

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

Efeitos da movimentação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em sistemas compostos por cana-de-açúcar geneticamente modificada e refúgio

Caroline Izabel Ribeiro Sakuno

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

**Piracicaba
2021**

Caroline Izabel Ribeiro Sakuno
Engenheira Agrônoma

**Efeitos da movimentação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera:
Crambidae) em sistemas compostos por cana-de-açúcar geneticamente modificada
e refúgio**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **CAROLINA REIGADA MONTOYA**

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

Piracicaba
2021

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

Sakuno, Caroline Izabel Ribeiro

Efeitos da movimentação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em sistemas compostos por cana-de-açúcar geneticamente modificada e refúgio / Caroline Izabel Ribeiro Sakuno. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

84 p.

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

1. Oviposição 2. Broca da cana-de-açúcar 3. Parâmetros bio-demográficos 4. Transgênica I. Título

Dedico,

Ao meu pai

Gilberto Tochihiko Sakuno

(in memorian)

A minha mãe
Amélia Salete Ribeiro Sakuno
e ao meu companheiro
Adam Douglas Sebastião,
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir vivenciar essa incrível jornada. A Ele que me abençoa e me dá coragem todos os dias: muito obrigada!

À minha orientadora Profa. Dra. Carolina Reigada Montoya, por todos os ensinamentos, correções, paciência, apoio e pelo imensurável amadurecimento acadêmico que me proporcionou.

Ao Adam, pela parceria na vida e pelo amor dedicado a mim em tempos tão difíceis.

A minha mãe Amélia, agricultora miúda das Gerais, mulher forte, bondosa, simples e determinada. Por ser minha inspiração – e por costurar as gaiolas utilizadas deste trabalho.

Aos irmãos Gabriela Sakuno e Natanael Sakuno por serem sempre meu refúgio.

Ao João Vitor Ribeiro Silva e ao professor Dr. Idemauro A. R. de Lara do Departamento de Ciências Exatas ESALQ/USP pela parceria na análise estatística dos dados.

Ao meu mentor científico Alfredo Seiiti Urashima, por me ensinar o caminho das pedras e por ser um dos maiores exemplos de pessoa e profissional que eu poderia ter conhecido.

Ao Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) por me permitir desenvolver essa pesquisa, é um privilégio e um orgulho fazer parte deste time.

As companheiras de trabalho Juliana Bombecini, Karen Komada, Josemeri Jamielniak, Gabriela Alves e Taciana Kuhn, que contribuíram de forma fundamental com essa pesquisa. Aos companheiros, Juliano Martins, Wladecir Oliveira, Erich Stingel, Marcio Tavares, João Paulo, Francisco Araújo e Antônio Kaupert Neto por todo suporte neste trabalho.

Ao quarteto fantástico, Serena Oliveira, Vinicius Teodoro e Bruna Queiroz que, mesmo distantes, vibram comigo em todas as minhas conquistas.

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP por todo o conhecimento transmitido e por lecionarem com paixão e amor. É uma honra aprender com vocês.

À equipe da biblioteca (ESALQ/USP), em especial, à Eliana Maria Garcia pelas orientações e auxílio.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para construção deste trabalho.

Let everything happen to you:

Beauty and terror.

Just keep going.

No feeling is final.

Rainer Maria Rilke

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Revisão bibliográfica	14
1.1.1. <i>Diatraea saccharalis</i>	14
1.1.2. Bioecologia de <i>Diatraea saccharalis</i> como fator de influência na evolução de resistência	15
1.1.3. Movimentação de <i>D. saccharalis</i> em paisagens agrícolas.....	16
1.1.4. Cana-de-açúcar modificada.....	17
Referências	18
2. EFEITOS DA PRESENÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR BT E NÃO-BT NA MOVIMENTAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE OVOS EM <i>Diatraea saccharalis</i> (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE).....	25
Resumo.....	25
Abstract	25
2.1. Introdução	26
2.2. Material e métodos.....	28
2.2.1. Material vegetal para estudos em casa-de-vegetação	28
2.2.2. Criação de <i>Diatraea saccharalis</i>	29
2.2.3. Preparo dos grupos de insetos	29
2.2.4. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de ovos de <i>D. saccharalis</i> nas plantas hospedeiras em casa-de-vegetação	30
2.2.5. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de machos de <i>D. saccharalis</i> em campo.....	31
2.3. Análises estatísticas.....	33
2.3.1. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de ovos de <i>D. saccharalis</i> nas plantas hospedeiras em casa-de-vegetação	33
2.3.2. Análises movimentação em campo	34
2.4. Resultados	35
2.4.1. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de ovos de <i>D. saccharalis</i> nas plantas hospedeiras em casa-de-vegetação	35

2.4.1.1. Análise da quantidade de postura acumulada após 72 horas.....	35
2.4.1.2. Análise longitudinal da distribuição de ovos.....	38
2.4.2. Análise Movimentação em campo	41
2.5. Discussão	43
2.6. Conclusões.....	46
Referências	45
3. EFEITO DA CANA-DE-AÇÚCAR Bt e ISOLINHA NÃO-BT NO DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS E TEMPO DE EMERGÊNCIA DE ADULTOS DE <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae).....	53
Resumo	53
Abstract.....	53
3.1. Introdução.....	54
3.2. Material e Métodos.....	56
3.2.1. Criação de <i>Diatraea saccharalis</i>	56
3.2.2. Bioensaios com tecido foliar	56
3.2.3. Biologia de <i>D. saccharalis</i> em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-Bt.....	57
3.2.4. Análise estatística	58
3.2.4.1. Bioensaios com tecido foliar	58
3.2.4.2. Biologia de <i>D. saccharalis</i> em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-Bt..	58
3.3. Resultados.....	59
3.3.1. Bioensaios com tecido foliar	59
3.3.2. Biologia de <i>D. saccharalis</i> em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-Bt – Fase de imaturos	60
3.3.3. Biologia de <i>D. saccharalis</i> em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-Bt - Fase adulta	64
3.4. Discussão.....	66
3.5. Conclusões.....	70
Referências	70
4. PROPOSTA METODOLOGICA PARA AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) EM COLMOS CANA-DE-AÇÚCAR	75
Resumo	75
Abstract.....	75
4.1. Introdução.....	76

4.2. Material e métodos.....	77
4.2.1. Análise estatística.....	78
4.3. Resultados	78
4.4. Discussão	80
4.5. Conclusões	82
Referências.....	82

RESUMO

Efeitos da movimentação de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em sistemas compostos por cana-de-açúcar geneticamente modificada e refúgio

Atualmente, uma forma efetiva de controle de pragas empregada com sucesso em algumas culturas é a utilização de plantas geneticamente modificadas contendo genes Bt (*Bacillus thuringiensis*). Contudo, esta técnica de controle pode deixar de ser efetiva quando os insetos resistentes são selecionados. O uso de áreas de refúgio é uma estratégia dentro do Manejo da Resistência a Insetos, essa estratégia funciona como um reservatório de insetos adultos suscetíveis, capazes de se dispersar do campo de “refúgio” para o campo com plantio Bt, promovendo o acasalamento entre as duas populações. Neste contexto, para a melhor eficiência da aplicação do refúgio, é necessário entender o padrão de movimento dos adultos, bem como os efeitos das plantas Bt no ciclo de vida e na reprodução dos insetos, de maneira a estimar o potencial bio-ecológico da população da praga em ser selecionada a tecnologia Bt. Considerando a cultura da cana-de-açúcar e sua principal praga, a broca-da-cana *Diatraea saccharalis*, os objetivos deste estudo foram: (1) avaliar o potencial de dispersão de machos em campo e, através de sistemas experimentais que simularam áreas de refúgio, áreas de plantio Bt e borda entre refúgio e plantio Bt, avaliar o padrão de movimentação e distribuição de ovos de fêmeas de *D. saccharalis* ao longo de 72 h; (2) avaliar o tempo de desenvolvimento dos insetos em plantas Bt e não-bt, quantificando seus efeitos sobre as taxas de sobrevivência, tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos e a janela temporal / sincronia do períodos de emergência de machos e fêmeas adultas nas populações provenientes de plantas Bt e não-bt, visando quantificar a probabilidade de ocorrência de cópula entre indivíduos das duas populações; e (3) o desenvolvimento de uma metodologia para a avaliação e observação de parâmetros biológicos de *D. saccharalis* em seu substrato natural, a cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que as fêmeas de *D. saccharalis* tem baixa motilidade e distribuem seus ovos de maneira agregada, próxima as localidades que foram liberadas. Entretanto, os padrões de movimentação e distribuição de ovos e as taxas de oviposição ao longo de 72h diferiram nos três sistemas experimentais. A dispersão dos machos em campo ocorreu a uma distância de até 800 metros do ponto de origem. Os insetos, quando alimentados em cana-de-açúcar Bt apresentaram menores taxas de sobrevivência e duração do estágio imaturo maior em relação aos insetos alimentados com plantas não-bt. Consequentemente, os períodos de emergência entre machos e fêmeas foram assíncronos dentro da população Bt e entre as populações Bt e não-bt. O uso de dieta natural de colmos de cana-de-açúcar vedados com parafina permitiu a avaliação dos efeitos das variedades Bt e não-bt nos bioensaios deste estudo.

Palavras-chave: Capacidade de voo, Broca da cana, Cana Bt, Manejo da resistência

ABSTRACT

Effects of the movement of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) in systems composed of genetically modified and refuge sugarcane

Currently, the use of genetically modified plants containing Bt genes (*Bacillus thuringiensis*) is an effective form of pest control successfully used in some crops. However, this control technique may become ineffective when resistant insects are selected. The use of refuge areas is a strategy within the Insect Resistance Management, this strategy works as a reservoir of susceptible adult insects, capable of dispersing from the "refuge" field to the field with Bt planting, promoting mating between the two populations. In this context, for the best efficiency of refuge application, it is necessary to understand the pattern of movement of adults, as well as the effects of Bt plants on the life cycle and reproduction of insects, to estimate the bio-ecological potential of the population of the plague on being selected for Bt technology. Considering the sugarcane crop and its main pest, the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*, the objectives of this study were: (1) to evaluate the potential of male dispersion in the field and the pattern of movement and egg distribution of females over 72 h using experimental systems that simulated areas of refuge, areas of Bt planting and border between refuge and Bt planting; (2) to evaluate the development time of insects on Bt and non-bt plants, quantifying their effects on survival rates, developmental time of immature stages and the time window / synchrony of emergence periods of adult males and females in populations from Bt and non-Bt plants, in order to quantify the probability of copulation occurring between individuals of the two populations; and (3) to develop a methodology to evaluate and observe biological parameters of *D. saccharalis* on its natural substrate, sugarcane. The results showed that females of *D. saccharalis* have low motility and they distribute their eggs by aggregated way, close to the places that were released. However, egg movement and distribution patterns and oviposition rates over 72h differed in the three experimental systems. The dispersal of males in the field occurred at up to 800 meters from the point of origin. Insects, when fed on Bt sugarcane, had lower survival rates and longer immature stage duration compared to insects fed on non-Bt plants. Consequently, emergence periods between males and females were asynchronous within the Bt population and between the Bt and non-Bt populations. The use of a natural diet of sugarcane stalks sealed with paraffin allowed the evaluation of the effects of Bt and non-bt varieties in the bioassays of this study.

Keywords: Flight capability, Sugarcane borer, Bt sugarcane, Resistance management

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de biocombustível e açúcar, devido aos seus dois principais produtos derivados: álcool e açúcar. A produção de cana-de-açúcar aumentou significativamente nas últimas décadas (UNICA, 2019) e, conseqüentemente, também aumentaram as perdas por ataques da broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), a principal praga da cultura (VARGAS, et al 2015). Embora programas de melhoramento genético incrementem 1-2% de toneladas de cana por hectare (TCH) por ano (BURNQUIST, et. al. 2010), não há disponibilidade de genes resistentes para a broca da cana em germoplasma (ARVINTH et al., 2010) e seu controle depende principalmente de práticas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (CRISTOFOLETTI, 2018).

Uma forma efetiva de controle de pragas, empregada com sucesso em culturas como milho e soja, é a utilização de plantas geneticamente modificadas (OGM) contendo genes Bt (*Bacillus thuringiensis*) (KUMAR; CHANDRA e PANDEY, 2008). Devido à variabilidade e complexidade do genoma da cana-de-açúcar e sua produção comercial baseada na propagação de toletes ou na micropropagação *in vitro*, seguida de vários ciclos de soca, o desenvolvimento de variedades comercialmente resistentes foi alcançado apenas recentemente (CHEAVEGATTI-GIANOTTO, et al, 2018).

Em 2017 foi aprovado, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), o cultivo da primeira cana OGM portadora do gene CryAb (Bt) para resistência à broca-da-cana, CTC20BT, desenvolvida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Para o lançamento comercial foram plantados 400 hectares no primeiro ano (2017-2018) e 2000 hectares no ano subsequente (2018-2019). Em 2018, o segundo evento comercial, o CTC9001BT expressando a proteína Cry1Ac, recebeu autorização para ser comercializado em menos de um ano, um tempo recorde no Brasil (CTNBio, 2019).

O primeiro evento transgênico capaz de expressar a proteína Cry foi liberado comercialmente em 2007 no Brasil em sementes de milho contendo Cry1Ab (CTNBio, 2008). A tecnologia havia sido indicada para as principais pragas-alvo da cultura, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) e *D. saccharalis*. Ressalta-se que, de toda área implantada com a cultura do milho atualmente, mais de 93% expressam proteínas Bt (CÉLERES, 2019). Entretanto, esta alta adoção da tecnologia Bt, aliada com a falta de áreas de refúgio (plantas não-bt) e o intensivo sistema de produção de cultivos do Brasil, tem contribuído para a rápida seleção de indivíduos resistentes às proteínas Bt (OMOTO et al., 2016).

A resistência é um caso típico da evolução darwiniana, em que a contínua pressão de seleção aumenta a frequência relativa de indivíduos pré-adaptados da população do inseto-praga (GEORGHIOU, 1983). Desse modo, o gene que confere resistência a uma determinada tática de controle já pode existir numa dada população da espécie-praga, mesmo que tal agente de controle não tenha sido introduzido no controle da praga (FRENCH-CONSTANT, 2007). Nesse sentido, em relação a plantas Bt, a resistência de insetos se dá pela habilidade do indivíduo em completar o seu ciclo de vida, ou seja, ter sobrevivência desde o ovo à fase adulta, alimentando-se exclusivamente da planta Bt com a produção de descendentes férteis (ANDOW, 2008).

O primeiro caso de resistência à proteína Bt no Brasil foi detectado em *S. frugiperda* para a proteína Cry1F expressa em milho Herculex® em menos de quatro anos após a liberação do cultivo desse híbrido (FARIAS et al., 2014). Isso se deve, provavelmente, à redução na expressão do transportador ABCg5 na linhagem resistente, além da maior expressão de genes relacionados a detoxificação de xenobióticos, como por exemplo carboxilcolinesterases, glutationa-S-transferases e monoxigenases do citocromo P450 (DOMINGUES, 2016). Assim, com a inserção de novos cultivos transgênicos que expressam toxinas Bt no sistema brasileiro, surgiram dúvidas quanto aos riscos destas culturas promoverem ganho de resistência pelos insetos em regiões tropicais, já que estas condições permitem a intensificação agrícola, contribuindo para o aumento substancial no tamanho da população de insetos-praga (HOLLINGSWORTH, 2011). A utilização deste tipo de biotecnologia apresenta riscos, especialmente na indução de resistência por meio da pressão de seleção impostas às populações de insetos, tendo em vista que grande parte das áreas cultivadas é muito extensa (GOULD et al., 1997).

Para *D. saccharalis*, o primeiro relato de detecção do alelo de resistência Bt foi em 2004, em três populações do estado da Lousiana, Estados Unidos da América (EUA), em cultura de milho contendo a proteína Cry1Ab (HUANG e LEONARD, 2008). Ao contrário das cepas resistentes a Bt selecionadas em laboratório para outras espécies como de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Crambidae) (HUANG et al., 1997; CHAUFAX et al., 2001), a cepa resistente a Cry1Ab de *D. saccharalis* foi capaz de sobreviver e completar o desenvolvimento em plantas comerciais de milho Bt (HUANG et al., 2007; WU et al., 2007). Esta cepa de *D. saccharalis* mostrou um nível de resistência significativo à toxina Cry1Ab ativada por tripsina purificada, indicando que a resistência poderia estar presente em populações de campo e poderia oferecer riscos a tecnologias Bt (HUANG et al., 2007).

A evolução da resistência pode ser acelerada quando as táticas culturais de manejo da resistência são negligenciadas. Neste contexto, insere-se o Manejo da Resistência a Insetos (MRI), que é uma abordagem científica para o manejo de pragas em longo prazo, com vistas a ampliar a longevidade da tecnologia, de modo a beneficiar todas as partes envolvidas no processo produtivo (ONSTAD, 2013).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) abordou a preocupação com o desenvolvimento potencial de resistência exigindo que as empresas de sementes transgênicas desenvolvam e implementem um plano de manejo de resistência efetivo (OSTLIE et al. 1997; USEPA, 2001). Foi determinado a utilização da estratégia de alta dose / refúgio como um plano de manejo preventivo de resistência a insetos (MRI), em que se prevê que as plantas Bt expressem alta dose e sejam capazes de eliminar todos os insetos homozigotos suscetíveis (SS) e os insetos heterozigotos potenciais (RS). A USEPA também pressupõe que o refúgio da cultura convencional adjacente ao plantio Bt produza insetos suscetíveis (SS), que possam se acasalar com quaisquer insetos potencialmente resistentes (RR ou RS) que se desenvolva nos campos Bt. Para isso, a frequência do gene de resistência deve ser baixa e a resistência seja herdada como uma característica recessiva, ou seja, todos os descendentes resultantes (SS ou RS) devem ser suscetíveis às plantas Bt em altas doses. Para que essa estratégia funcione, os insetos adultos devem ser capazes de se dispersar do campo de “refúgio” para o campo com plantio Bt para que o acasalamento ocorra entre as duas populações (GOULD, 1994; OSTLIE et al., 1997; SHELTON et al., 2000).

Assim, para controlar uma praga com probabilidade de desenvolver resistência, é necessário medir quando, onde e como as larvas e adultos se alimentam, movimentam-se, acasalam e ovipositam dentro da paisagem (ONSTAD et al., 2011). Já que a movimentação exerce um papel fundamental na dispersão de genes de resistência, a compreensão do padrão de movimentação dos insetos se faz necessária.

