenvolvimento, biomassa de larvas e pupas e parâmetros de fertilidade) de insetos suscetíveis, resistentes e heterozigotos (GASSMANN et al., 2009; JAKKA et al., 2014). Com a seleção e caracterização da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ (Capítulo 3) foi avaliado o custo adaptativo associado à resistência mediante i) estudos de parâmetros biológicos e da tabela de vida e fertilidade de linhagens resistentes (RR-2 e RR-3) e heterozigóticas, comparado com uma linhagem SUS quando alimentadas durante a fase larval com milho não-Bt, e ii) avaliação da sobrevivência larval de linhagens heterozigóticas de *S. frugiperda* em simulação de alimentação larval em diferentes períodos com milho isolinha não-Bt seguido de milho YieldGard VT PRO™ e Powercore™ em condições de laboratório.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Linhagens de *S. frugiperda*

Para avaliar o custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ e à sobrevivência larval em milho não-Bt e Bt, foram utilizadas uma linhagem suscetível (SUS) mantida em laboratório por mais de 10 anos livre de pressão de seleção com inseticidas e proteínas Bt, duas linhagens resistentes, uma ao milho YieldGard VT PRO™ (Linhagem RR-2) e outra ao PowerCore™ (Linhagem RR-3) e linhagens heterozigóticas (SUS ♀ × RR-2 ♂; SUS ♂ × RR-2 ♀; SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀) obtidas a partir dos cruzamentos recíprocos das linhagens resistentes (RR-2 e RR-3) e suscetíveis.

4.2.2 Custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™

O presente trabalho foi realizado mediante a avaliação dos parâmetros biológicos das linhagens resistentes (RR-2 e RR-3), das linhagens heterozigóticas (SUS ♀ × RR-2 ♂; SUS ♂ × RR-2 ♀; SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀) em comparação a linhagem SUS, na ausência de pressão de seleção utilizando milho isolinha não-Bt. Para tanto, as plantas de milho não-Bt foram cultivadas em casa de vegetação conforme descrito anteriormente. No estágio fenológico V6, folhas foram retiradas do terço superior da planta e, em laboratório, cortadas em pedaços de $\approx 40 \text{ cm}^2$, sendo acondicionadas em placas de bioensaio com 16 células (5,5 centímetros de comprimento x 4,0 cm de profundidade x 3,0 centímetros de altura por poço) [(Advento do Brasil, São Paulo, Brasil)] sobre uma mistura não-geleificada de ágar-água (2,5%). As folhas de milho foram separadas da camada de ágar-água por um papel filtro. Posteriormente, com o auxílio de um pincel fino foi transferida uma neonata (< 24 h de idade) das linhagens suscetível SUS, resistentes RR-2 e RR-3 e heterozigóticas (SUS ♀ × RR-2 ♂; SUS ♂ × RR-2 ♀; SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀). As placas foram mantidas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. As folhas foram trocadas a cada 48 h durante todo o período larval. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição constituída de 16 lagartas, totalizando 160 neonatas/linhagem. Para cada tratamento foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa, ovo-adulto, peso de pupas com 24 h de idade, razão sexual, longevidade de fêmeas, período de oviposição e

número de ovos por fêmea. A razão sexual foi calculada pela fórmula: $rs = \frac{\text{fêmea}}{(\text{macho} + \text{fêmea})}$. A duração e a viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto foram determinadas em observações diárias. A longevidade e o número de ovos por fêmea foram avaliados a partir da formação de 20 casais/linhagens ou cruzamento em gaiolas de PVC (23 cm altura $\times$ 10 cm de diâmetro), revestidas internamente com folha de papel jornal (substrato de oviposição) e fechadas na parte superior com tecido “voil”. Diariamente, contou-se o número de ovos e registrou-se a mortalidade dos adultos. Para determinação do período embrionário e viabilidade foram obtidos $\approx$ 100 ovos da segunda postura de cada casal. Os ovos foram acondicionados em tubos de vidro de fundo chato (8,5 $\times$ 2,5 cm). No interior dos tubos foi colocado um pedaço de papel filtro (2 $\times$ 1 cm), o qual foi umedecido diariamente com água destilada, sendo fechados na parte superior com filme plástico. As posturas foram observadas diariamente contando-se o número de lagartas eclodidas.

4.2.3 Sobrevivência larval de linhagens heterozigóticas de *S. frugiperda* em simulação de alimentação larval em milho não-Bt e Bt

Bioensaios foram realizados para analisar a sobrevivência larval das linhagens heterozigóticas (SUS $\text{fêmea} \times$ RR-2 macho ; SUS $\text{macho} \times$ RR-2 fêmea ; SUS $\text{fêmea} \times$ RR-3 macho e SUS $\text{macho} \times$ RR-3 fêmea) submetidas a diferentes regimes de alimentação em folhas de milho não-Bt e Bt (YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM). Os bioensaios foram iniciados quando as plantas de milho atingiram o estágio fenológico V6, cultivados em casa de vegetação conforme descrito anteriormente. Em laboratório, neonatas provenientes das linhagens heterozigóticas SUS $\text{fêmea} \times$ RR-2 macho ; SUS $\text{macho} \times$ RR-2 fêmea ; SUS $\text{fêmea} \times$ RR-3 macho e SUS $\text{macho} \times$ RR-3 fêmea foram alimentadas com folhas de milho isolinha não-Bt colocadas em placas de bioensaio (16 células) (5,5 centímetros de comprimento $\times$ 4,0 cm de profundidade $\times$ 3,0 centímetros de altura por poço) sobre uma mistura não-geleificada de ágar-água (2,5%) e papel filtro e, em seguida, transferidas para os eventos de milho Bt YieldGard VT PROTM ou PowerCoreTM, respectivamente, em diferentes tempos: após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias (períodos de tempo T-2 a T-7), ou alimentadas somente com a isolinha não-Bt (TC), ou em YieldGard VT PROTM e PowerCoreTM (T-1) durante todo o período larval (Tabela 18). Cada linhagem foi formada por 64 neonatas (4 repetições de 16 neonatas). As larvas foram transferidas para o tratamento seguinte, e as folhas de milho trocadas a cada 2 dias. As placas de bioensaio foram acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14 h. A mortalidade em cada tempo foi avaliada quando da troca das folhas até a fase de pupa.

Tabela 18 - Simulação de alimentação larval de genótipos heterozigóticos de *S. frugiperda* em folhas de milho não-Bt e Bt

Simulação alimentação	Dias após a inoculação (DAÍ)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
T-C	Não- Bt	Não- Bt	Não- Bt	Não- Bt	Não- Bt	Não- Bt	Não- Bt	Não- Bt	Não- Bt
T-1	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
T-2	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
T-3	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
T-4	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
T-5	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
T-6	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
T-7	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt

4.2.4 Análise estatística

A duração das fases de ovo, lagarta, pupa e período ovo-adulto, biomassa de pupas, período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição (x) foram transformados em $\arcsen \sqrt{x + 0,5}$ e as diferenças entre as linhagens foram determinadas utilizando médias dos quadrados mínimos a um nível de significância de $\alpha = 0.05$ (PROC GLM, SAS INSTITUTE, 2000). Os resultados relativos à razão sexual foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$) (PROC FREQ, SAS INSTITUTE, 2000). Adicionalmente, foi calculada a tabela de vida de fertilidade estimando-se o intervalo médio entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução (R_0), a taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a razão finita de crescimento (λ). Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade foram estimados pelo método "Jackknife" usando "Lifetable.sas" (MAIA et al., 2000), e as médias comparados pelo teste t bilateral ($P \leq 0.05$) pelo software SASTM (SAS INSTITUTE, 2000). Os dados de simulação de alimentação larval das linhagens heterozigóticos de *S. frugiperda* em milho Bt e não-Bt foram analisados por meio do procedimento GLM (SAS INSTITUTE, 2000) e as diferenças entre os tratamentos foram determinados por meio do teste LSMEANS a um nível de significância de $\alpha = 0,05$ (SAS INSTITUTE, 2000).

4.3 Resultados

4.3.1 Custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™

Mediante a análise dos parâmetros biológicos das linhagens SUS, resistentes RR-2 e RR-3 e heterozigóticas (SUS ♀ × RR-2 ♂; SUS ♂ × RR-2 ♀; SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀), foi verificado que não houve diferença significativa para na duração da fase de ovo ($F = 1,36$; g.l. = 3, 74; $P = 0,2608$), larva ($F = 0,42$; g.l. = 3, 60; $P = 0,7425$), pupa ($F = 2,07$; g.l. = 3, 60; $P = 0,0998$) e período ovo-adulto (29 dias) ($F = 2,26$; g.l. = 3, 60; $P = 0,0881$) para as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂, SUS ♂ × RR-2 ♀ e RR-2 de *S. frugiperda* (Figura 9). Assim como, para a fase de ovo ($F = 3,47$; g.l. = 3, 74; $P = 0,4941$) e lagarta ($F = 17,07$; g.l. = 3, 74; $P = 0,2608$) para as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 (Figura 9). Contudo, houve diferenças significativas na fase de pupa ($F = 12,77$; g.l. = 3, 74; $P < 0,0001$) e período de ovo-adulto ($F = 17,78$; g.l. = 4, 72; $P < 0,0001$) para as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 (Figura 9). Para os parâmetros de viabilidade, as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-2 ♀ não diferiram estatisticamente entre si na viabilidade de ovo ($F = 1,46$; g.l. = 3, 60; $P = 0,3408$) e pupa ($F = 0,22$; g.l. = 3, 60; $P = 0,9673$), no entanto, a linhagem RR-2 apresentou $\approx 15\%$ menor viabilidade larval, diferindo estatisticamente ($F = 8,24$; g.l. = 3, 60; $P < 0,0001$) das linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-2 ♀ (Figura 9). Isso afetou diretamente a viabilidade do período ovo-adulto, no qual menos de 75% dos insetos da linhagem RR-2 completaram esse período. Em contraste, mais de 87% dos insetos das linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ e RR-2 ♀ originaram adultos ($F = 9,46$; g.l. = 3, 60; $P < 0,0001$) (Figura 9). Para as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 não houve diferenças estatísticas para a viabilidade de ovo ($F = 0,30$; g.l. = 4, 74; $P = 0,8757$) e pupa ($F = 1,93$; g.l. = 4, 74; $P = 0,1153$), contudo, a linhagem RR-3, diferiu significativamente para os parâmetros de viabilidade larval ($F = 9,46$; g.l. = 4, 74; $P < 0,0001$) e período de ovo-adulto ($F = 31,43$; g.l. = 4, 74; $P < 0,0001$) das linhagens SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ (Figura 9).