Desta forma, a compreensão do padrão de movimentação de insetos adultos e da distribuição de seus ovos em paisagens compostas por plantas Bt e refúgio (plantas não-bt) passa a ser ponto chave para propor manejos adequados, visando retardar a evolução da resistência ao inseto alvo. Os objetivos do presente estudo foram: (a) Identificar o potencial de dispersão de machos de *D. saccharalis* em campo; Avaliar, através de sistemas experimentais que simulam áreas de refúgio (somente cana não-bt), áreas de plantio Bt e borda entre refúgio e plantio Bt, o padrão de movimentação de e distribuição de ovos de fêmeas de *D. saccharalis* nas variedades de cana-de-açúcar Bt e/ou não Bt ao longo de 72 h; Relacionar o padrão de movimentação de fêmeas adultas às taxas de oviposição nas plantas,

visando entender a relação entre o movimento das fêmeas e a escolha por sítio de oviposição (Capítulo 2); (b) Avaliar o tempo de desenvolvimento dos insetos nas plantas Bt e não-bt, quantificando seus efeitos sobre as taxas de sobrevivência e tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos; Quantificar a janela temporal de sincronia entre os períodos de emergência dos adultos nas populações provenientes de plantas Bt e não Bt, visando quantificar a probabilidade de ocorrência de cópula e o potencial para diluição da resistência da espécie em paisagens compostas por plantas Bt e refúgio (Capítulo 3); e (c) Desenvolver uma metodologia que possibilite a avaliação e observação de parâmetros biológicos de *D. saccharalis* em seu substrato natural, a cana-de-açúcar (Capítulo 4)

1.1. Revisão bibliográfica

1.1.1. *Diatraea saccharalis*

Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) é considerada a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil, sendo encontrada em praticamente toda extensão cultivada da cultura, cuja área plantada foi de aproximadamente 9 mil hectares em 2019/20 (CONAB, 2019). A lagarta de *D. saccharalis*, conhecida como broca da cana-de-açúcar, tem coloração branco-leitosa, com manchas de coloração castanhas em todo o corpo, cápsula cefálica marrom escura, três pares de pernas torácicas e quatro pares de falsas pernas abdominais, com cerca de 25 mm. O adulto é uma mariposa com as asas anteriores de coloração amarelo-palha com manchas mais escuras, lembrando dois “Vs” invertidos quando fechadas, e com asas posteriores esbranquiçadas. As fêmeas são ligeiramente maiores que os machos, possuindo abdômen volumoso e asas menos pigmentadas (BOTELHO e MACEDO, 2002).

Após o acasalamento, a fêmea deposita de 200 a 400 ovos, em ambas as faces das folhas verdes da cana-de-açúcar e nas bainhas. A eclosão das lagartas ocorre de quatro a nove dias, a depender da temperatura ambiental. Inicialmente, as lagartas neonatas alimentam-se do parênquima das folhas, movimentando-se para a região da bainha à procura de abrigo. Permanecem nesta região por cerca de sete a dez dias, alimentando-se pela raspagem da bainha da folha ou da casca dos entrenós jovens. Após a primeira ecdise, as lagartas perfuram a casca do colmo, penetrando em seu interior. O inseto abre galerias no interior dos colmos, geralmente no sentido ascendente, à medida que se alimenta. No interior do colmo, a lagarta

passa por aproximadamente seis ecdises. Esta é a fase do desenvolvimento em que o inseto provoca danos econômicos à cultura (DINARDO-MIRANDA et al., 2014).

A fase larval dura cerca de 50 dias, podendo variar em função das condições ambientais. Próximo à pupação, a lagarta abre um orifício na casca do colmo, por onde o inseto adulto emergirá, e o fecha parcialmente com fios de seda e restos de sua alimentação. Assim protegida, a lagarta passa à fase de pupa, cuja duração é de cerca de 10 dias. Após a emergência, as mariposas têm longevidade de aproximadamente sete dias (TERÁN et al., 1983; BOTELHO e MACEDO, 2002).

A duração total do ciclo do inseto varia entre 60 e 90 dias, sendo que em temperaturas mais baixas e pouca umidade pode ocorrer alongamento do ciclo da praga, ficando a lagarta alojada no interior do colmo de cana-de-açúcar. De maneira geral, ocorrem 4 ou 5 gerações de *D. saccharalis* por ano no Brasil (DINARDO-MIRANDA et al., 2014).

1.1.2. Bioecologia de *Diatraea saccharalis* como fator de influência na evolução de resistência

O entendimento de aspectos bioecológicos do inseto alvo tem grande importância para a elaboração e refinamento das estratégias utilizadas no manejo da resistência de insetos. O conhecimento do hábito alimentar das fases do inseto, eficiência de hospedeiros alternativos como substratos alimentares, capacidade de dispersão, fecundidade, refúgios para indivíduos suscetíveis e número de gerações da praga por ano são aspectos de grande importância para o estudo da resistência de insetos (GEORGHIOU e TAYLOR, 1977).

Em um estudo de frequência de cópula desenvolvido por Guevara (1980) foi observado em condições de laboratórios, que machos de *D. saccharalis* não copularam mais de uma vez com a mesma fêmea, e que nenhuma fêmea copulou mais de uma vez quando confinada com até quatro machos. Em outro estudo de frequência de acasalamento, fêmeas de *D. saccharalis* capturadas em campo através do uso de armadilhas luminosas foram dissecadas para determinação do número de espermátóforo na bursa copulatrix. De um total de 693 fêmeas, a contagem de espermátóforo indicou que 93% das fêmeas acasalaram-se apenas uma vez, 2% acasalaram-se duas vezes e 5% não se acasalaram (PEREZ e LONG, 1963).

Quanto ao número de gerações ao ano, foi estimado através de estudos de exigências térmicas que o inseto pode apresentar até cinco gerações completas na região de Piracicaba, Ribeirão Preto, Jaú e Pindorama, com exigências térmicas das fases de ovo, lagarta, pupa e

adultos de 67,47; 516,96; 126,08 e 172,02 graus-dias, respectivamente, e as temperaturas bases dos três estágios foram 11,2; 7,4 e 10,6°C (MELO e PARRA, 1988).

Já a dispersão de *D. saccharalis* na área de plantio se dá por meio do voo de insetos na fase adulta. Existe uma tendência de os insetos permanecerem na mesma área, em condições de baixos níveis populacionais, quando não existe competição por alimento, ao passo que maior estímulo à dispersão ocorre nas condições inversas. Os adultos apresentam hábito noturno e comportamento fototrópico positivo, sendo atraídos por armadilhas luminosas (MENDES et al., 1978). Os resultados obtidos em experimentos de campo, para estudos de dispersão de adultos machos de *D. saccharalis* tem demonstrado que temperatura, umidade relativa e precipitação não interferem categoricamente na captura dos machos liberados ou selvagens presentes nas áreas experimentais. Além disso, foi verificado que somente a direção do vento exerce um papel fundamental na dispersão dos insetos, sendo que o maior número de insetos voa a favor do vento (CAIXETA, 2010).

1.1.3. Movimentação de *D. saccharalis* em paisagens agrícolas

O conhecimento do padrão de movimento de insetos em grandes áreas é fundamental para o manejo de pragas, especialmente porque são escassas informações sobre onde, quando e por que as pragas se deslocam (ALLEN e SINGH, 2016). Neste sentido, há poucos estudos a respeito da dispersão da *D. saccharalis* no Brasil, sendo necessárias mais informações para a compreensão do comportamento de voo deste inseto em campo e para o estabelecimento de estratégias de manejo de resistência em paisagens Bt consistentes. Em um estudo de dispersão de insetos adultos marcados de *D. saccharalis* em condições de campo, utilizando-se armadilhas de feromônios contendo fêmeas virgens para atração de machos marcados com esmalte, foi estimado uma dispersão média de 42,5 metros por dia (BOTELHO et al, 1978).

Uma informação importante a respeito da dispersão da praga é a capacidade de voo que os adultos apresentam em cada geração. Para obter estas informações, experimentos de campo foram conduzidos com insetos marcados com corantes, liberados e capturados, verificando-se a captura de adultos em até 800 m dos pontos de liberação. Os resultados indicaram que as áreas de refúgio devem estar situadas a, no máximo, 800 m de distância entre si, visando permitir o encontro de insetos suscetíveis e insetos eventualmente resistentes da área contendo cana-de-açúcar geneticamente modificada (CAIXETA, 2010). Este potencial de dispersão de *D. saccharalis* denota a necessidade de estudos mais profundos sobre o comportamento de voo da praga, através do posicionamento de armadilhas com maior

distância entre si e do ponto de liberação, e em maior quantidade, para mensurar com mais acurácia a capacidade de voo desses insetos (QURESHI et al., 2005).

1.1.4. Cana-de-açúcar modificada

O Brasil é considerado líder no ranking de exportações de cana-de-açúcar, com 8,9 milhões de hectares plantados e com uma safra de mais de 600 milhões de toneladas produzidas ao ano, correspondendo a 45% da produção mundial (CTNbio, 2019). Em contrapartida aos ganhos de produção, a broca-da-cana (*D. saccharalis*), considerada a principal ameaça às plantações de cana-de-açúcar no Brasil, tem provocado perdas de até R\$5 bilhões por ano, impactando significativamente a qualidade do açúcar e aumentando os custos devido à necessidade de uso de inseticidas. Por isso, nos últimos anos, os principais esforços do setor foi conter estes problemas através do uso de variedades de cana resistentes à praga.

A primeira cana-de-açúcar geneticamente modificada foi aprovada pela Comissão Nacional de Biossegurança de Produtos Geneticamente Modificados (KKHPRG) em 2013, na Indonésia, para a tolerância à seca (International Service for Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2013). No Brasil, a CTNbio, Autoridade Brasileira de Biossegurança, outorgou a aprovação para as quatro primeiras variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificada no país: CTC20BT (CTB141175/01), CTC9001BT (CTC91087-6), CTC9003BT (CTC93209-4) e a CTC7515 (CTC75064) para cultivo e uso alimentar no país desenvolvidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) (Tabela 1). As variedades foram desenvolvidas para expressar uma proteína da classe Cry1A com o objetivo de controlar a broca da cana-de-açúcar.

Tabela 1. Plantas geneticamente modificadas de cana-de-açúcar que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* liberadas para cultivo no Brasil (Fonte: CTNBio, fevereiro, 2021).

OGM	Nome comercial	Identificador único	Eventos	Organismo doador	Característica	Proteína
Cana-de-açúcar	CTC20BT	CTC-14117-4	CTB14117 5/01-A	<i>B. thuringiensis</i>	Resistência a insetos	Cry1Ab
	CTC9001BT	CTC91087-6	CTC91087- 6	<i>B. thuringiensis</i>	Resistência a insetos	Cry1Ac
	CTC93209-4	CTC93209-4	CTC93209- 4	<i>B. thuringiensis</i>	Resistência a insetos	Cry1Ac
	CTC75064-3	***	CTC75064- 3	<i>B. thuringiensis</i>	Resistência a insetos	Cry1Ac
	***	***	CTC79005- 2	<i>B. thuringiensis</i>	Resistência a insetos	Cry1Ac

*** Aguardam denominações Última Atualização: 07/12/2020

A partir do exposto, o manejo da resistência à cultura da cana-de-açúcar, deve considerar os aspectos bioecológicos de *D. saccharalis* que possam favorecer a seleção de insetos resistentes. Assim, este trabalho visa fornecer subsídios a respeito dos parâmetros bioecológicos de *D. saccharalis*, através do uso de sistemas experimentais para futuros estudos aplicados à paisagens agrícolas reais, para retardar a seleção de indivíduos resistentes a cana-de-açúcar geneticamente modificada que expressam proteínas inseticidas.

Referências

- ALLEN, ANDREW M.; SINGH, NAVINDER J. Linking movement ecology with wildlife management and conservation. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 3, n. JAN, p. 1–13, 2016.
- ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 142-199, 2008.
- ARVINTH, S. et al. Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. **Plant Cell Rep.** 29, 383– 395, 2010.

BOTELHO, P. S. M.; MENDES, A. C.; MACEDO, N.; SILVEIRA NETO, S. Cálculo da dispersão da broca cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Brasil Açucareiro**, v. 92, p. 9-14, 1978.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (ed.). **Controle Biológico no Brasil**: parasitóides e predadores. SãoPaulo: Manole cap. 25, p. 409-425, 2002.

BURNQUIST, W. L., REDSHAW, K. & GILMOUR, R. F. Evaluating sugarcane R & D performance: Evaluation of three breeding programs. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.** 27, 1–15, 2010.

CAIXETA, D. F. **Dispersão de machos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar.** 48 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal-SP, 2010.

CÉLERES. **Informativo de biotecnologia céleres.** v. IB 19.01. Disponível em: http://www.celeres.com.br/wp-content/uploads/2019/11/BoletimBiotecnologiaCéleres_Novembro2019-2.pdf, 2019.

CHAUFAUX, J.; M. SÉGUIN, J. J.; SWANSON, D.; BOURGUET, B. D.; SIEGFRIED. Chronic exposure of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology** 94: 1564-1570, 2001.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; GENTILE A.; OLDEMBURGO, D. A.; MERHEB, G. A.; SERENO M. L.; LIRETTE, R. P.; FERREIRA, T.H.S.; OLIVEIRA, W.S. Lack detection of Bt sugarcane Cry1Ab and NptII DNA and proteins in sugarcane processing products including raw sugar. **Front. Bioeng. Biotechnol.** 6, 2018.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** V. 7 - Safra 2020/21, n.3 - Terceiro levantamento, dezembro de 2020. p. 62, 2020.

CRISTOFOLETTI, P. T.; KEMPER, E. L.; CAPELLA, A. N.; CARMAGO, S. R.; CAZOTO, J. L.; FERRARI, F.; GALVAN, T. L.; GAUER, L.; MONGE, G. A.; NISHIKAWA, M. A.; SANTOS, N. Z.; SEMEAO, A. A.; SILVA, L.; WILLSE, A. R.; ZANCA, A.; EDGERTON, M. D. Development of transgenic sugarcane resistant to sugarcane borer. **Tropical Plant Biology**. 11(1–2):17–30, 2018.

CTNBio, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos, chamado MIR162**. Reporte técnico n. 2042, 2009 <http://ctnbio.gov.br/index.php/content/view/view/15160.html>. Acesso: 30 de jun. de 2020.

CTNBio, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. (2019). Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/en/liberacao-comercial#/liberacaocomercial/consultarprocesso>. Acesso: 30 de janeiro de 2021.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; COSTA, V. P.; LOPES, D. O. T. Dispersal of *Cotesia flavipes* in sugarcane field and implications for parasitoid releases. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 2, p. 163-170, 2014.

DOMINGUES, F. A. **Bases moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à toxina Cry1F**. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia, 2016.

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

FRENCH-CONSTANT, R. H. Which came first: insecticides or resistance? **Trends in Genetics**, v. 23, p. 1-4, 2007.

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.

GEORGHIOU G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU G. P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. Plenum: New York, p. 769-792, 1983.

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

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

GUEVARA, L. A. C. Frequência de cópula da *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em condições de campo e laboratório. **Agropecuária Técnica**, v. 1, n. 1, p. 24-31. 1980.

HOLLINGSWORTH R G, Insect pest management of tropical versus temperate crops; patterns of similarities and differences in approach. **Acta Hort** 894:45–56, 2011.

HUANG, F. B.; LEONARD, R.; WU, X. Resistance of sugarcane borer to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 124, n. 1, p. 117-123, 2007.

HUANG, F., and B. R. LEONARD. Detection and monitoring of *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.). (In press). In “**Genetically Modified Plants: New Research Trends**”, (ed) by F. Columbus. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY., 2008.

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

HUANG, F.; HIGGINS, R. A.; BUSCHMAN, L. L. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**. 90: 1137-1143, 1997.

KUMAR, S.; CHANDRA, A.; PANDEY, K.C. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: An environment friendly insect-pest management strategy. **J Environ Biol** 29: 641–653, 2008.

QURESHI, J. A., L. L. BUSCHMAN, J. E. THRONE, AND S. B. RAMASWAMY. Adult dispersal of *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Crambidae) and implications for its resistance management in Bt-maize. **J. Appl. Entomol.** 129: 281-292, 2005.

MELO, A. B. P de.; PARRA, J. R. P. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações anuais de broca da cana-de-açúcar em quatro localidades canavieiras de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF**, v. 23, n. 7, p. 691-696,1988.

MENDES, A. C.; BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. Altura de vôo, hora de vôo e influência das fases lunares sobre a captura de adultos da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1974) através de armadilhas luminosas. **Brasil Açucareiro**, v. 92, n. 5, p. 21-33, 1978.

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

ONSTAD, D. W, MITCHELL, P.D; HURLEY, T.M; LUNDGREN J.G; PATRICK, PORTER R, KRUPKE C.H; SPENCER, J.L; DIFONZO, C, D; BAUTE T.S; HELLMICH RL: Seeds of change: corn seed mixtures for resistance management and integrated pest management. **Journal of Economic Entomology**, 104:343-352, 2011.

ONSTAD, D. W. Insect resistance management: biology, economics, and prediction. 2nd ed. **Academic Press**, London, UK, 2013.

OSTLIE, K. R.; HUTCHINSON, W. D.; and HELLMICH, R. L.; Bt Corn and european corn borer: Long-term success through resistance management, north central regional extension publication, NCR 602, USA, 1997.

PEREZ, R.; LONG, W. H. Sex attractant and mating behavior in the sugarcane borer. **Journal of Economic Entomology**. Res. 57, 688–690, 1964.

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.

UNICA. Brazilian sugarcane industry association. **UNICA data/Production data (1980-2018)** Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-emoagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2>. Acesso: em 8 de fevereiro de 2021.

USEPA, U.S. Environmental Protection Agency, Biopesticides **Registration Action Document: *Bacillus thuringiensis* Plant-Incorporated Protectants** (10/16/01), posted at http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/Pips/bt_brad.htm, 2001.

VARGAS, G.; GÓMEZ, L. A.; MICHAUD, J. P. Sugarcane Stem Borers of the Colombian Cauca River Valley: Current Pest Status, Biology, and Control. **Florida Entomol.** 98, 728–735, 2015.

WU, X.; HUANG, F.; LEONARD, B. R.; MOORE, S. H. Evaluation of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn hybrids against Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology.** 100: 1880-1886, 2007.