Figura 9 - Tempo de desenvolvimento (dias) e viabilidade (%) de linhagens *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho isolinha não-Bt. Grupo de colunas com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas entre si (Teste LSD, $P > 0,05$)

O peso de pupas das linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂, SUS ♂ × RR-2 ♀ e RR-2 não diferiram significativamente entre si ($F = 1,22$; g.l. = 4, 74; $P = 0,3116$) (Tabela 19). No entanto, pupas originadas da linhagem SUS ♀ × RR-3 ♂ pesaram menos (145,33 mg) diferindo ($F = 25,35$; g.l. = 4, 74; $P < 0,0001$) das demais linhagens RR-3 (166,37 mg), SUS (165,85 mg) e SUS ♂ × RR-3 ♀ (177,4 mg) (Tabela 19). Em relação à razão sexual não houve diferença significativa ($\chi^2 = 69,42$; g.l. = 3, 60; $P = 0,2700$) entre as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂, SUS ♂ × RR-2 ♀ e RR-2, assim como entre as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 ($\chi^2 = 75,42$; g.l. = 4, 74; $P = 0,4941$) (Tabela 19). As longevidades de adultos machos e fêmeas do cruzamento recíproco SUS ♂ × RR-2 ♀ foram significativamente inferior (10,37 dias) ($F = 5,44$; g.l. = 4, 84; $P < 0,0006$) e (12,16 dias) ($F = 6,53$; g.l. = 4, 84; $P < 0,0001$), respectivamente, quando comparada com as demais linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂ e RR-2 (Tabela 19), fato este não observado para as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 que não diferiram estatisticamente na longevidade de macho ($F = 2,09$; g.l. = 4, 74; $P < 0,0909$) e fêmea ($F = 3,91$; g.l. = 4, 74; $P < 0,1061$) (Tabela 19).

Em relação ao período de pré-oviposição, não foi observada diferença significativas ($F = 1,89$; g.l. = 4, 88; $P = 0,1200$) nas linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂, SUS ♂ × RR-2 ♀ e RR-2, assim como, para as linhagens SUS e SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 ($F = 2,09$; g.l. = 4, 74; $P = 0,0897$) (Tabela 19). Os períodos de oviposição das linhagens SUS ♀ × RR-2 ♂ (7,20 dias) e SUS ♂ × RR-2 ♀ (6,84 dias) foram inferiores significativamente ($F = 4,38$; g.l. = 4, 88; $P = 0,0028$) quando comparada com as linhagens RR-2 (8,37) e SUS (8,13) (Tabela 19). Estas diferenças não foram observadas ($F = 1,62$; g.l. = 4, 74; $P = 0,0149$) na linhagem SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3, com um período médio de oviposição de 7,7 dias (Tabela 19). Da mesma forma, o período de pós-oviposição foi semelhante estatisticamente ($F = 2,83$; g.l. = 4, 84; $P = 0,0294$) para as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-2 ♂, SUS ♂ × RR-2 ♀ e RR-2, assim como para as linhagens SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂, SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 ($F = 3,31$; g.l. = 4, 77; $P = 0,0149$) (Tabela 19).

Tabela 19 - Parâmetros biológicos de linhagens de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho isolinha não Bt

Parâmetros Biológicos ^a	Linhagens			
	SUS	SUS ♂ × RR-2 ♀	SUS ♀ × RR-2 ♂	RR-2
Peso de pupa (mg)	165.85 ± 2.23 a	168.84 ± 3.08 a	174.4 ± 4.76 a	166.83 ± 2.14 a
Razão sexual (♀/♀+♂)	0.48 ^{ns}	0.45 ^{ns}	0.48 ^{ns}	0.46 ^{ns}
Longevidade machos (dias)	13.07 ± 0.33 ab	10.37 ± 0.55 a	11.05 ± 0.69 bc	13.60 ± 0.69 a
Longevidade fêmeas (dias)	14.07 ± 0.23 ab	12.16 ± 0.45 c	13.25 ± 0.42 ab	14.95 ± 8.37 a
Pré-oviposição (dias)	3.60 ± 0.24 a	3.79 ± 0.27 a	4.55 ± 0.23 a	4.05 ± 0.28 a
Oviposição (dias)	8.13 ± 0.19 ab	6.84 ± 0.39 c	7.20 ± 0.25 abc	8.37 ± 0.42 a
Pós-oviposição (dias)	2.33 ± 0.23 a	1.84 ± 0.32 a	1.50 ± 0.29 a	2.53 ± 0.31 a
Parâmetros Biológicos ^a	Linhagens			
	SUS	SUS ♂ × RR-3 ♀	SUS ♀ × RR-3 ♂	RR-3
Peso de pupa (mg)	165,85 ± 2,23 b	149,33 ± 2,45 c	145,33 ± 2,95 c	166,37 ± 2,09 b
Razão sexual (♀/♀+♂)	0,48 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,44 ^{ns}
Longevidade machos (dias)	13,07 ± 0,33 a	11,61 ± 0,54 a	11,61 ± 0,54 a	11,47 ± 0,36 a
Longevidade fêmeas (dias)	14,07 ± 0,23 a	12,72 ± 0,36 ab	12,72 ± 0,36 ab	12,73 ± 0,23 ab
Pré-oviposição (dias)	3,60 ± 0,24 a	3,89 ± 0,39 a	3,89 ± 0,39 a	3,33 ± 0,23 a
Oviposição (dias)	8,13 ± 0,19 a	7,72 ± 0,34 a	7,72 ± 0,34 a	7,33 ± 0,19 a
Pós-oviposição (dias)	2,33 ± 0,23 a	1,61 ± 0,30 ab	1,61 ± 0,30 ab	2,07 ± 0,23 a

^aValores representam médias ±EP. Para cada linhagem de *S. frugiperda* uma análise de variância ANOVA (Tukey a $P \leq 0,05$) foi realizada para cada parâmetro biológico. ^{ns}. não significativo pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$).

Em relação à fecundidade diária e total, a linhagem RR-2 e as linhagens heterozigóticas SUS ♀ × RR-2 ♂, SUS ♂ × RR-2 ♀ ($F = 1,91$; g.l. = 4, 88; $P < 0,0001$) e a linhagem RR-3 e as linhagens heterozigóticas SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀ ($F = 0,55$; g.l. = 4, 77; $P < 0,0001$) diferiram estatisticamente da linhagem SUS, reduzindo em $\approx 20\%$ a capacidade de oviposição em relação a linhagem suscetível (Figura 10).

Figura 10 - Fecundidade diária e total de linhagens de *S. frugiperda* alimentadas com milho isolinha não-Bt. Grupo de colunas com mesmas letras não apresentam diferenças significativas entre si (Teste LSD, $P > 0.05$)

A redução na capacidade reprodutiva afetou negativamente alguns parâmetros da tabela de vida de fertilidade. O intervalo médio entre gerações (T) não diferiu significativamente entre as linhagens de *S. frugiperda* (Tabela 20). Por outro lado, os valores da taxa líquida de reprodução (R_o) indicaram uma redução de $\approx 35\%$ na capacidade das fêmeas das linhagens resistentes RR-2 e RR-3 em gerar descendentes fêmea, respectivamente, quando comparado com a população suscetível (Tabela 20). Mesmo com menor oviposição, as linhagens heterozigóticas SUS ♀ × RR-2 ♂ e SUS ♂ × RR-2 ♀ e SUS, SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀ e RR-3 apresentaram similar taxa líquida de reprodução da linhagem SUS (Tabela 20). Com base nesses resultados, decorridos ≈ 36 dias (T) de desenvolvimento, são esperadas para as linhagens SUS (883), RR-2 ♂ × SUS ♀ (833), RR-2 ♀ × SUS ♂ (841), RR-3 ♂ × SUS ♀ (684) e RR-3 ♀ × SUS ♂ (736) fêmeas resultantes de cada fêmea em fase de reprodução (R_o), respectivamente (Tabela 20). Em contraste, no mesmo período são esperadas 599 fêmeas/fêmea da linhagem RR-2 e 574 fêmeas/fêmea da linhagem RR-3 (Tabela 20). As linhagens resistentes RR-2 e RR-3 também apresentaram menor taxa intrínseca de crescimento (r_m), variando de 6 a $\approx 10\%$, respectivamente, no número de fêmeas geradas por fêmea/dia, comparativamente com as linhagens SUS, RR-2 ♂ × SUS ♀, RR-2 ♀ × SUS ♂ e RR-3 ♂ × SUS ♀ e RR-3 ♀ × SUS ♂, respectivamente (Tabela 20). De modo similar, a razão finita de aumento (λ) também demonstrou pequena redução no aumento populacional diário das linhagens RR-2 e RR-3, em comparação as demais linhagens (Tabela 20).

Tabela 20 - Tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho isolinha não-Bt

Parâmetros Biológicos ^a	Linhagens			
	SUS	SUS ♂ × RR-2 ♀	SUS ♀ × RR-2 ♂	RR-2
T (dias)	36,5 ± 0,4 a	36,5 ± 0,1 a	36,8 ± 0,2 a	35,7 ± 0,2 a
R_o (♀ / ♀)	736,7 ± 55,6 a	701,2 ± 31,5 a	694,5 ± 38,2 a	503,4 ± 27,7 b
r_m (♀ / ♀*dia)	0,180 ± 0,002 a	0,182 ± 0,002 a	0,181 ± 0,002 a	0,174 ± 0,001 b
λ	1,200 ± 0,003 a	1,20 ± 0,002 a	1,20 ± 0,002 a	1,19 ± 0,002 b
Parâmetros Biológicos ^a	Linhagens			
	SUS	SUS ♂ × RR-3 ♀	SUS ♀ × RR-3 ♂	RR-3
T (dias)	36,5 ± 0,4 a	35,5 ± 0,2 a	35,8 ± 0,2 a	36,5 ± 0,2 a
R_o (♀ / ♀)	736,7 ± 55,6 a	700,7 ± 30,74 a	698,2 ± 31,5 a	487,9 ± 45,4 b
r_m (♀ / ♀*dia)	0,180 ± 0,002 a	0,181 ± 0,001 a	0,182 ± 0,001 a	0,165 ± 0,003 b
λ	1,200 ± 0,003 a	1,200 ± 0,001 a	1,200 ± 0,001 a	1,179 ± 0,003 b