2. EFEITOS DA PRESENÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR BT E NÃO-BT NA MOVIMENTAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE OVOS EM *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

RESUMO

A resistência em populações de insetos é a maior preocupação para a garantia da longevidade de tecnologias Bt, uma vez que insetos podem evoluir em função da seleção natural promovida pelo método de controle minimizando sua eficácia e aplicabilidade com o passar do tempo. Assim, a utilização de áreas de refúgio é uma alternativa, dentre as estratégias do Manejo da Resistência a Insetos, para ampliar a longevidade da tecnologia. Considerando o impacto direto dos aspectos comportamentais de dispersão e distribuição de ovos por *Diatraea saccharalis* sobre a eficácia das áreas de refúgio em áreas de cana-de-açúcar Bt, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a influência de variedades de cana-de-açúcar Bt e não-bt sobre o padrão de movimentação e distribuição de ovos de fêmeas de *D. saccharalis*, ao longo de 3 dias (72h) em sistemas experimentais em casa de vegetação que simularam área de plantio Bt, refúgio e borda entre o refúgio e área de plantio Bt; e (ii) avaliar o potencial de dispersão de machos marcados em campo, visando compreender a extensão de área percorrida na busca por cópula, através do uso de armadilhas de feromônio. Os resultados dos sistemas experimentais mostraram que as fêmeas não virgens tendem a distribuir seus ovos em locais próximos ao ponto de liberação. Este padrão agregado da distribuição de ovos foi mantido ao longo de 72 horas confirmando a baixa motilidade das fêmeas durante o forrageio por sítios de oviposição. O padrão de movimentação e distribuição de ovos pelas fêmeas ao longo das 72h, entretanto, diferiu nos diferentes sistemas experimentais estudados. Também foi observada menor taxa de oviposição quando presentes de maneira simultânea plantas Bt e não Bt (área de borda). No campo a maior quantidade de indivíduos foi capturada próximo ao ponto de liberação, contudo, foram encontrados insetos a uma distância de até 800 metros do ponto de liberação. Os resultados encontrados subsidiam informações importantes para o plano de manejo da resistência a insetos em cana-de-açúcar geneticamente modificada.

Palavras-chave: Forrageio por sítio de oviposição, Agregação de ovos, Refúgio

ABSTRACT

2. EFFECTS OF THE PRESENCE OF BT AND NON-BT SUGAR CANE ON THE MOVEMENT AND DISTRIBUTION OF EGGS IN *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Resistance in insect populations has been a primary concern for the long-term success of Bt technologies, since insects evolve in response to the natural selection imposed by the control method, reducing their effectiveness and long-term viability. Thus, the use of areas of refuge is an alternative, among the strategies of the Management of Insect Resistance, to extend the longevity of the technology. Considering the direct impact of the behavioral aspects of dispersion and distribution of eggs by *Diatraea saccharalis* on the effectiveness of refuge areas in Bt sugarcane areas, this study aimed: (i) to evaluate the influence of sugarcane varieties Bt and Non-Bt on the *D. saccharalis* females patterns of movement and distribution of eggs over 3 days (72h) in experimental systems in a greenhouse that simulated Bt planting area, refuge and border between the refuge and the Bt planting area; and (ii) to evaluate the dispersion potential of marked males at the field, aiming to understand the area covered in the searching for copulation, through the use of pheromone traps. The results of the experimental systems showed that the mated females tend to distribute their eggs in places close to the release point. This aggregated pattern of egg distribution was maintained over 72 hours confirming the low motility of the females during foraging by oviposition sites. The pattern of movement and distribution of eggs by the females after 72h, however, differed in the different experimental systems studied. A lower oviposition rate also was observed for experimental systems in which Bt and non-Bt plants (border area) were present simultaneously. At the field, the highest number of individuals were captured closer to the release point, although some insects have been found at a distance of to 800 meters from the

release point. The results found contribute with important information for insect resistance management plans in genetically modified sugarcane.

Keywords: Foraging by oviposition site, Egg aggregation, Refuge

2.1. Introdução

A resistência em populações de insetos tem sido uma preocupação primária para o sucesso a longo prazo das tecnologias Bt, uma vez que insetos evoluem em resposta à seleção natural imposta pelo método de controle, reduzindo sua eficácia e viabilidade ao longo do tempo (HAWTHORNE, 1998).

Dentre as ferramentas utilizadas para minimizar os impactos das cultivares Bt sobre a resistência dos insetos, a mais difundida é a utilização de áreas de refúgio. Esta estratégia envolve o plantio de uma variedade não transgênica, de maneira que uma área funcione como um banco reservatório de insetos suscetíveis à proteína, para que, por meio da cópula com indivíduos resistentes, o fluxo gênico entre insetos de áreas transgênicas e não transgênicas ocorra, causando a modificação das frequências alélicas do gene que confere a resistência. Essas áreas de refúgio são frequentemente plantadas como blocos ou faixas de dimensões espaciais variadas nos campos Bt maiores ou próximo deles (ONSTAD et al., 2011).

Com a implementação do refúgio e o aumento das chances de acasalamento entre os insetos suscetíveis sobreviventes de plantas convencionais e insetos homozigotos resistentes raros que sobrevivem em plantas de cana-de-açúcar Bt, grande parte da geração seguinte será composta de insetos heterozigotos (carregando um único alelo de resistência). Estes indivíduos heterozigotos devem ser mortos pela proteína expressa em altas doses (OSTILE et al. 1997, USEPA 2001). Como resultado, as frequências do alelo da resistência de populações de campo devem ser mantidas em um nível relativamente baixo (BAUTE, 2004).

A escala espacial usada na definição de áreas de refúgio para conter ou reverter a resistência, depende da dinâmica de dispersão das espécies, uma vez que a dispersão dos insetos promove a distribuição dos genes de resistência através da paisagem agrícola. Dessa forma, a quantificação das taxas de entrada e saída de alelos de resistência em uma população através de estudos que quantificam e avaliam comportamento de dispersão dos indivíduos são importantes ferramentas para o manejo da resistência de insetos (YANG et al., 2015).

A complexa dinâmica da evolução e disseminação da resistência dos insetos praga na paisagem é difícil de ser caracterizada, uma vez que a taxa e escala de propagação da resistência depende, em grande parte das interações entre a dispersão das espécies e fatores tais como: custos adaptativos; seleção espacialmente variável; pressão seletiva e maneira

como se dá a distribuição dos alelos de resistência, isso através uma população estabelecida ou através do transporte dos genes por populações que colonizam novos territórios (MILLER e SAPPINGTON, 2017).

Assim, para a determinação adequada da distância entre as áreas de refúgio e áreas Bt, de modo a reduzir a evolução da resistência na paisagem, é necessário o entendimento do comportamento de voo dos insetos e a avaliação de sua dispersão (GOULD, 1998). Neste contexto, por exemplo, a eficácia do refúgio na diluição da resistência pode diferir entre populações de indivíduos caracterizados por eventos de dispersão que se dá em etapas discretas com intervalos entre alimentação e oviposição durante o movimento; ou por indivíduos os quais apresentam movimento caracterizado como um processo longo e contínuo da planta de origem até o destino, sem ocorrência de intervalos entre eventos de alimentação e oviposição entre os pontos (ONSTAD et al., 2018).

Estudos sugerem que grande parte dos indivíduos de *D. saccharalis* permanece no campo e não se dispersam por longas distâncias (GUAGLIMI, 1972, PAVINATO et al. 2018, FRANCISCHINI et al., 2019). De acordo com Francischini et al. (2019), *D. saccharalis* possui baixa capacidade de dispersão, o que sugere uma fidelidade ao local de origem e implica em um estilo de vida sedentário, em que os acasalamentos são restritos, principalmente, a pequenos grupos de insetos relacionados. Dessa forma, o plano de MRI (Manejo de Resistência de Insetos) atual de cana-de-açúcar Bt exige que os produtores plantem simultaneamente 20% de cana-de-açúcar não-bt como refúgio em até 800 metros, distância máxima de voo observada por Caixeta (2010), da lavoura de cana Bt (CTC, 2017).

Considerando o impacto direto dos aspectos comportamentais de dispersão e distribuição de ovos por *D. saccharalis* sobre a eficácia da definição de áreas de refúgio em plantações de cana com tecnologia Bt e, visando promover a diluição da resistência no inseto praga, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a influência de variedades de cana-de-açúcar Bt e não-bt sobre o padrão de movimentação e distribuição de ovos de fêmeas de *D. saccharalis*, previamente acasaladas, ao longo de 3 dias (24h, 48h e 72h) em três sistemas experimentais em casa de vegetação que simularam sistemas de área de refúgio, área de plantio de cana Bt e borda entre áreas de refúgio e plantio Bt; e (ii) avaliar o potencial de dispersão de machos no campo, visando quantificar a extensão de área que pode ser percorrida na busca por cópula, através do uso de armadilhas de captura a base de feromônios.

Os resultados mostraram que as fêmeas, após acasaladas, tendem a distribuir seus ovos em locais próximos ao ponto de liberação. Este padrão agregado da distribuição de ovos foi mantido ao longo de 3 dias, confirmando a baixa motilidade das fêmeas durante o forrageio

por sítios de oviposição nos três sistemas experimentais estudados. O padrão de movimentação e de distribuição de ovos nos sistemas experimentais, entretanto diferiram. No sistema do refúgio (somente plantas não-bt) as fêmeas distribuíram seus ovos em uma maior extensão nas primeiras 24h, comparada aos demais sistemas. Menor taxa de oviposição foi observada no sistema de borda (presença simultânea de plantas Bt e não Bt). No campo, maior quantidade de machos marcados foram capturados próximo ao ponto de liberação. Contudo, indivíduos foram encontrados em uma distância de até 800 metros do ponto de liberação. Os resultados encontrados podem auxiliar no plano de manejo da resistência a insetos para o controle eficiente de *D. saccharalis*, bem como, na definição e estabelecimento de áreas de refúgio em programas de manejo da resistência para cana-de-açúcar geneticamente modificada.

2.2. Material e métodos

Os estudos foram realizados nas dependências do Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, em Piracicaba – São Paulo.

2.2.1. Material vegetal para estudos em casa-de-vegetação

Foi utilizada a espécie vegetal de cana-da-açúcar *Saccharum officinarum*, com variedades comerciais CTC-Bt (Cry1Ac) e CTC-WT (não-bt), provenientes do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) – Piracicaba - SP. As gemas de cada material foram individualizadas e plantadas em vasos de três litros contendo substrato. A manutenção do material foi realizada em casa de vegetação no setor de Entomologia, da mesma instituição de pesquisa (CTC). As plantas foram irrigadas diariamente e fertirrigadas semanalmente com aproximadamente 120 ml de solução nutritiva (Sulfato de magnésio = 0,83; nitrato de potássio = 0,36; MAP = 0,14; zinco = 0,02; cobre = 0,03; ferro = 0,09; nitrato de amônia = 0,08; nitrato de cálcio = 0,91 g/L) por vaso.

2.2.2. Criação de *Diatraea saccharalis*

A população suscetível de referência de *D. saccharalis* utilizada neste estudo foi cedida pelo laboratório de Biologia de Insetos no Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP), a matriz de criação está no laboratório desde 2008 livre de pressão de seleção por proteínas Bt e inseticida. A criação dos insetos foi estabelecida no laboratório de Entomologia no Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, criadas em dieta à base de farelo de soja e germe de trigo a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, 70 ± 10 UR e 12:12 de fotoperíodo (MACEDO et al., 1983).

2.2.3. Preparo dos grupos de insetos

Foram utilizados dois grupos de insetos (fêmeas) para observar a movimentação de *D. saccharalis* nos ensaios realizados em casa de vegetação: inseto marcados e insetos não marcados. Para o grupo marcado, foi utilizado o corante Sudan Red 7B - C.I.26050 (Aldrich Company Inc.). Para isso, os insetos corados foram conduzidos durante todo o ciclo em dieta na qual foi adicionada o corante lipossolúvel vermelho (HENDRICKS et al., 1971; HUNT et al., 2000), preparado em diluição de 5 g do corante em pó em 50 ml de óleo de soja. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 1 ml da solução contendo o corante, que foi adicionado em um litro de dieta. Os insetos não marcados foram alimentados com dieta artificial. Para o ensaio em casa de vegetação, o corante possibilitou identificar fêmeas adultas que se alimentaram previamente da dieta contendo o corante, bem como possibilitou identificar os ovos por elas deixados, uma vez que fêmeas coradas produzem ovos de coloração avermelhada.

Após a obtenção das pupas, os insetos foram separados por sexo em 10 gaiolas de PVC (20 cm de altura \times 15 cm de diâmetro). Para obter fêmeas copuladas antes da liberação nas gaiolas experimentais, as fêmeas recém emergidas foram acondicionadas com machos recém emergidos por 24 h, em gaiolas PVC de 15 cm de diâmetro por 20 cm de altura, para permitir a cópula. Posteriormente, os machos foram retirados e as fêmeas separadas para liberação nas gaiolas experimentais.

2.2.4. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de ovos de *D. saccharalis* nas plantas hospedeiras em casa-de-vegetação

Após 60 dias do plantio, as plantas foram posicionadas em gaiolas de $3 \times 2 \times 1$ m revestidas de tecido *voil* de malha fina sustentado por uma estrutura de cano de PVC, nas quais 10 plantas foram dispostas em linha reta, paralelamente em duas fileiras, formando duas linhas com cinco plantas. As gaiolas foram particionadas em cinco quadrantes, aos 60, 120, 180, 240 e 300 cm do ponto inicial de liberação das mariposas.

Foram estabelecidos três sistemas experimentais (tratamentos): (1) NBT: Cana-de-açúcar convencional, no qual estavam presentes somente plantas não-bt; (2) BT: Cana-de-açúcar transgênica, com presença de apenas plantas Bt e (3) MIX: Cana-de-açúcar não-bt e Bt combinadas em uma mesma gaiola (Figura 1 a, b e c, respectivamente). A definição dos sistemas experimentais teve como objetivo simular, experimentalmente, área de plantio de cana Bt, área de refúgio e área de borda entre o plantio Bt e o refúgio, respectivamente.

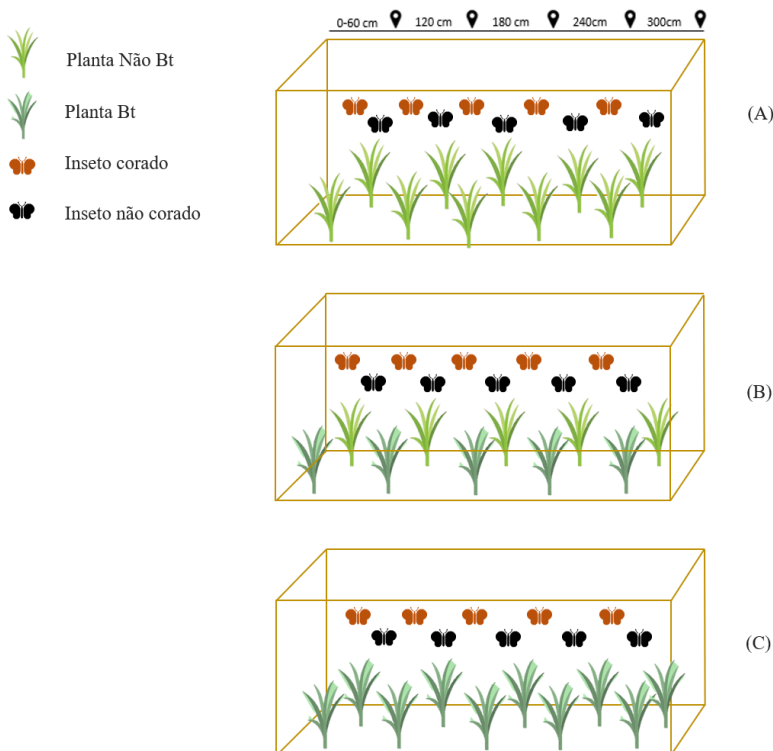


Figura 1. Esquema experimental utilizado para avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos: (A) NBT: somente plantas não-bt; (B) BT: somente plantas Bt e (C) MIX: plantas Bt e não-bt no padrão de movimentação e distribuição de ovos de *Diatraea saccharalis*.

No ponto inicial da gaiola (0 cm do quadrante 1) foram abertas placas de Petri contendo cinco mariposas marcadas e cinco mariposas não marcadas, totalizando dez insetos por gaiola (n=10). Metade das mariposas foram coradas com a finalidade de avaliar se as posturas encontradas nas plantas ao longo dos 3 dias de observações são decorrentes de um evento de oviposição, ou seja, de uma fêmea, ou de uma sucessão de oviposições, provenientes de diferentes fêmeas ao longo do período de estudo.

O número de posturas (conjunto de massas de ovos) nas áreas correspondentes a cada quadrante da gaiola, ou seja, nas plantas e vasos dentro de cada quadrante foram contabilizados após 24h, 48h e 72h da liberação das mariposas. O experimento foi replicado por 10 vezes e aleatorizado a cada repetição.

2.2.5. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de machos de *D. saccharalis* em campo.

A avaliação da capacidade de dispersão de machos de *D. saccharalis* foi realizada na Fazenda Santo Antônio, Piracicaba-SP, em área experimental de cana-de-açúcar do Centro de Tecnologia Canavieira-CTC, latitude 22° 41' 58,281" S e longitude 47° 33' 37,291" W, ao longo de 3 semanas.

Para este estudo de movimentação em campo, também foi realizado o procedimento de marcação com corante Sudan Red descrito no item 2.2.3. Das pupas obtidas foram separados os machos e reservados para liberação posterior (CAIXETA, 2010).

Foram conduzidos dois experimentos, o primeiro no mês de maio 2019, utilizando diferentes distâncias de captura (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 m do ponto de liberação) e o segundo, em maio no ano de 2020, considerando apenas uma distância de captura (800 m do ponto de liberação). As armadilhas foram alocadas em áreas de cana recém-colhida, cana alta, mata ciliar e solo sem cobertura vegetal.

Foram utilizadas para captura, a armadilha tipo delta (Bio Controle), contendo um piso colante de face dupla, substituída a cada sete dias, durante três semanas. Para a atração dos machos marcados foram utilizadas 4 fêmeas virgens de *D. saccharalis* confinadas em gaiolas tipo *Clip Cage* de 5 cm de diâmetro e 5 cm de altura, substituídas também a cada sete dias.

Para abrigar os machos marcados, foram utilizadas caixas plásticas de transporte tipo "pet" para proteção de variáveis climáticas e para evitar a predação por pássaros, sustentadas por duas hastes a 1,5 metros de altura, contendo vermiculita em seu interior (Figura 2). As

caixas de liberação foram posicionadas em um talhão em pousio para proporcionar o maior potencial de dispersão. Dentro das caixas, foram mantidos copos plásticos de 50mL contendo algodão embebido com água destilada para suprimento da umidade. As extremidades das hastes foram envolvidas com cola entomológica (Colly ®) para evitar a predação de pupas por formigas. Ao total, 5500 pupas machos e 11000 pupas machos foram acondicionadas nos abrigos nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Ao final da terceira semana do experimento, foi realizada a contagem de pupas inviáveis, exúvias e adultos que permaneceram no abrigo.