^aValores representam a média ± EP obtidos a partir do método de Jackknife através do programa SAS. T = duração de cada geração; R_o = taxa líquida de reprodução; r_m = razão infinitesimal de aumento e λ = razão finita de aumento. Para cada parâmetro avaliado, valores seguidos pela mesma letra na linha não difere estatisticamente entre si (P > 0,05).

4.3.2 Sobrevivência larval de linhagens heterozigóticas de *S. frugiperda* em simulação de alimentação larval em não-Bt e Bt

As linhagens SUS ♀ × RR-2 ♂; SUS ♂ × RR-2 ♀; SUS ♀ × RR-3 ♂ e SUS ♂ × RR-3 ♀ apresentaram sobrevivência larval variando de 88 a 95% após 16 dias alimentando-se exclusivamente de milho isolinha não-Bt, apresentando uma viabilidade de pupa e adulto de 100% (Tabela 20 e 21). Contudo, neonatas em T-1 (primeiro instar) sobreviveram menos de 2 dias (100% de mortalidade) para ambos os cruzamentos recíprocos, quando alimentadas somente com folhas de milho YieldGard VT PRO™ ou PowerCore™ (Tabela 20 e 21; Figura 11). Entretanto, lagartas de *S. frugiperda* de todas as linhagens heterozigóticas do primeiro (T-2) (segundo instar) ao (T-7) sexto instar larval apresentaram elevada taxa de sobrevivência em função do tempo e do instar específico quando da alimentação em folhas de milho YieldGard VT PRO™ ou PowerCore™ (Tabela 20 e 21; Figura 11). A menor sobrevivência larval foi observada no tratamento (T-2) variando de 11 a 39%, em que as lagartas se encontravam no segundo instar larval (Tabela 20 e 21; Figura 11). No entanto, a sobrevivência larval foi aumentando gradualmente em função do tempo e do desenvolvimento das lagartas, com sobrevivência variando de 63 a 78% em lagartas de sexto instar para todas as linhagens testadas quando alimentadas com milho YieldGard VT PRO™ ou PowerCore™ (Tabela 20 e 21; Figura 11). Das lagartas sobreviventes de cada linhagem heterozigótica houve ≈ 100% de viabilidade de pupa e adulto, ou seja, todas as lagartas que chegaram ao último instar larval viraram pupa e, conseqüentemente, geraram adultos após a simulação da alimentação com folhas de milho YieldGard VT PRO™ ou PowerCore™ (Tabela 20 e 21).

Tabela 20 - Porcentagem acumulada de sobrevivência de lagartas heterozigóticas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho YieldGard VT PROTM e isolinha não-Bt

Tempo	Alimentação (dias) ^a		% Sobrevivência larval a cada 2 dias										% Pupa ^b	% Emergência ^b
	Isolinha não-Bt	YieldGard VT PRO™	0	2	4	6	8	10	12	14	16			
Linhagem SUS ♀ × RR-2 ♂														
TC	Somente	-	100	100	100	95	95	95	95	95	95	95	95	
T1	-	Somente	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T2	2	14	100	100	17	16	13	13	11	11	11	11	11	
T3	4	12	100	100	100	78	34	25	16	16	16	14	14	
T4	6	10	100	100	100	100	39	39	34	34	34	28	28	
T5	8	8	100	100	100	100	100	48	39	34	34	33	32	
T6	10	6	100	100	100	100	100	63	50	44	28	28	28	
T7	12	4	100	100	100	94	94	94	94	78	78	75	75	
Linhagem SUS ♂ × RR-2 ♀														
TC	Somente	-	100	100	100	95	95	95	95	95	95	95	95	
T1	-	Somente	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T2	2	14	100	100	36	27	17	17	17	16	11	11	11	
T3	4	12	100	100	100	78	34	25	22	22	16	16	16	
T4	6	10	100	100	100	100	55	47	47	44	31	31	30	
T5	8	8	100	100	100	100	100	63	59	59	34	31	30	
T6	10	6	100	100	100	100	100	86	86	78	28	28	28	
T7	12	4	100	100	100	94	94	94	94	86	78	63	63	

^aForam testadas 64 lagartas por tratamento; ^bPorcentagem de pupação e emergência relativo ao número inicial de insetos.

Tabela 21 - Porcentagem acumulada de sobrevivência de lagartas heterozigóticas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho PowerCore™ e isolinha não-Bt.

Tempo	Alimentação (dias) ^a		% Sobrevivência larval a cada 2 dias									% Pupa ^b	% Emergência ^b
	Isolinha não-Bt	PowerCore™	0	2	4	6	8	10	12	14	16		
Linhagem SUS ♀ × RR-3 ♂													
TC	Somente	-	100	100	88	88	88	88	88	88	88	88	88
T1	-	Somente	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	2	14	100	100	16	16	9	6	6	6	6	6	6
T3	4	12	100	100	92	30	20	19	19	19	19	19	19
T4	6	10	100	100	95	91	36	22	19	19	19	19	19
T5	8	8	100	100	94	88	80	50	47	31	31	31	29
T6	10	6	100	100	89	86	86	84	39	34	34	31	31
T7	12	4	100	100	89	78	78	69	66	75	75	70	70
Linhagem SUS ♂ × RR-3 ♀													
TC	Somente	-	100	100	100	100	95	95	95	95	95	95	95
T1	-	Somente	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	2	14	100	89	50	45	42	42	42	39	39	39	39
T3	4	12	100	100	100	86	66	63	59	23	23	23	23
T4	6	10	100	100	100	100	67	59	56	39	39	39	39
T5	8	8	100	100	100	100	100	69	59	33	33	33	33
T6	10	6	100	100	100	100	100	95	78	34	34	34	32
T7	12	4	100	100	100	100	100	100	94	78	78	78	78

^aForam testadas 64 lagartas por tratamento; ^bPorcentagem de pupação e emergência relativo ao número inicial de insetos.

Figura 11 - Sobrevivência larval de linhagens heterozigóticas em simulação de alimentação larval em instar específico com folhas de milho isolinha não-Bt e Bt. (A e B) YieldGard VT PROTM e (C e D) PowerCoreTM

4.4 Discussão

As linhagens resistentes RR-2 e RR-3 às tecnologias de milho YieldGard VT PRO e PowerCoreTM, respectivamente, e heterozigóticas apresentaram similar período de desenvolvimento larval havendo uma pequena redução, mas significativa, na viabilidade larval da linhagem resistente, quando comparado com a linhagem suscetível. Também não houve diferenças significativas no peso de pupas entre as linhagens resistentes, heterozigotos e suscetível o que possivelmente não afetaria a fecundidade e fertilidade. No entanto, os insetos das linhagens heterozigóticas e resistentes apresentaram pequena redução na capacidade reprodutiva (fecundidade), quando comparados aos indivíduos suscetíveis. De acordo com WU; LI (2002), a menor fecundidade em genótipos heterozigotos pode ser

afetada pelas diferenças genéticas das linhagens parentais, o que ajuda a explicar a diferença em relação aos suscetíveis.

As diferenças em alguns parâmetros biológicos afetaram negativamente alguns parâmetros de tabela da vida de fertilidade das linhagens resistentes, que apresentaram menor capacidade de aumento populacional, não afetando a duração entre gerações. A pequena redução no desempenho reprodutivo das linhagens heterozigóticas e resistentes indica a existência de um baixo custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, o qual parece ser uma característica recessiva. De acordo com GASSMANN et al. (2009), a existência de fraco custo adaptativo pode ser explicado pela intensa pressão de seleção exercida sobre a linhagem resistente em laboratório, que pode ter ocasionado a seleção de alelos da resistência com efeito pleiotrópico ou de genes modificadores, os quais podem estabilizar a resistência na ausência de pressão de seleção, diminuindo os possíveis efeitos do custo adaptativo. Também podem estar associados ao maior vigor híbrido dos heterozigotos, os quais podem suportar condições adversas com maior facilidade (VÉLEZ et al., 2013b).

A existência de fraco custo adaptativo associado à resistência também foi reportada para diversas pragas-alvo de proteínas Bt expressas em plantas transgênicas, como para *Helicoverpa armigera* (MAHON; YOUNG, 2010; CAO et al., 2014), *Ostrinia nubilalis* (PEREIRA; STORER; SIEGFRIED, 2011), *Diabrotica virgifera virgifera* (OSWALD et al., 2012), *Busseola fusca* (KRUGER et al., 2014), *S. frugiperda* (BLANCO et al., 2010; VÉLEZ et al., 2014b; JAKKA et al., 2014) e *Diatraea saccharalis* (ZHANG et al., 2014). Em contraste, alguns estudos demonstraram a ocorrência de elevado custo adaptativo para *Plutella xylostella* (GROETERS et al., 1994), *Plodia interpunctella* (OPPERT et al., 2000), *Trichoplusia ni* (JANMAAT; MYERS, 2003) e *Helicoverpa armigera* (AKHURST et al., 2003).