As armadilhas de captura foram distribuídas de acordo com as orientações apresentadas na Figura 3, nos sentidos norte, sul, leste e oeste, com uma distância mínima de 25 metros e máxima de 800. Todos os pontos foram georreferenciados utilizando o GPS modelo Etrex Vista (Garmin).

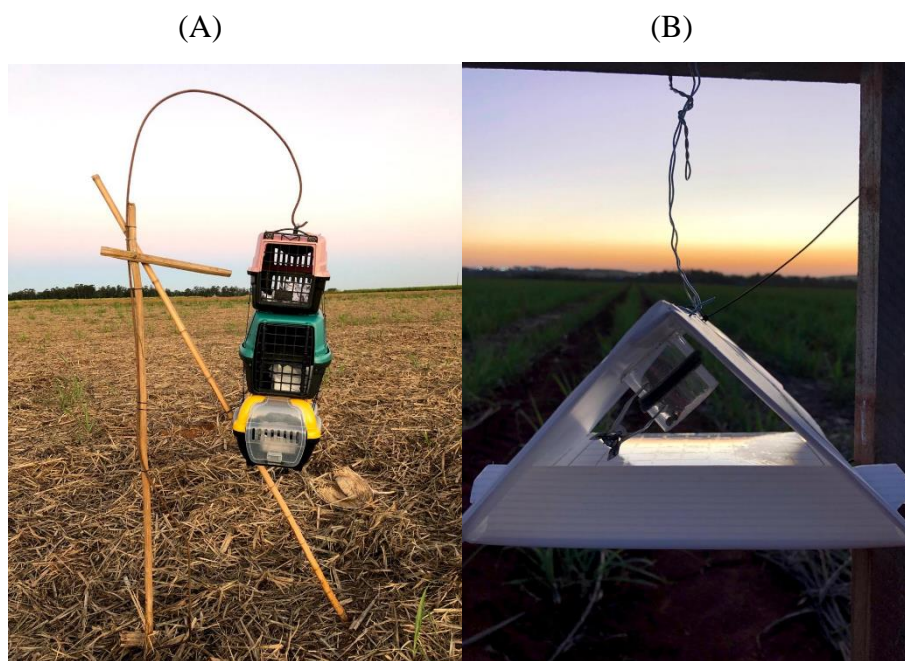


Figura 2. Estrutura para abrigo das pupas e armadilha utilizada na liberação e captura de machos de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. (A) Abrigo instalado no ponto de liberação; (B) Detalhe da gaiola contendo fêmeas virgens que foi mantida no interior de armadilha tipo “delta” utilizada para atração e captura de machos.

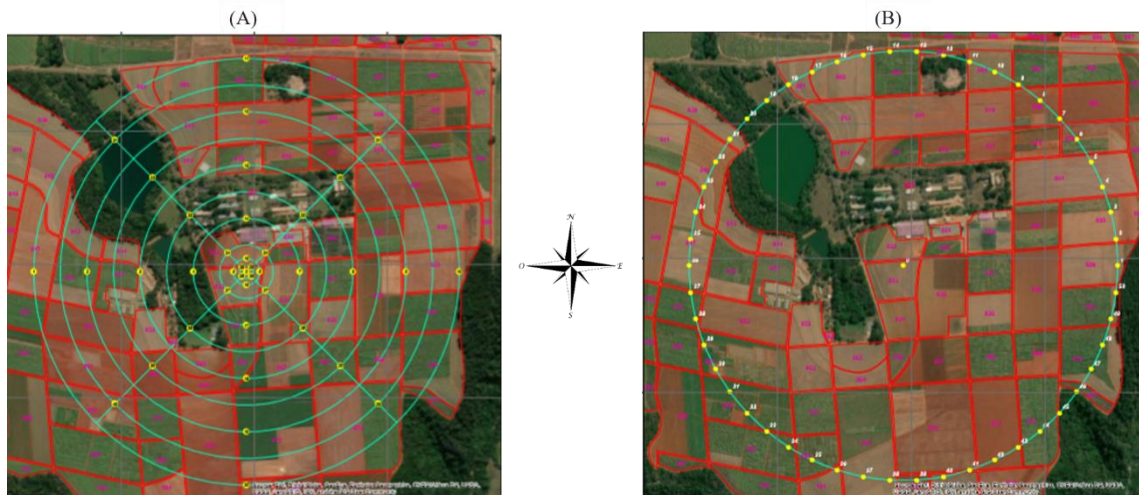


Figura 3. Disposição das armadilhas de feromônio em campo e ponto de liberação (pontos em amarelo) nos ensaios realizados em (A) 2019 e (B) 2020 na Fazenda Santo Antônio, Piracicaba-SP. Fonte: Esri, DigitalGlobe, GeoEye, Earthstar Geographics, CNES/Airbus DS, USDA, USGS, AeroGRID, IGN, and the GIS User Community (Projeção Universal Transversa de Mercator Sistema de Coordenada: WGS 1984 UTM Zone 23S/IBGE Unidade da Grade de Coordenadas: Lat Long).

2.3. Análises estatísticas

2.3.1. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de ovos de *D. saccharalis* nas plantas hospedeiras em casa-de-vegetação

A análise para a avaliação do movimento e padrão espacial de distribuição de ovos pelas mariposas foi dividida em duas etapas: (i) contagem acumulada de posturas de ovos após 72 horas e (ii) contagem de posturas de ovos ao longo do tempo (contagem longitudinal) após 24h, 48h e 72h. A etapa (i) teve como objetivo avaliar a densidade e o padrão de distribuição das posturas total ao longo de 3 dias, e a etapa (ii) teve como objetivo avaliar se a dinâmica temporal da distribuição de ovos muda conforme os ovos vão sendo depositados em uma localidade nos diferentes sistemas experimentais. Os efeitos dos sistemas experimentais (NBT, BT e MIX), da distância do ponto de liberação, determinada pelo quadrante (Q1:0-060cm; Q2: 60-120cm; Q3:120-180cm; Q4: 180-240cm; Q5: 240-300cm) e da posição na qual se encontrava os vasos com as plantas (direita ou esquerda) sobre o total de posturas (massas de ovos) deixados pelas mariposas após 72h foram analisados através de ajustes de Modelos Lineares Generalizados com Distribuição Binomial Negativa (MLG) para dados de contagem (NELDER e WEDDERBURN, 1972).

Na análise longitudinal de posturas (ao longo do tempo), os efeitos das variáveis sistema experimental (NBT, BT e MIX), quadrante (Q1:0-060cm; Q2: 60-120cm; Q3:120-180cm; Q4: 180-240cm; Q5: 240-300cm), e tempo de postura (24, 48 e 72h) foram considerados efeitos fixos e as gaiolas experimentais foram consideradas como efeito aleatório para o ajuste de um Modelo Misto assumindo Distribuição Binomial Negativa. A adição do efeito aleatório no intercepto do modelo (gaiolas) se fez necessária para considerar as possíveis correlações entre as posturas em uma mesma unidade experimental (dados longitudinais - medidas repetidas temporalmente).

Para ambas as análises, a escolha do melhor modelo estatístico aplicado foi feita através de comparações entre os ajustes dos modelos completos e modelos com a redução de variáveis explanatórias pelo critério de Akaike (AIC). A avaliação da qualidade do ajuste obtido foi avaliada por meio do gráfico “half-normal-plot” com envelopes simulados ao nível de 95% (MORAL et al., 2017). Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico R Core Team (2019) v. 3.6.1, através dos pacotes dplyr, ggplot2, MASS, hnp, statmod e lme4.

2.3.2. Análises movimentação em campo

Para a avaliação do padrão espacial da distribuição dos machos de *D. saccharalis* em campo, as densidades em cada ponto nos quais estavam localizadas as armadilhas foram estimadas através do método de densidade de Kernel. A densidade de Kernel é uma estimativa não paramétrica da densidade. Com ela, obtêm-se a suavização dos dados e, portanto, inferências sobre a população podem ser feitas, com base em uma amostra de dados finitas. As estimativas de densidade de Kernel estão diretamente relacionadas a histogramas, porém possuem propriedades como suavização dos dados (quedas bruscas não são mais observadas) e continuidade (definida mesmo para valores não naturais). Esse ajuste de densidade de Kernel, permite determinar a probabilidade de observar um animal em uma dada distância, mesmo que não inteira ou não intermediária aos pontos de coleta, com uma frequência relativa de distribuição de utilização (UD) (WORTON, 1989). A UD desempenha um importante papel, pois apresenta um resumo de como o animal utiliza o espaço na paisagem.

A estimativa de densidade por Kernel pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\hat{f}_h(x) = \frac{1}{n h} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{x-x_i}{h}\right),$$

Em que n é o tamanho amostra, (x_1, x_2, \dots, x_n) são amostras identicamente distribuídas, K é a função de kernel (uniforme, triangular, normal e outras) e $h > 0$ é o parâmetro de suavização conhecido como “tamanho da banda”. Esse parâmetro não possui significado biológico e intuitivamente, escolhe-se um valor de h tão pequeno quanto a distribuição dos dados da amostra permitem. Recomenda-se $1 \leq h \leq 1.5$. (BAILEY e GATRELL, 1995).

Com a estimativa da densidade de Kernel, foi possível determinar o alcance máximo de um macho (maior distância onde probabilidade de observar um macho (\hat{f}_h) é maior do que zero). Porém, muitas variáveis não quantificadas nesse estudo podem influenciar nessa dispersão (como por exemplo, o vento), portanto, estimou-se a distância onde, segundo a função de densidade de Kernel, seria observado 95% dos insetos, ou seja, foi determinado seu quantil de 95%.

2.4. Resultados

2.4.1. Avaliação do movimento e do padrão de distribuição de ovos de *D. saccharalis* nas plantas hospedeiras em casa-de-vegetação

2.4.1.1. Análise da quantidade de postura acumulada após 72 horas

A média total de posturas (massas de ovos) observadas após 72h da liberação das mariposas foi maior quando havia somente plantas não-bt nas gaiolas experimentais (sistema experimental NBT), quando comparado a média de posturas nos demais sistemas. A média de posturas no sistema NBT representou 40% do total das posturas dos três sistemas estudados (Tabela 1). Em todos os sistemas experimentais, foram observadas posturas provenientes de fêmeas coradas e não coradas, indicando que o acúmulo de posturas nas diferentes localidades da gaiola foi dado por mariposas diferentes e em tempos diferentes.

Tabela 2. Número total e média (\pm desvio padrão) de posturas de *Diatraea saccharalis* após 72 horas da liberação em gaiolas experimentais simulando: área refúgio (NBT); área de plantio de cana Bt (BT) e área de borda entre refúgio e plantio Bt (MIX), considerando 10 repetições.

Sistema experimental	Tipo de planta	Número total de posturas	Média de posturas (\pm Desvio Padrão)
NBT	não-bt	847	8,47 (\pm 9,54)
BT	Bt	711	7,11 (\pm 10,07)
	não-bt	274	5,48 (\pm 7,06)
MIX	Bt	286	5,72 (\pm 6,52)
	Total	560	5,6 (\pm 6,77)

A Figura 4 mostra como o total de ovos em cada sistema experimental foi distribuído nas diferentes localidades da gaiola após 72h. Para isto, foram consideradas 10 localidades da gaiola experimental, ou seja, 5 quadrantes do lado direito e 5 quadrantes do lado esquerdo. No sistema BT, foi encontrado um maior acúmulo de posturas (53 e 55, respectivamente) em uma mesma localidade. O número máximo de posturas/localidade encontrado no sistema NBT foi 43. O número máximo de posturas observadas em uma única localidade da gaiola experimental no sistema MIX foi menor quando comparado aos demais. No sistema MIX, o maior número de posturas encontradas em localidades que continham plantas Bt foi 29 e em localidades que continham plantas não-bt foi 34 (Figura 4). Esta diminuição no número de ovos nas gaiolas onde havia a presença simultânea de plantas Bt e não-bt levou a uma menor agregação de posturas numa mesma localidade da gaiola experimental.

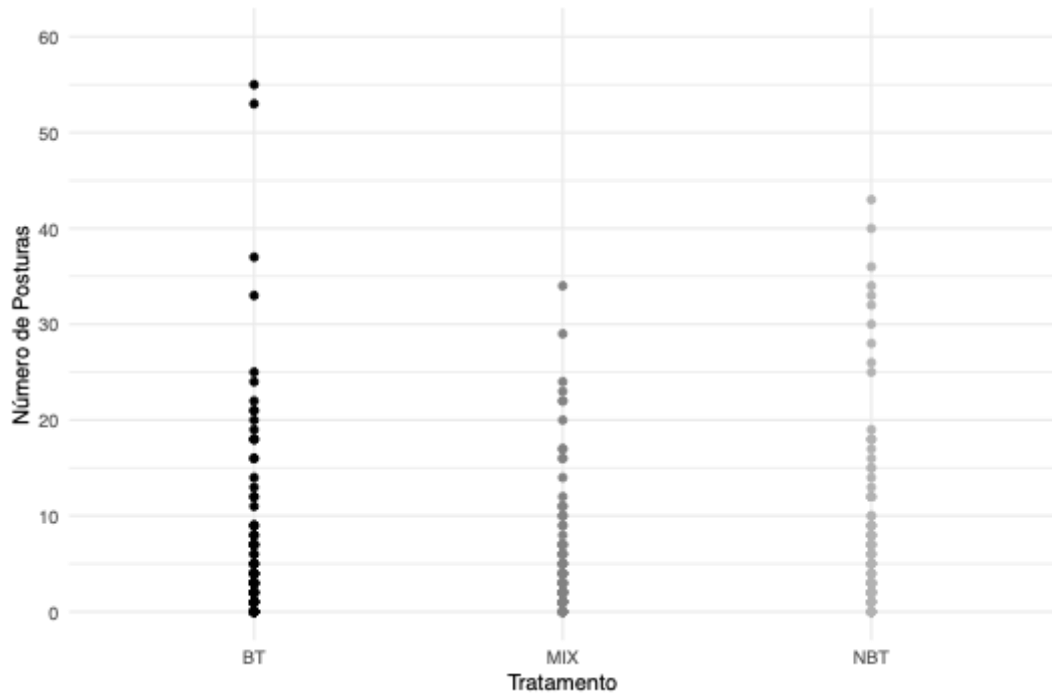


Figura 4. Distribuição das posturas de *Diatraea saccharalis* observadas após 72h da liberação para cada um dos sistemas experimentais: NBT= somente plantas não-bt; MIX= plantas não-bt + plantas Bt e BT = somente plantas Bt. Cada ponto no gráfico representa a quantidade de posturas observadas em uma localidade da gaiola experimental (total de 10 localidades por gaiola experimental, ou seja, 5 quadrantes do lado direito e 5 quadrantes do lado esquerdo).

Foi observado que o sistema experimental ($\chi^2 = 7,165$; $gl=2$; $p<0,05$) e a distância do ponto de liberação (quadrantes da gaiola experimental) ($\chi^2=219,780$; $gl=4$; $p<0,05$) influenciaram a quantidade e o padrão de distribuição das posturas das mariposas após 72 h da liberação. A maior quantidade de posturas se deu no primeiro quadrante (Q1) em todos os sistemas. A quantidade de ovos distribuídos nos diferentes quadrantes no sistema NBT foi maior quando comparado aos demais. No sistema MIX as mariposas apresentaram o mesmo padrão para a distribuição das posturas, entretanto, a quantidade de posturas foi menor (Figura 5).

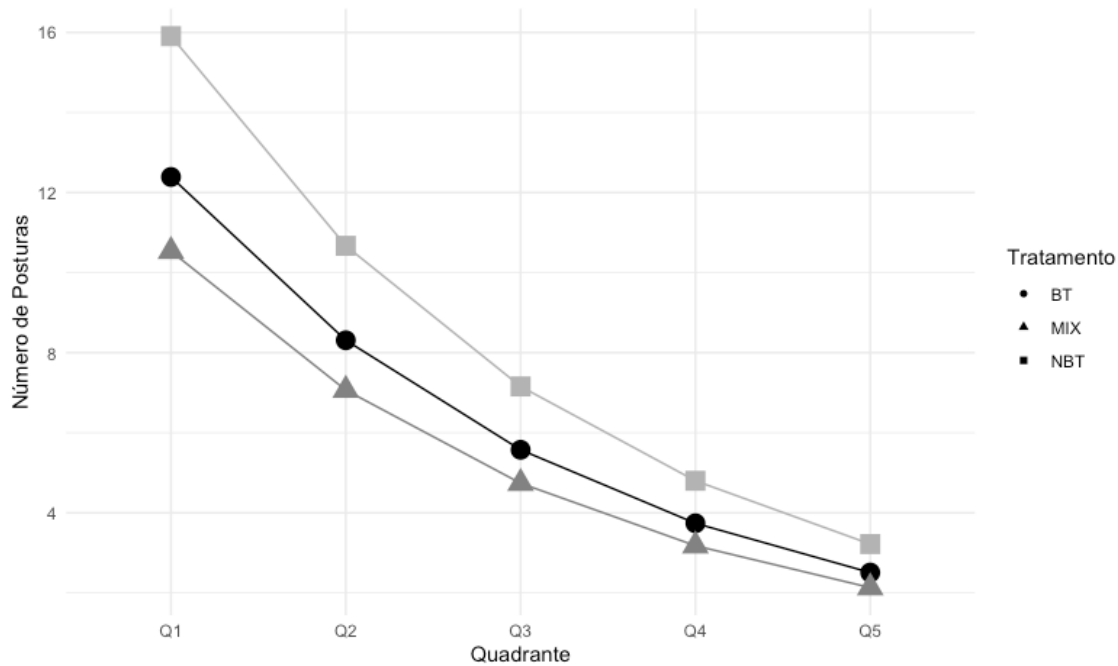


Figura 5. Distribuição das posturas de *Diatraea saccharalis* em gaiolas experimentais após 72 horas da liberação dos insetos no ponto 0 cm. Os símbolos: quadrado, círculo e triângulo representam, respectivamente, os sistemas experimentais: NBT (área de refúgio); BT (área de plantio Bt) e MIX (área de borda). Q1=0-60 cm, Q2=60-120 cm, Q3=120-180 cm; Q4=180-240 cm e Q5= 240-300 representam a distância do ponto de liberação.

Não foi constatado efeito significativo da posição das plantas ($\chi^2=0,644$; gl=1; $p>0,05$) nas gaiolas, indicando que o padrão de distribuição e a quantidade de oviposição nas gaiolas experimentais não foram influenciados pelas condições estruturais das unidades experimentais.