O fraco custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ é um aspecto negativo para o sucesso do MRI. A existência de baixo custo adaptativo observada neste estudo, e a Cry1F (VÉLEZ et al., 2013b; JAKKA et al., 2014), em associação com a evolução da resistência ao milho Cry1F no Brasil (FARIAS et al., 2014a), potencialmente aumenta o risco de evolução da resistência dessa espécie às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e Powercore™, uma vez que as proteínas Cry1A.105 e Cry1F compartilham o mesmo sítio de ação, exibindo grande potencial de resistência cruzada (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013). Além disso, para Cry1F também foi reportada uma alta frequência de alelos da resistência em populações de campo de

S. frugiperda do Brasil (FARIAS et al., 2014b). Em Puerto Rico, a falta de custo adaptativo de *S. frugiperda* associado a Cry1F contribuiu para que a frequência do alelo da resistência fosse alta a campo (maior que 13%) (VÉLEZ et al., 2013b). Isso é um indicativo de que a frequência do alelo da resistência a Cry1A.105 pode ser maior do que o esperado em populações de *S. frugiperda* no campo. Se essa hipótese for verdadeira, isso ajuda a explicar o baixo custo adaptativo de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e Powercore™ indicando que a frequência do alelo da resistência pode permanecer estável em populações de campo, mesmo na ausência de pressão de seleção.

No entanto, uma das grandes vantagens da utilização das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, expressas nas tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ é ocasionar a recessividade completa dos indivíduos heterozigóticos, principais responsáveis pela dispersão de alelos e, contribuir para a evolução da resistência. Esse é um pressuposto básico da estratégia de alta dose/refúgio, em que a expressão da proteína inseticida deve ocorrer em nível suficientemente alto para garantir a mortalidade dos indivíduos de genótipo heterozigoto (TABASHNIK et al., 2004). Entretanto, a toxicidade do milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ diminuiu significativamente a partir de lagartas de 2º instar larval. Essa constatação demonstra que os indivíduos heterozigóticos apresentaram mudanças na dominância funcional da resistência, passando a ter vantagens adaptativas com o crescimento larval (TABASHNIK, 1994). A diminuição da suscetibilidade larval e aumento da dominância funcional com o desenvolvimento larval dos indivíduos heterozigóticos nos instares avançados associado com a mobilidade larval limita a estratégia de “refúgio no saco” para o manejo de *S. frugiperda* no campo, pois lagartas heterozigóticas que se alimentarem de plantas não-Bt, não serão afetadas biologicamente pelo baixo custo adaptativo e, ao movimentar-se para plantas Bt, não serão mortas, acarretando em aumento na frequência de indivíduos heterozigóticos possibilitando rapidamente a evolução da resistência.

Devido ao aumento da dominância funcional dos indivíduos heterozigóticos, baixo custo adaptativo associado à resistência e elevada mobilidade larval de *S. frugiperda*, a mistura de semente (milho não-Bt + Bt) pode ser prejudicada, uma vez que, inicialmente os insetos podem se desenvolver em plantas de milho não-Bt e, posteriormente, movimentarem-se para plantas Bt, acarretando na diminuição da suscetibilidade e aumento da sobrevivência larval, acelerando a evolução da resistência através da migração de alelos resistentes na população. Estes fatos podem ocasionar em um risco significativo de *S. frugiperda* em evoluir para a resistência às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, tornando o

manejo da resistência de *S. frugiperda* a estes eventos uma tarefa extremamente desafiadora no atual sistema de produção de cultivos do Brasil.

4.5 Conclusões

- Há custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ baseado em parâmetros biológicos. No entanto, os indivíduos heterozigotos são igualmente adaptados à linhagem suscetível de referência na ausência da pressão seletiva.
- A dominância funcional da resistência de *S. frugiperda* para às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ é completamente recessiva para neonatas. No entanto, há um aumento significativo na sobrevivência larval de heterozigotos quando as lagartas iniciaram a alimentação em YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ do segundo ao sexto instar larval.

Referências

- AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 4, p. 1290-1299, 2003.
- ANDOW, D.A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.
- BLANCO, C.A.; PORTILLA, M.; JURAT-FUENTES, J.L.; SÁNCHEZ, J.F.; VITERI, D.; VEGA-AQUINO, P.; TERÁN-VARGAS, A.P.; AZUARA-DOMÍNGUEZ, A.; LÓPEZ Jr., J.D.; ARIAS, R.; ZHU, Y.C.; LUGO-BARRERA, D.; JACKSON, R. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Southwestern Entomologist**, Coit Road, v. 35, n. 3, p. 409-415, 2010.
- CAPRIO, M.A. Source-sink dynamics between transgenic and non-transgenic habitats and their role in the evolution of resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 3, p. 698-705, 2001.
- CARRIÈRE, Y.; DELAND, J.P.; ROFF, D.A.; VINCENT, C. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 258, n. 1351, p. 35-40, 1994.
- CARROLL, M.W.; HEAD, G.P.; CAPRIO, M. When and where a seed mix refuge makes sense for managing insect resistance to Bt plants. **Crop Protection**, Guildford, v. 38, n. 2, p. 74-79, 2012.

CAO, G.; FENG, H.; GUO, F.; WU, K.; LI, X.; LIANG, G.; DESNEUX, N. Quantitative Analysis of fitness costs associated with the development of resistance to the Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 5629, p. 1-7, 2014.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, n. 2, p. 150-158, 2014a.

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

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

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

GROETERS, F.R.; TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Evolution**, Lancaster, v. 48, n. 1, p. 197-201, 1994.

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

HUANG, F.; 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**, Sussex, v. 67, n. 10, p. 1269–1276, 2011.

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

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 1, p. 342-351, 2014.

JANMAAT, A.F.; MYERS, J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 270, n. 1530, p. 2263-2270, 2003.

KRUGER, M.; RENSBURG, J.B.J.; VAN DEN BERG, J. No fitness costs associated with resistance of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically modified Bt maize. **Crop Protection**, Guildford, v. 55, n. 3, p. 1-6, 2014.

MAHON, R.J.; YOUNG, S. Selection experiments to assess fitness costs associated with Cry2Ab resistance in *Helicoverpa armigera*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 3, p. 835-842, 2010.

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

OSWALD, K.J.; FRENCH, B.W.; NIELSON, C.; BAGLEY, M. Assessment of fitness costs in Cry3Bb1-resistant and susceptible western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) laboratory colonies. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 136, n. 10, p. 730-740, 2012.

OPPERT, B.; HAMMEL, R.; THORNE, J.E.; KRAMER, K.J. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 96, n. 3, p. 281-87, 2000.

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, n. 1-2, p. 17-24. 2011.

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

ROUSH, R.T.; SHELTON, E.A.M. Assessing the odds: The emergence of resistance to *Bt* transgenic plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 9, p. 816-817, 1997.

SAS INSTITUTE INC. **Statistical analysis system: getting started with the SAS learning**. SAS Institute, Cary, NC. 2000.

SHELTON, A. M.; TANG, J.D.; ROUSH, R.T.; METZ, T.D.; EARLE, E.D. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 339-342, 2000.

SISTERSON, M.S.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to transgenic Bt crops: interactions between movement and field distribution. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 6, p. 1751-1762, 2005.

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

TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; GROETERS, F.R.; MOAR, W.J.; JOHNSON, M.W.; LUO, K.; ADANG, M.J. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington , v. 91, n. 10, p. 4120-4124, 1994.

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 1999-2002, 2008.

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y.B.; UNNITHAN, D.C.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T.J.; MORIN, S. Shared genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 97, n. 3, p. 721-726, 2004.

VÉLEZ, A.M.; SPENCER, T.A.; ALVES, A.P.; CRESPO, A.L.B.; SIEGFRIED, B.D. Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 138, n. 5, p. 315-325, 2013.

ZHANG, L.; LEONARD, R.B.; CHEN, M.; CLARK, T.; ANILKUMAR, K.; HUANG, F. Fitness costs and stability of Cry1Ab resistance in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 117, n. 3, p. 26-32, 2014.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A evolução da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ é uma das principais ameaças para a sustentabilidade destas tecnologias no campo. No presente trabalho, foram verificados que os eventos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ não atendem as premissas básicas da estratégia de piramidação de genes e há indícios fortes de resistência cruzada entre as proteínas de Bt, observado a partir da redução significativa na suscetibilidade de *S. frugiperda* as proteínas que compartilham o mesmo modo de ação, ou seja, Cry1F e Cry1A.105. No entanto, não foi observada a presença de indícios de resistência cruzada destas proteínas a Cry2Ab2. Sendo assim, possivelmente a expressão da proteína Cry2Ab2 não é alta o suficiente para o controle de indivíduos resistentes a Cry1F/Cry1A.105. O alto risco de evolução da resistência às tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ foi verificado devido à elevada frequência de indivíduos fenotipicamente resistentes em condições de campo, a partir da técnica de “F₂ screen”, principalmente, para a região Central do Brasil. Esses fatores tornam-se mais preocupantes quando levamos em conta o cenário agrícola brasileiro, onde o milho é cultivado em praticamente duas épocas de cultivos, com sobreposição de culturas que expressam proteínas de Bt que compartilham o mesmo modo de ação e com baixa atividade biológica sobre a praga. Contudo, uma das grandes vantagens das tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ é a expressão de alta dose das proteínas inseticidas nos tecidos foliares das plantas, acarretando na mortalidade completa dos indivíduos heterozigotos, tornando a resistência funcionalmente recessiva deste indivíduos, que são os principais responsáveis pela dispersão de alelos da resistência a campo. No entanto, esta estratégia somente é eficiente quando associado com a presença de áreas de refúgios com plantas de milho não-Bt externamente a área com milho Bt. O presente trabalho demonstra que a expressão de alta dose das proteínas de Bt, conjuntamente com a presença de áreas de refúgios, são fatores positivos para o programas de Manejo de Resistência de Insetos (MRI) para às tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ para preservar a vida útil destes eventos de milho Bt. Portanto, existe a necessidade de conscientização das empresas detentoras das tecnologias de Bt e produtores rurais para a importância da implementação de áreas de refúgio para programas de MRI, uma vez com que a elevada frequência fenotípica de indivíduos resistentes, capacidade de resistência cruzada entre proteínas inseticidas, a ausência de custo adaptativo dos indivíduos heterozigotos associado com o aumento da dominância funcional da resistência com o desenvolvimento larval podem ocasionar um risco significativo de *S. frugiperda* em evoluir para a resistência às tecnologias de milho YieldGard

VT PRO™ e PowerCore™. Portanto, a aplicação cuidadosa das estratégias de MRI deve salvaguardar o valor das tecnologias de milho Bt no campo, uma vez com que os riscos de evolução da resistência são bastante altos.