2.4.1.2. Análise longitudinal da distribuição de ovos

O sistema experimental ($F=3,374$; gl=3; $p<0,05$), a distância do ponto de liberação - quadrante ($F=50,978$; gl=4; $p<0,05$) e o tempo de observação ($F=15,020$; gl=2; $p<0,05$) tiveram efeitos significativos sobre a distribuição das posturas das mariposas. Nos sistemas BT e MIX, a quantidade de posturas decaiu ao longo do tempo, entretanto, para o sistema NBT, grande parte da postura de ovos ocorreu em 24 e principalmente após 48h, decaindo somente após 72h (Tabela 3).

Em geral, considerando os três sistemas experimentais, posturas foram observadas nas primeiras 24h em todos os quadrantes das gaiolas, entretanto, observou-se um maior

acúmulo de posturas no primeiro quadrante (Q1). Após 48h da liberação, a quantidade de posturas no quadrante Q1 decresceu e houve um ligeiro aumento da quantidade de posturas nos demais quadrantes. Após 72h, a quantidade de posturas decresceu gradualmente conforme o aumento da distância de liberação (Figura 6).

Tabela 3. Distribuição das posturas (massa de ovos) de *Diatraea saccharalis* ao longo de 24, 48 e 72h em gaiolas que simulam experimentalmente os sistemas NBT (área de refúgio), BT (área de plantio Bt) e MIX (área de borda entre refúgio e plantio Bt).

Tratamento	Tempo de observação	Número Total de posturas	Postura Média (\pm desvio padrão)
NBT	24	303	3,03 (\pm 5,29)
	48	376	3,76 (\pm 5,48)
	72	168	1,68 (\pm 3,04)
BT	24	325	3,25 (\pm 6,58)
	48	215	2,15 (\pm 3,33)
	72	171	1,71 (\pm 3,10)
MIX	24	298	2,98 (\pm 5,38)
	48	168	1,68 (\pm 2,16)
	72	94	0,94 (\pm 1,54)

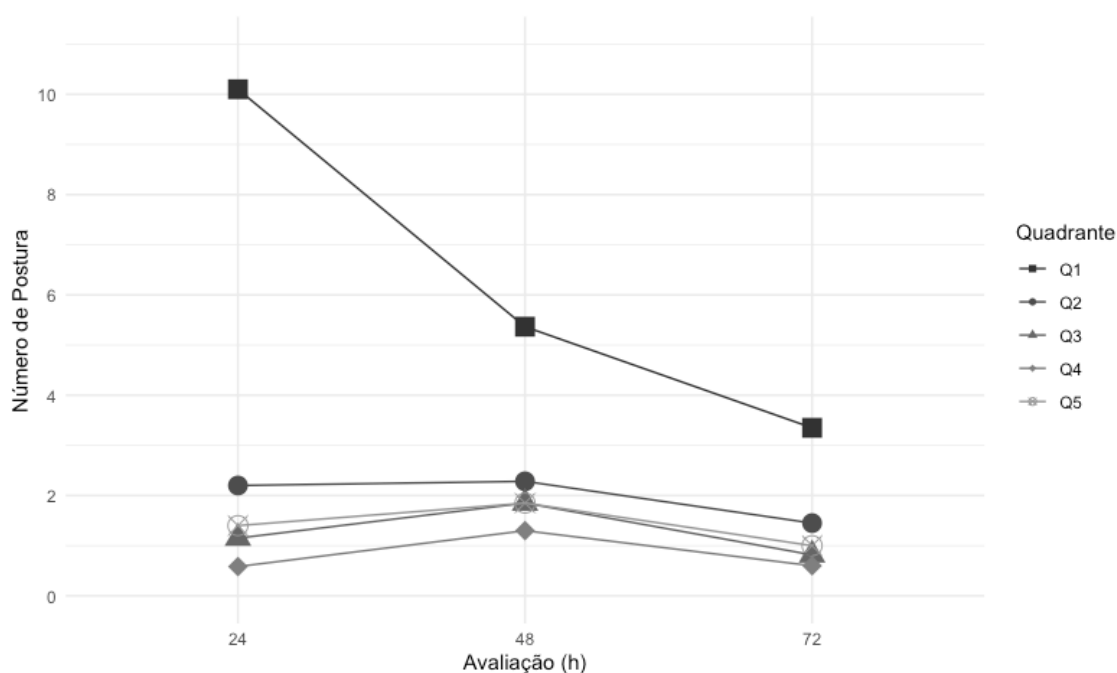


Figura 6. Quantidade de posturas de *Diatraea saccharalis* observadas ao longo de 24, 48 e 72h da liberação dos insetos nos três sistemas experimentais. As diferentes linhas representam, respectivamente, a distância Q1=0-60 cm, Q2=60-120 cm, Q3=120-180 cm; Q4=180-240 cm e Q5= 240-300 do ponto de liberação.

Apesar das posturas de ovos ocorrerem em maior número dentro das 24 horas para todos os tratamentos (sistemas experimentais), o padrão de distribuição dos ovos ocorreu forma diferenciada dentro dos tratamentos (Figura 7).

No sistema do refúgio (NBT), 24 horas após a liberação houve um maior acúmulo de posturas no primeiro quadrante (Q1). Nas primeiras 24 horas a deposição de ovos nos quadrantes Q2, Q3 e Q4 também foram maiores, comparadas aos a quantidade de posturas após 48 e 72h. A maior concentração de posturas no quadrante Q5, entretanto, ocorreu após 48h da liberação das mariposas. Após 72h a quantidade de posturas em todos os quadrantes foi menor, indicando que as mariposas, já nas primeiras 24h, distribuem a maior parte de seus ovos na área.

No sistema da borda (MIX), nas primeiras 24 horas, ocorreu maior quantidade de postura de ovos somente nos dois primeiros quadrantes (Q1 e Q2). Após 48h foi observado uma grande quantidade de postura de ovos em Q3. Após 72h ocorreram posturas em maior quantidade no quinto quadrante (Q5).

No sistema de plantio Bt (BT), o maior acúmulo de posturas se deu no quadrante Q1 nas primeiras 24 horas. Também ocorreram, mas em menores quantidades, posturas nos quadrantes Q2 e Q3 em 24h. Após 48h foi observado um maior depósito de ovos nos quadrantes Q4 e Q5. Após 72h foram observadas novas posturas somente no quadrante 5 (Q5).

Foi possível observar que nas primeiras 24 horas, as mariposas no sistema NBT exploraram mais rapidamente o sistema em relação aos demais sistemas. Nos sistemas em que havia a presença de plantas Bt (MIX e BT), a distribuição das posturas de ovos se deu de maneira mais agregada ao longo dos 3 dias de observação (Figura 7).

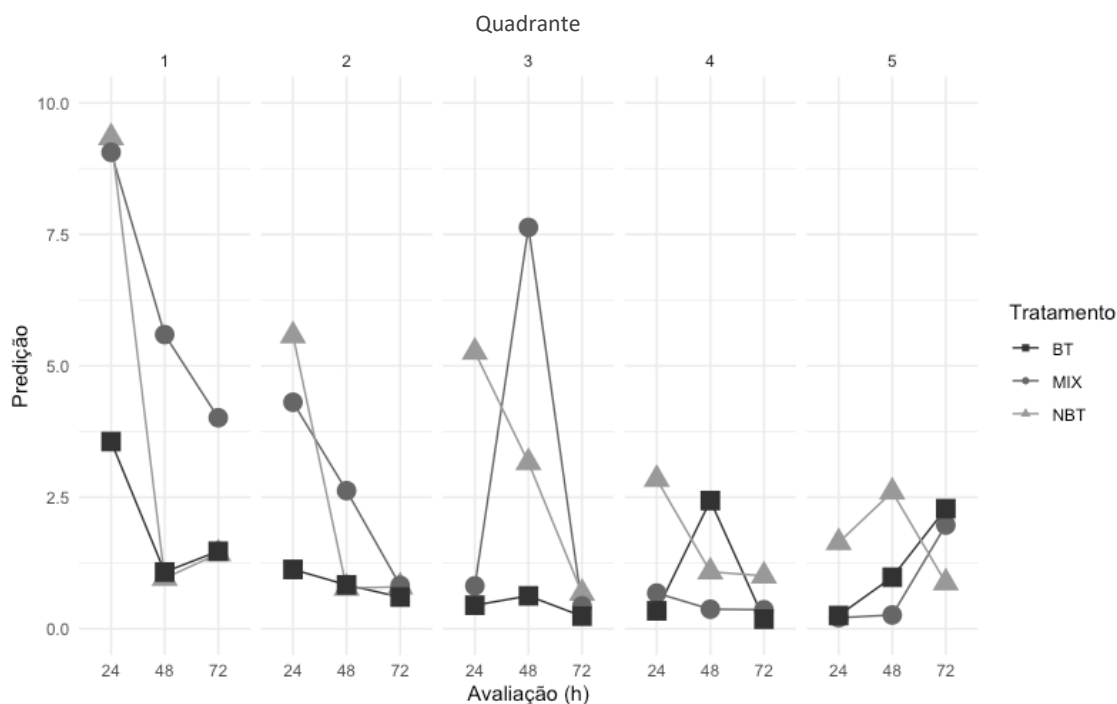


Figura 7. Curva de oviposição média de *Diatraea saccharalis*, avaliada no período de 24h 48h e 72 horas após a liberação nos sistemas experimentais.

2.4.2. Análise Movimentação em campo

Do total das pupas dos insetos liberados em campo, 83,12% e 82% dos machos marcados emergiram deixando o ponto de liberação e a quantidade de pupas inviáveis correspondeu a 16,9% e 18% nos experimentos 1 e 2, respectivamente (Tabela 4).

Foram capturados 179 (3,25%) dos machos marcados no primeiro experimento e 5 (0,055%) de machos marcados no segundo experimento (Tabela 5).

Em relação à distância de captura, no primeiro experimento, 75% dos insetos foram capturados próximo à armadilha, a 25 metros do ponto de liberação. Conforme a distância aumentou, a captura foi reduzida, sendo 11,7% de captura aos 50 metros, 5,58% aos 100 metros, 3,9% aos 200 metros, 1,67% aos 300 metros, 1,11% aos 600 metros e 0,55% aos 400 metros. Já nos pontos de 500 e 800 metros não foram encontrados nenhum inseto marcado (Tabela 5). Para o segundo experimento, no qual foi avaliada apenas a distância de 800 metros, somente cinco insetos foram recapturados (Tabela 5).

Tabela 4. Taxa de emergência, de voo e de captura dos machos de *Diatraea saccharalis* liberados em campo.

Variáveis	Experimento 1	Experimento 2
Total liberado	5500	11000
Pupas não emergidas	928 (16,9%)	1981 (18%)
Adultos emergidos	4572 (83,13%)	9019 (82%)
Machos capturados	179 (3,25%)	5 (0,05%)

Tabela 5. Distância de voo, quantidade de machos marcados capturados nos experimentos 1 e 2 após 3 semanas da liberação em campo

Experimento	Distância de voo (m)	Número de indivíduos capturados
1	25	135
	50	21
	100	10
	200	7
	300	3
	400	1
	500	0
	600	2
	700	0
2	800	0
	800	5

Com base nos dados obtidos no experimento de dispersão 1, utilizando o ajuste de Kernel, a distância máxima estimada para o encontro de machos foi de 677,96 m quando $h=1$ e 716m quando $h=1,5$, ou seja, após essa distância a probabilidade ser observado um inseto é menor do que $1,5 \cdot 10^{-7}$ ($h=1$) e $1,287 \cdot 10^{-6}$ ($h=1,5$), praticamente zero (Figura 8). Ao considerar essas estimativas com base na probabilidade de 95% de encontro de machos, tem-se 641m para $h=1$ e 676,5m para $h=676,5m$.

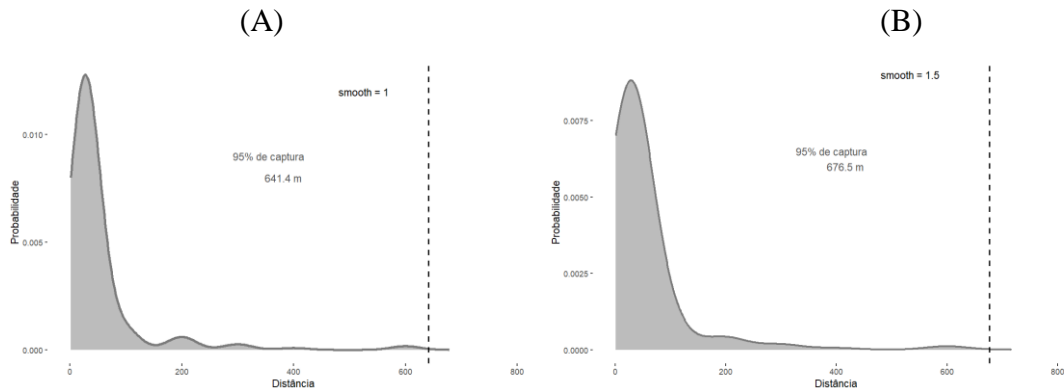


Figura 8. Probabilidade estimada das distâncias mínimas médias de dispersão de *Diatraea saccharalis* considerando o primeiro experimento (armadilhas em diferentes distâncias). No Eixo y: Probabilidade de dispersão simulada com padrão aleatório, Eixo x: Distâncias em metros. (A) $h=1$ (B) $h=1,5$.

No segundo experimento, considerando a captura de cinco insetos a 800 metros, utilizando o ajuste de Kernel, a distância máxima estimada para o encontro dos insetos foi de 817 utilizando $h=1$ e 820 m quando o ajuste foi de $h=1,5$. Ao se considerar a probabilidade de 95% de encontro, para o primeiro ajuste, tem-se 777,2 m e para o segundo ajuste 785,2 m (Figura 9).

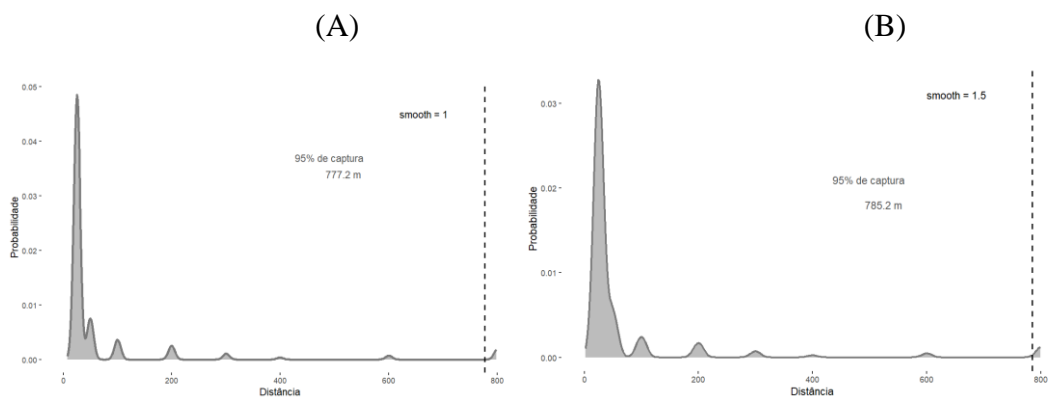


Figura 9. Probabilidade estimada das distâncias mínimas médias de dispersão de *Diatraea saccharalis* considerando o segundo experimento (armadilhas a 800 metros). No Eixo y: Probabilidade de dispersão simulada com padrão aleatório, Eixo x: Distâncias em metros. (A) $h=1$ (B) $h=1,5$.

2.5. Discussão

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que após o acasalamento, as fêmeas pouco se movimentaram ao longo dos três dias de observação, ovipositando de maneira agregada no local próximo ao ponto de liberação ($Q1 = 60\text{cm}$). A variação encontrada nos

padrões de distribuição de ovos na análise longitudinal nos diferentes sistemas, entretanto, sugere que a presença de plantas Bt e não-bt influenciam o forrageio por sítios de oviposição das fêmeas de *D. saccharalis*. Nos sistemas em que havia somente plantas não-bt, a distribuição dos ovos se deu mais rapidamente, nas primeiras 24h e a quantidade de ovos foram maiores em relação aos sistemas nos quais plantas Bt estavam presentes. Além disso, foi observado uma menor quantidade de oviposições no sistema experimental de borda (MIX), onde os dois tipos de plantas estavam presentes.

Em um estudo conduzido por Gonçalves et al. (2020), em que se investigou a escolha por sítio de oviposição de *S. frugiperda* em plantas Bt em relação às não-bt em casa de vegetação, não foi observado preferência na oviposição entre o milho Cry1F em relação à sua isolinha não-bt, de modo que os autores concluíram que as mariposas da espécie não distinguiram plantas Bt e não-bt durante a oviposição. Outros estudos também relataram a ausência de preferência por sítio de oviposição, constatando que fêmeas não conseguem discriminar entre cultivares isogênicos transgênicos e convencionais (TORRES e RUBERSON, 2006; LEI et al., 2009).

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que as fêmeas de *D. saccharalis* durante a busca por sítio de oviposição interagem de maneira diferenciada com plantas Bt e não-bt. Este efeito pode ser explicado pelo fenômeno de antixenose, que ocorre quando um dado genótipo é menos preferido que outro em condições iguais, e exerce um efeito adverso no comportamento do inseto. BASTOS et al., (2015) relatam que a antixenose pode explicar alterações comportamentais tais como diferenças na oviposição, alimentação ou escolha de abrigo por insetos na presença de plantas Bt e não-Bt.

As fêmeas distribuíram seus ovos de maneira agregada nas gaiolas experimentais. A observação de ovos corados e não corados em uma mesma localidade mostrou que diferentes fêmeas podem ovipositar em locais nos quais outras fêmeas já colocaram seus ovos. Também foi observado maior quantidade de ovos nos primeiros quadrantes em todos os sistemas experimentais, já nas primeiras 24 horas de observação. O mesmo padrão se manteve na avaliação após três dias nos três diferentes sistemas experimentais estudados, embora constatadas diferenças na distribuição e agregação dos ovos ao longo do tempo. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que mostram que, após a cópula, fêmeas de *D. saccharalis* ovipositam próximo à ovos de co-específicos, em função da preferência de oviposição agregada (PIMENTEL, 2016; HILKER E MEINERS 2002, BYERS 2009). Segundo Clark e Faeth (1997), a oviposição em aglomerados pode oferecer vantagens para os ovos, larvas e adultos, ao contrário de ovos isolados, oferecendo proteção contra-fatores

ambientais e biológicos. Além disso, as fêmeas podem realizar o agrupamento de posturas para conservação de energia, esse comportamento é uma consequência de limitações energéticas, no qual foi correlacionado entre espécies de lepidópteros que agrupam ovos e fêmeas que não se alimentam (HERBERT, 1983).

De acordo com Onstad e colaboradores (2018) há três fatores quantitativos no comportamento de machos e fêmeas adultas que podem impactar na eficiência do refúgio. O primeiro destes fatores é a capacidade de um macho ou fêmea acasalar mais de uma vez durante a vida. O segundo é o intervalo de tempo entre múltiplas cópulas que cada gênero pode fazer. O terceiro fator é a distância máxima que um macho ou fêmea pode dispersar antes de acasalar.

Após a emergência, adultos de *D. saccharalis* necessitam apenas do fornecimento de água para o sucesso reprodutivo, indicando que sua reprodução é condicionada exclusivamente por nutrientes obtidos na fase imatura, assim como observado para várias espécies (BAVARESCO et al 2001, JERVIS et al., 2005, MILANO et al., 2010). Dessa forma, os adultos de *D. saccharalis* emergem praticamente prontos para reprodução (BERNAYS, 1998), sendo o objetivo da fase adulta o acasalamento e, conseqüentemente, a perpetuação da prole. Entretanto, fêmeas de *D. saccharalis* copulam majoritariamente uma única vez, enquanto machos, podem copular com até quatro fêmeas diferentes (GUEVARA, 1980).

Quando mais de um evento de acasalamento ocorre, estes eventos podem acontecer localmente ou distante do campo de origem. Em *D. grandiosella*, foi observado que os machos podem copular dentro e fora do campo de emergência, enquanto as fêmeas acasalam-se somente no local de emergência (GUSE et al. 2002, ONSTAD et al., 2018). Os resultados encontrados neste estudo indicam que *D. saccharalis* segue o mesmo padrão, ou seja, as fêmeas, devido à baixa motilidade, ficariam restritas ao local de origem e os machos se dispersando a distancias maiores, estimadas em no máximo até 677,96 - 716 metros do local de origem, embora assim como descrito por Caixeta (2010), tenha sido observada uma baixa captura de insetos marcados a 800m do ponto de liberação. A baixa motilidade das fêmeas de *D. saccharalis* e a tendência de oviposição em sítios próximos ao local no qual ocorre a fecundação observadas, indicam que a movimentação dos machos a distâncias maiores é um importante fator para promover a cópula e o fluxo gênico entre populações de diferentes localidades no campo.

Onstad e colaboradores (2018), mostraram que o refúgio em bloco se torna mais eficiente quando permanece no mesmo local ano após ano e, quando os machos se dispersam

amplamente para acasalamento aleatório, enquanto as fêmeas permanecem em refúgio natal para acasalar e ovipositar (GUSE et al. 2002; ONSTAD et al. 2014). Esses fatores permitem que as pragas suscetíveis aumentem em número no refúgio com os machos dispersos garantindo a produção de heterozigotos na cultura inseticida após o acasalamento com quaisquer fêmeas resistentes a heterozigotos ou homozigotos. Da mesma forma, Ives e colaboradores (2011) observaram, também através de simulações matemáticas, que a evolução da resistência ocorre mais lentamente quando os insetos (principalmente as fêmeas) têm baixa dispersão e os refúgios são plantados nos mesmos campos ano após ano. Nesse caso, a população pode ser mantida no refúgio. Embora essa condução impacte em danos à cultura no refúgio, também garante que a resistência seja muito mais lenta para insetos com baixa dispersão (SISTERSON et al., 2005).

De acordo com os achados dos estudos acima mencionados, os machos de *D. saccharalis* podem ser peça-chave para promover a diluição dos genes de resistência, através da panmixia (cruzamento aleatório) da espécie. Dessa forma, o potencial de dispersão dos machos deve ser usado na definição da distância entre áreas de refúgio e plantio.

Os resultados obtidos neste estudo trazem importantes informações sobre comportamentos de *D. saccharalis* que podem afetar a taxa de evolução de resistência no sistema de cana-de-açúcar Bt, tais como a baixa mobilidade de fêmeas aliada ao hábito de oviposição agregada, bem como à probabilidade máxima de dispersão de machos utilizando dados de campo. Aliadas a informações já existentes na literatura, os resultados encontrados fornecem conhecimentos essenciais para o fortalecimento do plano de manejo de resistência de cana-de-açúcar Bt, contribuindo com informações que podem ser úteis para definir o posicionamento adequado do refúgio, salvaguardando a tecnologia da cana-de-açúcar Bt no Brasil. Entretanto, além destes aspectos comportamentais da movimentação e oviposição dos adultos, outro mecanismo que se faz necessário compreender é a probabilidade de ocorrência do acasalamento seletivo entre sobreviventes nos sistemas Bt e refúgio, o qual será abordado no próximo capítulo.

2.6. Conclusões

1 – Fêmeas de *D. saccharalis* tem preferência por ovipositar em regiões mais próximas de onde foram copuladas.

2 – Fêmeas de *D. saccharalis* se movimentam pouco após a cópula, sendo o macho provavelmente o maior responsável por promover a diluição do gene de resistência em sistemas de cana-de-açúcar Bt e refúgio.

3 – A probabilidade de encontro de machos após liberação em campo é reduzida conforme aumenta a distância do ponto de liberação.

4 – Machos de *Diatraea saccharalis* podem se movimentar em distâncias de até 800 metros, contudo, de acordo com os dados obtidos e probabilidades estimadas de captura, maiores densidades de insetos podem ser encontradas em distâncias mais próximas de liberação (0-400m).

Referências

BAILEY, T. C.; GATRELL, A. C. Interactive spatial analysis. **London: Logman Scientific and Technical**, 1995. 413p.

BAUTE, T. A grower's handbook: controlling corn insect pests with Bt corn technology, pp. 1-24. Canadian Corn Coalition. Ridgetown, **ON**, Canada, 2004.

BAVARESCO A.; GARCIA, M. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Efeito de fontes de carboidratos sobre o desempenho reprodutivo de *Spodoptera cosmioides* (Walk., 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev Bras Agrop** 7: 177-180, 2001.

BERNAYS, E. A. Evolution of feeding behavior in insect herbivores; success seen as different ways to eat without being eaten. **BioScience** 48: 35-44, 1998.

BYERS, C. J.; EASON, P. K. Conspecifics and their posture influence site choice and oviposition in the damselfly *Argia moesta*. **Ethology**, v. 115(8), p. 721-730, 2009.

CAIXETA, D. F. **Dispersão de machos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar**. 48 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal-SP, 2010.

CLARK, B. R. AND S. H. FAETH. The consequences of larval aggregation in the butterfly *Chlosyne lacinia*. **Ecological Entomology**, v. 22, p. 408–415, 1997.

CTC – CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA **Bula Técnica CTC 20 BT**. Centro de Tecnologia Canavieira, 20 p. Disponível em: <<https://variedadesctc.com.br/wp-content/uploads/2018/04/BulaCTC20BT.pdf>>. Acesso em: 10/02/2021, 2017.

DALECKY, A.; PONSARD, S.; BAILEY, R.I.; PELISSIER, C.; BOURGUET, D. Resistance evolution to Bt crops: pre-dispersal mating of European corn borers. **PLoS Biol.** 4: 1048–1057, 2006.

FRANCISCHINI, F. J.; CORDEIRO, E. M.; DE CAMPOS, J. B.; ALVES-PEREIRA, A.; VIANA, J. P. G.; WU, X.; BROWN, P.; JOYCE, A.; AND MURUA, G. *Diatraea saccharalis* history of colonization in the Americas. The case for human-mediated dispersal. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–16, 2019.

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

GUAGLIUMI, P. Pragas da cana-de-açúcar - Nordeste do Brasil. MIC - **Instituto do Açúcar e do Alcool**, Rio de Janeiro, Brasil, p.622, 1972.

GUEVARA, L. A. C. Frequência de cópula da *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em condições de campo e laboratório. **Agropecuária Técnica**, v. 1, n. 1, p. 24-31. 1980.

GUSE, C. A., D. W. ONSTAD, L. L. BUSCHMAN, P. PORTER, R. A. HIGGINS, P. E. SLODERBECK, G. B. CRONHOLM, AND F. B. PEAIRS. Modeling the development of resistance by stalk-boring Lepidoptera (Crambidae) in areas with irrigated, transgenic corn. **Environ. Entomol.** 31: 676–685, 2002.

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p. 565-571, 1998.

HENDRICKS, D. E.; LEAL, M. P.; ROBINSON, S. H.; HERNANDEZ N. S. Oil-soluble black dye in larval diet marks adults and eggs of tobacco budworm and pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 64, p. 1339-1401, 1971.

HERBERT, P. D. Egg dispersal patterns and adult feeding behaviour in the Lepidoptera. **Can. Entomol.**, v. 115, p. 1477-1481, 1983.

HILKER, M., AND T. MEINERS. 2002. Induction of plant responses towards oviposition and feeding of herbivorous arthropods: a comparison. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 104, p. 181-192, 2002.

HUNT, T. E.; HELLMICH, R. L.; DYER, J. M.; HIGLEY, L. H.; WITKOWSKI, J. F. Oil Soluble dyes for marking European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 35, p. 338-341, 2000.

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

JERVIS, M. A.; BOGGS, C. L.; FERNS, P. N.; Egg maturation strategy and its associated trade-offs: a synthesis focusing on Lepidoptera. **Ecol Entomol** 30: 359-375, 2005.

LEI, Z.; LIU T.; GREENBERG, S. Feeding, oviposition, and survival of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) on Bt and non-Bt cottons. **Bull Entomol Res** 99:3, 2009.

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

MILANO, P.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R.P.; ODA, M. L. & CÔNSOLI, F. L. Efeito da alimentação da fase adulta na reprodução e longevidade de espécies de Noctuidade, Crambidae, Tortricidade e Elachistidade. **Neotropical Entomology** 39: 172-180, 2010.

MILLER, N. J.; SAPPINGTON, T. W. Role of dispersal in resistance evolution and spread. *Current Opinion in Insect Science*, v. 21, p. 68–74, 2017.

MORAL, R.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. Half-normal and overdispersed models in r: The hnp package. *Journal of Statistical Software*, Articles 81, 1-23, 2017.

NELDER, J. A. E WEDDERBURN, R. W.M. Generalized Linear Models. *Journal of the Royal Statistical Society A*. 135, 370-384, 1972.

ONSTAD, D. W., MITCHELL, P.D; HURLEY, T.M; LUNDGREN J.G; PATRICK, PORTER R, KRUPKE C.H; SPENCER, J.L; DIFONZO, C, D; BAUTE T.S; HELLMICH RL: Seeds of change: corn seed mixtures for resistance management and integrated pest management. *J. Econ. Entomol*, 104:343-352, 2011.

ONSTAD, D. W., AND L. KNOLHOFF, Arthropod resistance to crops, pp. 293–326. In D. W. Onstad (ed.) *Insect resistance management: biology, economics and prediction*. 2nd ed. Academic Press, London, UK, 2014.

ONSTAD, D. W.; CRESPO, A. L. B., PAN, Z.; CRAIN, P. R.; THOMPSON, S. D.; PILCHER, C. D.; SETHI, A. Blended refuge and insect resistance management for insecticidal corn, *Environmental Entomology*, v. 47, n.1, p. 210–219, 2018.

OSTLIE, K. R.; HUTCHINSON, W. D.; and HELLMICH, R. L.; Bt Corn and european corn borer: Long-term success through resistance management, North Central Regional Extension Publication, **NCR 602**, USA, 1997.

PAVINATO VA, MICHEL AP, DE CAMPOS JB, ET AL.: Influence of historical land use and modern agricultural expansion on the spatial and ecological divergence of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in Brazil. *Heredity (Edinb)*, 120(1): 25–37, 2018.

PIMENTEL, G. P. **Comportamento de oviposição e desempenho larval de *Diatraea saccharalis* em genótipos de cana-de-açúcar**. 83 f. Dissertação (Magister Scientiae) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

QURESHI, J. A., L. L. BUSCHMAN, J. E. THRONE, AND S. B. RAMASWAMY. Adult dispersal of *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Crambidae) and implications for its resistance management in Bt-maize. **J. Appl. Entomol.** 129: 281-292, 2005.

QURESHI, J. A.; BUSCHMAN, L. L.; THRONE, J. E.; RAMASWAMY, S. B. Dispersal of adult *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) and its implications for corn borer resistance management in *Bacillus thuringiensis* maize. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n. 2, p. 279–291, 2006.

SISTERSON, M.S.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; TABASHNIK, B. Evolution of Resistance to Transgenic Crops: Interactions Between Insect Movement and Field Distribution. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 6, p. 1751–1762, 2005.

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

TORRES J.B, RUBERSON J.R. Spatial and temporal dynamics of oviposition behavior of bollworm and three of its predators in Bt and nonBt cotton fields. **Entomol Exp Appl** 120:11–2, 2006.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), (2001) **Biopesticides Registration Action Document: *Bacillus thuringiensis* Plant-Incorporated Protectants** (10/16/01), posted at <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/reds/brad_bt_pip2.htm>.

WORTON, B.J. Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies Author (s): B. J. Worton Published by: Ecological Society of America Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution In Home-Range Studies'. **Ecology**, v. 70, n. 1, p. 164–168, 1989. Disponible em: <<http://www.jstor.org/stable/1938423>>.

YANG F.; KERNS D.; HUANG, F. Refuge-In-the-bag strategy for managing Insect Resistance to Bt maize, **Outlooks on Pest Management**, 26: 226–228, 2015.

3. EFEITO DA CANA-DE-AÇÚCAR BT E ISOLINHA NÃO-BT NO DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS E TEMPO DE EMERGÊNCIA DE ADULTOS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

RESUMO

A cana-de-açúcar transgênica tem sido explorada para controlar a principal praga da cultura, a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Para garantir a longevidade das tecnologias Bt disponíveis, é imprescindível que haja estudos que subsidiem os programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos da cana Bt e não-bt sobre o ciclo de vida de *D. saccharalis* e sobre o potencial dos adultos sobreviventes para a disseminação da resistência na população. A janela temporal da emergência de machos e fêmeas adultas nas populações provenientes de plantas Bt e não-bt também foi avaliada, visando quantificar a probabilidade de ocorrência de cópula entre os insetos emergentes de populações provenientes dos dois tipos de plantas. A mortalidade média dos indivíduos que se alimentaram em folha-de-cana-de-açúcar Bt de 95,02% comparada a 9,25% que se alimentaram da isolinha não-bt. No desenvolvimento dos insetos dado em colmo de cana-de-açúcar, a sobrevivência final foi de 9,17% e 41,33% de indivíduos que se alimentaram de cana-de-açúcar Bt e não-bt, respectivamente. O tempo de desenvolvimento dos insetos imaturos se prolongou em média 12 dias em cana Bt, em comparação aos insetos alimentados de cana-de-açúcar não-bt. Isso impactou significativamente no tempo de emergência de adultos no sistema Bt. O tempo para emergência de machos foi menor em relação às fêmeas nas populações advindas de plantas Bt, reduzindo as chances de acasalamento entre machos e fêmeas dentro da população. Na população de insetos advindos das plantas não-bt a emergência de ambos os sexos foi sincrônica, aumentando as chances de acasalamento dentro da mesma população. A quantidade de ovos de fêmeas oriundas de plantas Bt foi significativamente menor em relação a quantidade fêmeas alimentadas com cana-de-açúcar não-bt, contudo, o peso das pupas e a viabilidade de ovos não se diferiram entre os tipos de plantas. Esse é um dos primeiros estudos a abordar a problemática da resistência de insetos à cultura da cana-de-açúcar transgênica no Brasil. Tais estudos devem ser refinados e ampliados a sistemas reais, visando a sustentabilidade deste importante método de controle de pragas na agricultura brasileira.

Palavras-chave: Ciclo de vida, Tempo de desenvolvimento, Sincronia na emergência de adultos

ABSTRACT

EFFECT OF SUGAR CANE BT AND NON-BT ISOLINE ON THE DEVELOPMENT OF IMATURES AND EMERGENCY TIME OF ADULTS OF *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Transgenic sugarcane has been used to control the main crop pest, the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). To guarantee the longevity of available Bt technologies, it is essential performing studies to support Insect Resistance Management (MRI) programs. The objectives of this work were to evaluate the effects of Bt and Non-bt sugarcane on the life cycle of *D. saccharalis* and on the potential of resistance development on adult population. The time window for the emergence of adult males and females in populations from Bt and non-bt plants was also evaluated, aiming to quantify the mate probability among insects emerging from populations of both types of plants. The mortality of individuals in which fed on sugar cane leaf was 95.02% compared to 9.25% of individuals fed on non-Bt isoline leaf. The development of insects given in sugarcane stalk, the final survival was 9.17% and 41.33% of individuals which fed on Bt and Non-bt sugarcane, respectively. The development time of immature insects fed on Bt plants extend an average of 12 days compared to insects fed on non-bt sugarcane. This changes significantly impacted the time of emergence of adults in the Bt system. The time of emergence of males was shorter in relation to females in populations from Bt plants, reducing the chances of mating between males and females within the population. In the population of insects from non-bt plants, the emergence of both sexes was synchronous, increasing the chances of mating within the same population. The number of eggs from females from Bt plants was significantly lower than

the number of females fed with non-bt sugarcane, however, pupae weight and egg viability did not differ between types of plants. This was one of the first studies to address the problem of insect resistance to the cultivation of transgenic sugarcane in Brazil. Such studies must be refined and extended to real systems, aiming at the sustainability of this important method of pest control in Brazilian agriculture.

Keywords: Life cycle, Development time, Synchrony of adult emergence

3.1. Introdução

A cultura da cana-de-açúcar é uma importante *commodity* comercial com grande potencial bioenergético e industrial. Nesse contexto, a biotecnologia da cana-de-açúcar oferece uma ferramenta valiosa ao Manejo Integrado de Pragas (MIP) ao introduzir características comercialmente importantes em genótipos produtivos. A utilização da engenharia genética no redesenho de variedades comerciais de cana-de-açúcar com tolerância a estresses bióticos, abióticos e parâmetros de qualidade oferece grandes vantagens para sanidade e produtividade alavancando o setor sucroenergético (KHAN e KHAN, 2019).

A primeira cana-de-açúcar geneticamente modificada foi aprovada para cultivo na Indonésia, com gene que confere a tolerância à seca (PARISI et al., 2016). No Brasil em 2017, o lançamento da variedade CTC 20 Bt, conferiu resistência à principal praga da cultura, a broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), responsável por grandes perdas à safra todos os anos, resultando em custos significativos à produção da cultura. Essa variedade foi desenvolvida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), que comprovou que o gene Bt é completamente eliminado nos seus derivados durante o processamento industrial, ou seja, o açúcar de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificada é considerado idêntico ao açúcar produzido a partir de cana-de-açúcar convencional (LAJOLO; YOKOYAMA e CHEAVEGATTI-GIANOTTO, 2020).

Danos inesperados de *D. saccharalis* foram reportados em eventos de milho Bt TC1507 (expressando Cry1F) e MON 89034 × MON 88017 (expressando Cry1A.105 e Cry2Ab2) em uma área isolada da Província de San Luis, na Argentina. De acordo com Grimi et al. (2017), em uma investigação realizada com diferentes populações de *D. saccharalis* coletadas em áreas problema, os resultados indicaram a resistência a Cry1F e Cry1A.105, mas não a Cry1Ab ou Cry2Ab2. A resistência ao MON 89034 × MON 88017 foi funcionalmente recessiva. Avaliações de registros de produtores sugeriram que a resistência inicialmente evoluiu para Cry1F, conferindo resistência cruzada para Cry1A.105, com baixa conformidade de refúgio como a causa principal.

Nesse sentido, para garantir a longevidade das tecnologias Bt disponíveis, é imprescindível que haja estudos que subsidiem os programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI).

Os impactos das cultivares Bt sobre a resistência dos insetos e a disseminação dos genes de resistência na população podem ser minimizados pelo uso de áreas de refúgio. A estratégia de refúgio tem duas suposições críticas: que a herança da resistência é recessiva e que o acasalamento aleatório ocorre entre insetos suscetíveis e resistentes. Se a resistência for recessiva, a prole híbrida de primeira geração (F₁) produzida por cruzamentos entre adultos suscetíveis e resistentes é morta ao ingerir plantas Bt. Se o acasalamento for aleatório, os adultos inicialmente raros homozigotos resistentes emergindo de plantas Bt provavelmente se acasalaram com os adultos suscetíveis homozigotos mais abundantes emergindo de plantas não-bt, produzindo progênie F₁ híbrida que não pode sobreviver em plantas Bt (LIU et al, 1999).

Estudos envolvendo modelos matemáticos e dados obtidos através de experimentação em laboratório e casa de vegetação indicam que a resistência pode ser substancialmente atrasada quando essas suposições são válidas. Para possibilitar o acasalamento aleatório, entretanto, adultos resistentes oriundos de plantas Bt e adultos suscetíveis oriundos de plantas não-bt devem emergir sincronicamente (GOULD, 1998; TABASHNIK, 1994).

Visando avaliar os efeitos da cana Bt sobre o ciclo de vida de *D. saccharalis* e sobre o potencial reprodutivo dos adultos, foram avaliadas as taxas de sobrevivência e tempo de desenvolvimento dos imaturos de insetos que se desenvolveram em folhas e colmos de cana-de-açúcar Bt e de cana-de-açúcar não-bt. A janela temporal da emergência dos adultos nas populações provenientes de plantas Bt e não-bt também foi avaliada, visando quantificar a probabilidade de ocorrência de cópula entre as populações provenientes dos dois tipos de plantas hospedeiras.

Houve uma elevada mortalidade larval de *D. saccharalis* quando expostas às folhas de cana-de-açúcar transgênicas. No colmo, os insetos sobreviventes na cana-de-açúcar Bt levaram em média 12 dias a mais para completarem seu ciclo de vida em comparação com os insetos oriundos da cana-de-açúcar não-bt. O desenvolvimento prolongado da fase imatura impactou significativamente o tempo da emergência de adultos oriundos de plantas Bt em relação à população oriunda de plantas não-bt. Também foi observada diferenças nos tempos de emergência de machos e fêmeas da população Bt, na qual os machos emergiram antecipadamente em relação às fêmeas, reduzindo as chances de cópula seletiva entre

indivíduos dentro da mesma população. Já na população de insetos advindos das plantas não-bt a emergência de ambos os sexos foi sincrônica, aumentando as chances de acasalamento dentro da mesma população. A quantidade de ovos de fêmeas oriundas de plantas Bt foi significativamente menor em relação a quantidade fêmeas alimentadas com cana-de-açúcar não-bt, contudo, o peso das pupas e a viabilidade de ovos não se diferiu entre os tipos de plantas

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Criação de *Diatraea saccharalis*

A população experimental de *D. saccharalis* utilizada neste estudo foi cedida pelo laboratório de Biologia de Insetos no Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ/USP), a população suscetível referência é mantida em laboratório desde 2008 livre de pressão de seleção por proteínas Bt e inseticidas. A criação dos insetos foi estabelecida no laboratório de Entomologia no Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, criadas em dieta à base de farelo de soja e germe de trigo (MACEDO et al., 1983) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, 70 ± 10 UR e 12 horas de fotoperíodo.

3.2.2. Bioensaios com tecido foliar

Para avaliar a suscetibilidade de *D. saccharalis* em folhas da tecnologia de cana-de-açúcar transgênica foram utilizadas gemas dos materiais comerciais CTC-Bt contendo Cry1Ac e a isolinha não-bt CTC-WT, plantadas individualmente em vasos de 5 litros contendo substrato. Aos 60 e aos 120 dias após a germinação, as folhas +1 foram coletadas e no laboratório, foram cortadas em pedaços de cinco centímetros de comprimento. Os tecidos foliares foram acondicionados sobre uma camada de ágar-ágar geleificada a 1,5% (2mL/célula) em placas de 32 células (Biossoplay). Posteriormente, com o auxílio de um pincel, foram inoculadas 16 lagartas neonatas (menos de 24h de idade) de *D. saccharalis* por célula. As bandejas foram seladas com o adesivo respirável e acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. A mortalidade larval foi avaliada após 7 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 96 repetições, cada repetição constituída por 16 lagartas/células.

3.2.3. Biologia de *D. saccharalis* em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-bt

Para avaliar os efeitos entomotóxicos de plantas Bt na biologia e desenvolvimento de *D. saccharalis*, foram disponibilizados colmos de cana-de-açúcar das variedades CTC-Bt e a isolinha não-bt às lagartas. Os segmentos de colmos foram retirados do campo de touceiras em fase vegetativa, aos 180 dias após o plantio.

Após a limpeza do material com água e detergente neutro, os colmos foram seccionados em segmentos menores contendo a gema apical com cinco centímetros de altura. Esses segmentos foram vedados com parafina derretida para reduzir o ressecamento evitando trocas frequentes do material vegetal. Posteriormente a vedação, os colmos foram acondicionados em copos plásticos de 150 mL e em seguida, foram infestados com 10 lagartas em 2º instar (Figura 10), as quais foram alimentadas anteriormente com o tecido foliar das respectivas plantas até o segundo instar larval seguindo a metodologia descrita no item 3.1.2. Após a transferência das lagartas nos colmos, estas se movimentaram naturalmente para as gemas até perfurarem o colmo. As lagartas foram alimentadas com colmos até a fase de pupa. Os colmos foram substituídos semanalmente e mantidos em câmara climatizada (temperatura $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14:10). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 60 repetições, sendo cada repetição constituída por 10 lagartas.

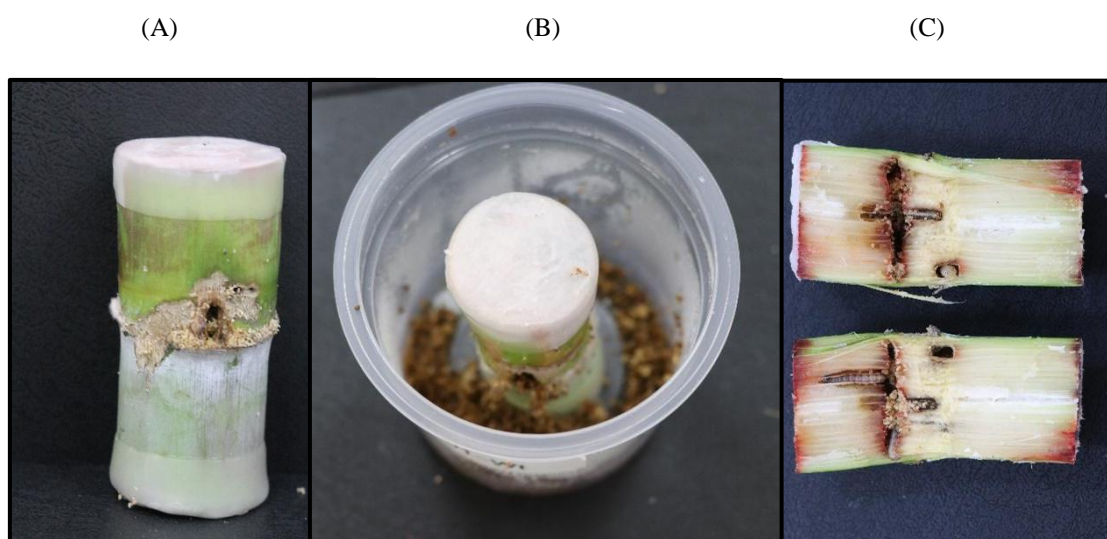


Figura 10. Recipiente contendo um segmento de colmo vedado com parafina utilizado no experimento de biologia de *Diatraea saccharalis*. Em (A) colmo com orifício na gema apical realizado naturalmente pelas lagartas, (B) vista apical do colmo vedado com parafina e (C) porção interna do colmo com a presença de duas lagartas formando galerias durante a alimentação.

Para cada tratamento (planta Bt e não-bt) avaliou-se a duração e a sobrevivência dos indivíduos da fase de lagarta à pupa, e o peso final das pupas. A avaliação dos insetos na fase imatura (no interior dos colmos) foi realizada a cada semana, durante a troca dos colmos, evitando ao máximo a possível interferência do manuseio dos colmos sobre a obtenção dos dados. O período total de avaliação do estágio imaturo correspondeu a 19 semanas, totalizando 133 dias de observação.

Ao chegarem ao período de pupa, estas foram retiradas dos colmos, e separadas por sexo. Após a emergência dos adultos, os machos e fêmeas, de idades correspondentes, foram alocados em copos plásticos de 500 ml para a cópula e obtenção dos ovos. No interior do copo foi adicionado um papel filtro para suprimento da umidade e não foi adicionado suplemento alimentar. As gaiolas permaneceram em sala climatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 70 ± 10 UR e 12 horas de fotoperíodo. O número de casais avaliados foi dependente da emergência sincrônica entre machos e fêmeas dentro de um mesmo tratamento. O número total de ovos foi contabilizado até a morte das fêmeas. Para a quantificação da viabilidade de ovos, foram usadas as primeiras posturas de cada casal. Também foram contabilizados a longevidade de machos e fêmeas.

3.2.4. Análise estatística

3.2.4.1. Bioensaios com tecido foliar

O efeito do tratamento (Bt e não-bt) e da idade da planta (60 ou 120 dias) sobre a sobrevivência das lagartas de primeiro instar foi analisada através do ajuste de Modelos Linearmente Generalizados com distribuição de erros Binomial. A significância dos efeitos foi avaliada por meio de testes de máxima verossimilhança e comparações múltiplas foram realizadas obtendo-se os intervalos de confiança de 95% para os preditores lineares.

3.2.4.2. Biologia de *D. saccharalis* em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-bt

A sobrevivência dos indivíduos do estágio larval até a fase de pupa em função dos tratamentos (Bt e não-bt) e dias de observação (semanas) e a viabilidade dos ovos em função dos tratamentos (Bt e não-bt) foram analisados através do ajuste de Modelos Linearmente Generalizados com distribuição de erros Binomial, corrigidos para superdispersão quando necessário. Os efeitos da longevidade das fêmeas e dos tratamentos (Bt e não-bt) sobre a

quantidade total de ovos e os efeitos do tratamento (Bt e não-bt) e do sexo sobre a longevidade dos adultos foram analisados através do ajuste de modelos linearmente generalizados com distribuição Poisson, corrigidos para superdispersão. A significância dos efeitos foi avaliada por meio de testes de máxima verossimilhança e comparações múltiplas foram realizadas obtendo-se os intervalos de confiança de 95% para os preditores lineares.

O efeito do tratamento (Bt e não-bt) e do sexo dos indivíduos sobre o peso das pupas foi analisado através de Análise de Variância (two-way ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey com 5% de confiança.

Para a análise do período de emergência, a quantidade de adultos que emergiram foi ordenada entre 49 e 126 dias, período no qual foi observado a emergência de adultos viáveis nos dois tratamentos. Dessa forma, considerando cada dia como uma variável ordinal, os dados de emergência foram analisados através de regressão logística proporcional, incluindo os efeitos do tratamento (Bt e não-bt) no preditor linear.

A qualidade dos ajustes dos modelos usados foi avaliada usando gráficos semi-normais com envelopes simulados (MORAL et al., 2017). Para todas as análises foi utilizado o Software estatístico R (R Development Core Team, 2015).

3.3. Resultados

3.3.1. Bioensaios com tecido foliar

A idade das plantas (60 e 120 dias) e o tipo de planta (tratamentos Bt e não-bt) tiveram efeitos interativos e significativos sobre a sobrevivência de lagartas neonatas de *D. saccharalis* (trat×dias: $Dev_{1,381}=5,6991$, $p<0.05$; dias: $Dev_{1,382}=93,39$, $p<0.05$; trat: $Dev_{1,382}=55466,3$, $p<0.05$). A sobrevivência das lagartas nas plantas Bt foram drasticamente reduzidas quando comparadas à isolinha não-bt. Esta redução foi maior quando as lagartas se alimentaram de plantas Bt mais velhas, com 120 dias após a germinação (Tabela 6). De maneira geral, as lagartas que se alimentaram de folhas de plantas Bt apresentaram sobrevivência abaixo de 8%, enquanto a sobrevivência das lagartas que se alimentaram de plantas não-bt foi superior a 87% (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem Média (\pm Desvio Padrão) de sobrevivência de lagartas neonatas de *Diatraea saccharalis* após sete dias de infestação em tecido foliar de cana-de-açúcar Bt e não-bt. DAP= dias após o plantio.

Tratamento	Folha 60 DAP	Folha 120 DAP
CTC-Bt	7,87 (\pm 7,22) a	2,08 (\pm 3,58) a
Isolinha não-bt	94,07 (\pm 5,9) b	87,43 (\pm 6,44) b

Valores seguidos por letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença significativa na comparação entre os tipos de plantas ($P < 0,05$).

3.3.2. Biologia de *D. saccharalis* em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-bt – Fase de imaturos

Houve efeito significativo da alimentação em cana Bt nos parâmetros biológicos dos indivíduos que se alimentaram em plantas Bt em relação aos insetos que se alimentaram em plantas não-bt durante a fase larval, principalmente no que tange o tempo de desenvolvimento do imaturo e por consequência a emergência dos adultos.

As taxas de sobrevivência dos imaturos ao longo do tempo variou com o tipo de planta hospedeira (planta hospedeira \times tempo: $F_{35,1}=46,51$, $P < 0,005$; planta hospedeira: $F_{1,36}=46,511$; $P < 0,005$ e tempo: $F_{1,36}=430,01$, $P < 0,005$).

A Figura 11 mostra o decréscimo na fração (%) de indivíduos no estágio imaturo ao longo do tempo nos colmos das duas plantas hospedeiras. A redução da quantidade de imaturos no interior dos colmos das plantas se deu em um primeiro momento devido à mortalidade larval. Esta fase correspondeu ao período de 1 a 49 dias para a população não-bt e de 1 a 56 dias para a população Bt. Após este período, a redução do número de indivíduos se deu não somente à mortalidade dos imaturos, mas também devido à emergência dos adultos (período correspondente às linhas horizontais cinzas pontilhadas (Figura 11).

Foi observada uma grande variação no tempo de desenvolvimento dos insetos. Nas plantas Bt, alguns insetos permaneceram até 133 dias no interior dos colmos até completar seu desenvolvimento. Nas plantas não-bt o tempo de permanência foi menor, com duração de até 112 dias até a emergência do último adulto (Figura 11).

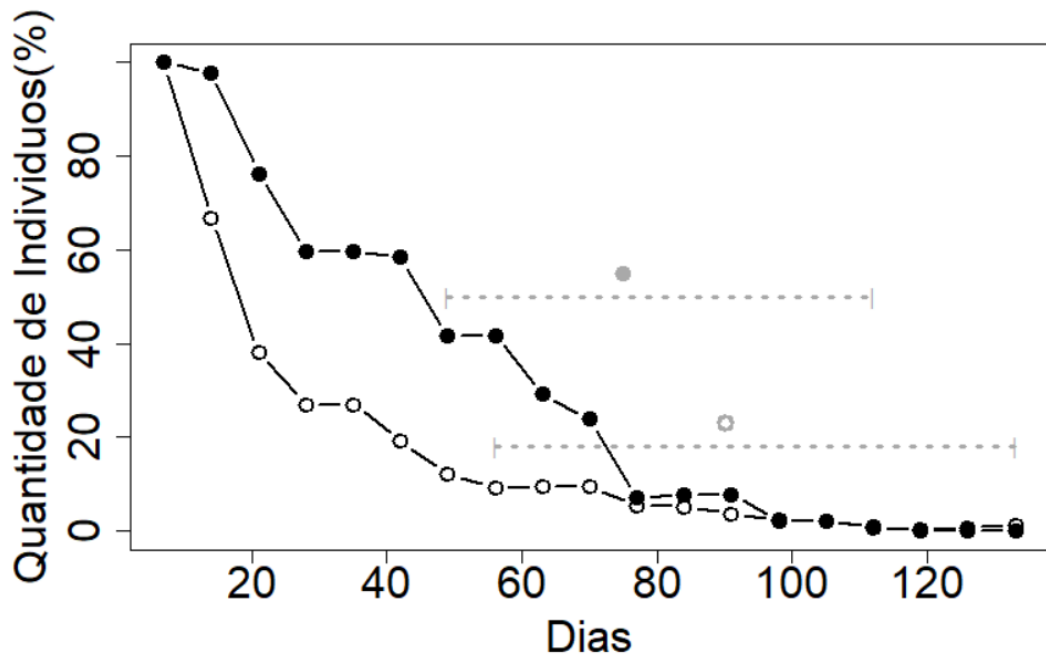


Figura 11. Queda na fração (%) de imaturos presentes em colmos de cana-de-açúcar Bt (círculos abertos) e não-Bt (círculos fechados). As linhas cinzas pontilhadas indicam o período de emergência de adultos nas populações das plantas hospedeiras. Dessa forma, no período anterior às linhas pontilhadas, a queda na quantidade de indivíduos se dá devido a mortalidade dos imaturos e no período compreendido entre as linhas pontilhadas, a queda da quantidade de indivíduos no estágio imaturo se dá devido a emergência dos adultos e devido a mortalidade de indivíduos imaturos.

A figura 12 mostra a mortalidade de *D. saccharalis* em cada estágio de vida nos dois tipos de plantas. No tratamento Bt, apenas 9,17% dos indivíduos chegaram à fase adulta e as maiores taxas de mortalidade se deram nos primeiros instares larvais (50% dos indivíduos morreram antes de atingirem o terceiro instar). Nos colmos das plantas não-Bt, 41,33% dos indivíduos chegaram à fase adulta. Até a fase de pupa mais de 50% da população inicial sobreviveu no interior dos colmos (Figura 12).

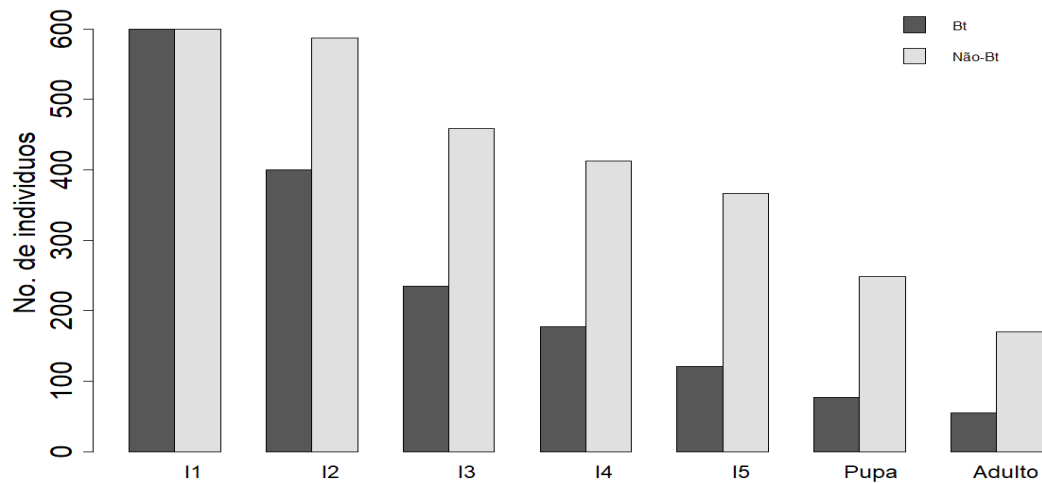


Figura 12. Quantidade de *Diatraea saccharalis* por estágio de vida em colmos de cana Bt e não-bt.

Ao considerar a sobrevivência das lagartas em função do tempo de desenvolvimento (semanas) de avaliação, foi observada a sobreposição de diferentes instares larvais na população de insetos que se alimentaram de plantas Bt. Alguns indivíduos permaneceram em segundo instar até a 5ª semana após o início do experimento, indicando o efeito entomotóxico do Bt na extensão do período de desenvolvimento larval (Figura 13). Também foi observado a presença de imaturos no interior dos colmos até a 19ª semana (133 dias) de observação (Figura 13).

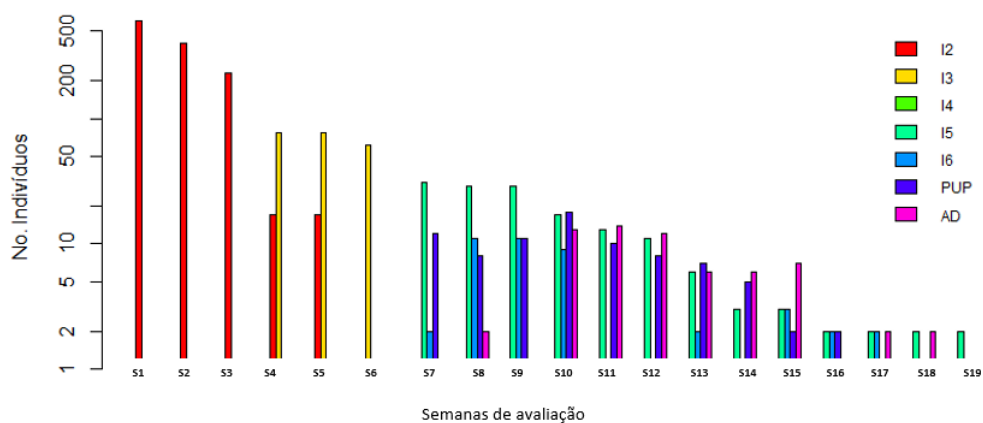


Figura 13. Número de sobreviventes e estágios de vida de *Diatraea saccharalis* em colmos de cana-de-açúcar Bt ao longo de 19 semanas de observação.

Quanto à sobrevivência das lagartas em colmos de cana não-bt observou-se menor sobreposição dos estágios de vida e menor tempo para completar o ciclo Larva-adulto. A

partir da 2ª semana de experimento, ao contrário do observado nos indivíduos que se alimentaram de cana Bt, os indivíduos em segundo instar não foram mais encontrados, e após 15 semanas do início do experimento não havia mais indivíduos no estágio imaturo no experimento (Figura 14).

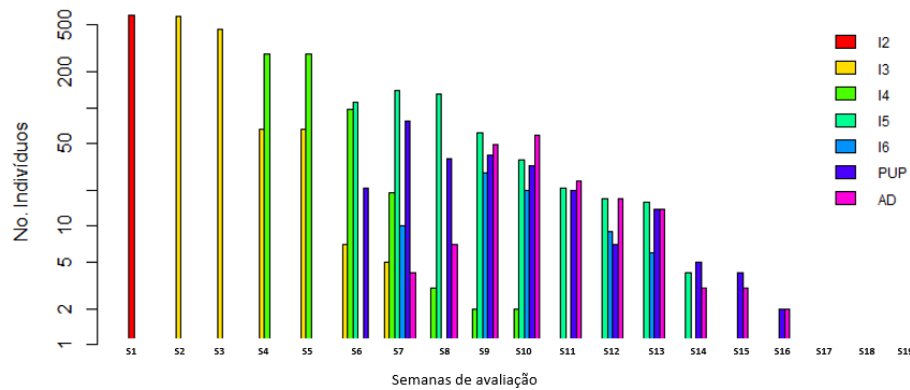


Figura 14. Número de sobreviventes e estágios de vida de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar não-bt ao longo de 19 semanas de experimento.

O tipo de planta, não influenciou o peso das pupas ($F_{1,318}=2,609$, $p<0,05$). Somente o sexo exerceu influência no peso das pupas ($F_{1,320} = 201.4$; $P<0,005$). O peso das pupas das fêmeas foi maior comparado aos pesos das pupas dos machos (Figura 15).

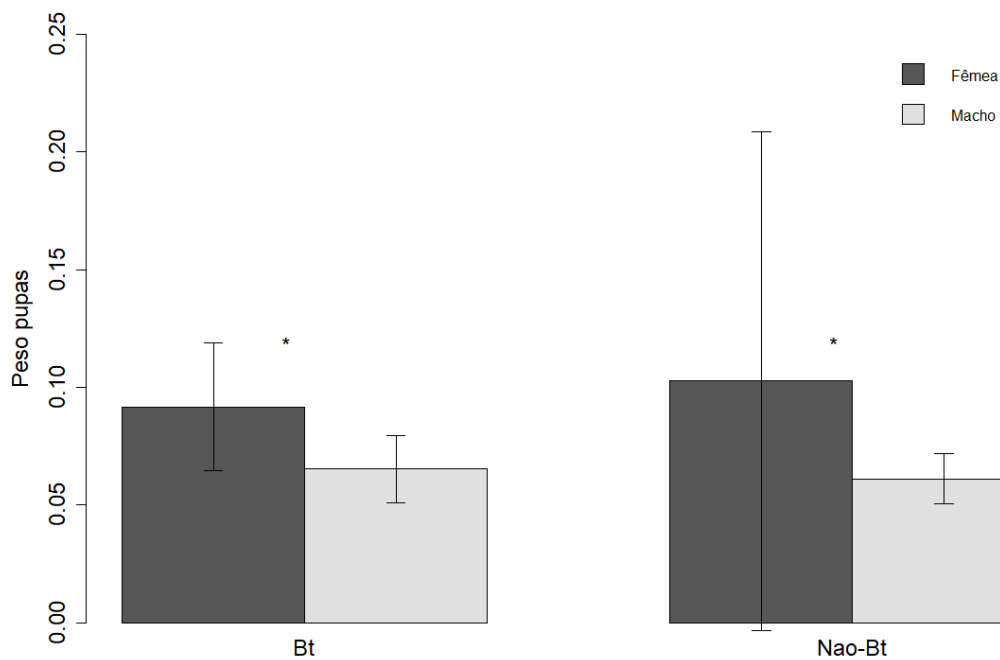


Figura 15. Peso de pupas de fêmeas e machos alimentados em colmos de diferentes plantas hospedeiras: cana-de-açúcar Bt e não-bt. O asterisco representa diferença significativa entre os sexos dentro de cada tipo de planta hospedeira.

3.3.3. Biologia de *D. saccharalis* em colmo de cana-de-açúcar Bt e não-bt - Fase adulta

O tipo de planta hospedeira afetou o período de emergência de fêmeas e machos (sexo \times trat: $\chi^2=7,44$, gl=1, $p<0.05$; sexo: $\chi^2=34,90$, gl=1, $p<0.05$ e trat: $\chi^2=0,118$, gl=1, $p>0.05$). O período de emergência de adultos que se alimentaram em colmos não-bt foi menor quando comparados aos adultos que emergiram das plantas Bt (Figura 17).

Em plantas não-bt não foi observada diferenças no tempo de emergência de machos e fêmeas ($\chi^2=1,19$, gl=1, $p=0,27$), ou seja, foi observada sincronia na emergência de macho e fêmeas na população ($\bar{x}=70,66$ e $\bar{x}= 68,51$ dias para fêmeas e machos, respectivamente). Entretanto, o tempo de emergência de machos e fêmeas que se alimentaram de plantas Bt diferiram entre si ($\chi^2=6,72$, gl=1, $p<0.05$): machos emergiram em menor período comparado às fêmeas ($\bar{x}= 76,45$ dias e $\bar{x}= 86,16$ dias para machos e fêmeas, respectivamente).

Considerando as curvas de emergência estimadas pelo modelo e os comportamentos e padrões de movimentação observados no capítulo anterior, em que foi observado que as fêmeas têm baixa motilidade, sugerindo que o movimento dos machos seria o maior responsável pelas taxas de encontro para a cópula, foram feitas estimativas para avaliar o potencial de acasalamento entre populações advindas de plantas Bt e não-bt.

Dessa forma, por exemplo, com base nas curvas de emergência obtidas, no período em que 50% dos machos presentes no refúgio emergirem, eles teriam a possibilidade de encontrar 60% das fêmeas que emergiram das plantas não-bt e 13% das fêmeas que emergiram das plantas Bt (quadrado azul na figura 16). Da mesma forma, quando 50% dos machos provenientes de plantas Bt emergirem, há a possibilidade destes indivíduos encontrarem no sistema com 75% das fêmeas provenientes de plantas não-bt e com apenas 23% das fêmeas provenientes das plantas Bt (quadrado vermelho na Figura 16). Estes resultados sugerem que, em campos onde existe refúgio (áreas com plantas não-bt) e plantas Bt, em termos de evolução da resistência, os machos emergentes em áreas Bt na busca por cópula têm maior probabilidade de dispersar para áreas de refúgio, atraídos por feromônios liberados pelas fêmeas lá presentes, que emergem antes da população de fêmeas nas plantas Bt.

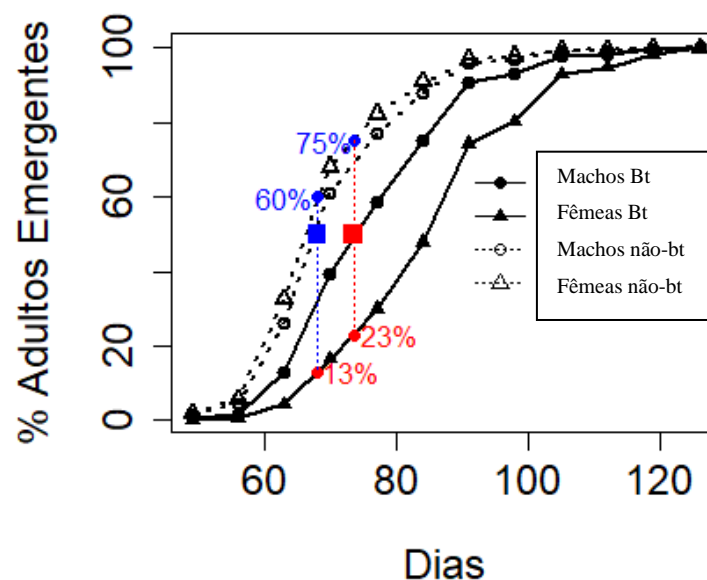


Figura 16. Curva de emergência estimada para adultos, machos e fêmeas de *Diatraea saccharalis* após a alimentação em colmos de cana-de-açúcar Bt e não-bt. À direita do gráfico, o quadrado azul corresponde a um evento considerando 50% dos machos emergidos no sistema não-bt, nesta situação o ponto azul faz correspondência a 60% das fêmeas não-bt disponíveis. Neste mesmo sistema tem-se 13% das fêmeas no sistema Bt ponto vermelho. À esquerda, no quadrado azul tem-se, 50% dos machos emergidos no Bt, no ponto azul 75% das fêmeas no sistema não-bt, e no ponto vermelho 23% das fêmeas emergidas no sistema Bt.

Após a emergência dos adultos, foram avaliados 42 casais originados dos colmos de plantas não-bt e 13 casais dos colmos de plantas Bt. A quantidade de casais avaliados diferiu entre os tipos de plantas devido a variação na data de emergência de machos e fêmeas.

Do total dos casais avaliados, 36 (85,75%) fêmeas não-bt e 7 fêmeas Bt (53,8%) realizaram postura de ovos durante a vida adulta. A análise mostrou que a planta hospedeira na qual os insetos se alimentaram durante a fase larval teve efeito na quantidade de ovos produzidos pelas fêmeas ao longo da vida ($F_{1,54}=5,194$; $p<0,05$) e sobre a longevidade dos adultos ($F_{1,109}=9,0844$, $p<0,05$). Fêmeas da população não-bt produziram mais ovos e apresentaram maior longevidade, comparadas às fêmeas da população Bt (Tabela 7). Entretanto, o efeito das plantas não foi significativo sobre a viabilidade dos ovos ($F_{1,26}=0,6234$, $p>0,05$), ou seja, a taxa de eclosão de lagartas foi a mesma para as duas populações.

A longevidade das fêmeas não influenciou a quantidade de ovos produzidos pelas fêmeas ao longo da vida ($F_{1,53}=-45,104$, $p>0,05$) e machos e fêmeas apresentaram a mesma longevidade dentro do mesmo tratamento ($F_{1,108}=-2,07$, $p>0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Total de ovos produzidos pelas fêmeas, viabilidade de ovos e longevidade de machos e fêmeas que se alimentaram em colmos de dois tipos de plantas: Bt e não-bt.

Tratamento	N° de ovos/fêmea	Viabilidade (%)	Longevidade	
			Fêmea	Macho
não-bt	125,38 (107,16) a	42,3a	7,07 (2,672286) a	6,33 (2,834170) a
Bt	57,15 (76,08) b	36,1a	5,30 (1,702186) b	4,96 (1,739437) b

Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

3.4. Discussão

O vigente sistema de produção agrícola brasileiro promove uma sobreposição espacial e temporal de cultivos Bt (por exemplo nas culturas de milho e algodão) no campo, com infestações constantes de populações de pragas. Para a cana-de-açúcar Bt não é diferente, uma vez que, tratando-se de uma cultura semi-perene, a tecnologia também enfrenta infestações constantes de população de *D. saccharalis*. Dessa forma, promover a mortalidade de indivíduos heterozigotos é uma das principais premissas a serem consideradas no manejo da resistência de insetos (TABASHNIK, VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009; GOULD 1998).

As folhas de cana-de-açúcar Bt comercial contendo Cry1Ac apresentam elevada toxicidade para *D. saccharalis*, potencializando sua eficácia em função da rustificação do material. Segundo Cheavegatti-Gianotto et al, (2019), a eficácia da variedade CTC9001Bt

(CTC 91087-6), foi avaliada e comprovada durante a safra 2017/18, em cinco regiões brasileiras, na qual o evento foi plantado a campo juntamente com seu controle parental convencional (não-bt). A sua eficácia foi avaliada através da quantificação da intensidade de infestação, após sucessivas infestações artificiais de ovos de *D. saccharalis* e a eficácia média do produto comercial foi superior a 99%, quando comparado aos controles não-bt.

Os insetos que se alimentaram em colmos da cana-de-açúcar Bt apresentaram elevada mortalidade entre o segundo e terceiro instares larvais, resultando em uma baixa sobrevivência populacional. Também foi observado um prolongamento do tempo desenvolvimento da fase larva-pupa da população Bt em relação a população não-bt.

Os efeitos da idade sobre a suscetibilidade das larvas à *B. thuringiensis* foram estudados em várias espécies de insetos e, na maioria dos casos, os primeiros instares foram mais suscetíveis do que os instares posteriores (HUANG et al, 1999). Em *D. saccharalis*, as lagartas penetram nos colmos da cana entre o segundo e terceiro instar, pela parte mais tenra da planta, na proximidade das gemas, provocando galerias no interior dos colmos (DINARDO-MIRANDA, 2008). Dessa maneira, durante o período compreendido entre o primeiro e terceiro instar larval, as lagartas são mais suscetíveis a fatores abióticos e bióticos, já que as lagartas estarão mais protegidas ao penetrar o interior do colmo (CRUZ, 2007), assim, em uma realidade de campo as lagartas sobreviventes nesta condição em paisagens Bt, estarão mais suscetíveis a esses fatores.

A alta mortalidade encontrada nos primeiros instares na cana Bt estão em consonância com os resultados reportados por Lynch et al (1999), que relataram que o controle do milho Bt (Cry1Ab) contra *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) ocorreu inicialmente pela inibição da taxa de desenvolvimento e ganho de peso dos estágios de vida iniciais das lagartas. De acordo com Dutton et al. (2005), também foi observado um prolongamento do período larval de *S. littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) quando alimentada em milho Bt. Liu et al. (2001), também observaram que cepas resistentes de *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) alimentadas com algodão expressando Cry1Ac apresentaram uma menor sobrevivência, desenvolvimento mais lento, e alcançaram menor peso e fecundidade de fêmeas.

Variações no período de duração do ciclo ovo-adulto entre populações provenientes de plantas Bt e não-bt são importantes fatores a serem considerados na eficácia do refúgio na diluição da resistência dos insetos. Liu e colaboradores (2001) observaram que, quando o pico populacional de adultos da lagarta rosa (*P. gossypiella*) suscetíveis oriundas do refúgio não corresponde ao pico de densidade de adultos resistentes provenientes de plantas Bt em áreas

de cultivo de algodão, a probabilidade de acasalamento entre insetos resistentes aumenta, devido à assincronia dos períodos de emergência das populações Bt e não-bt. Este efeito somente é reduzido dada a ocorrência de consecutivas sobreposições de gerações e aumento da distribuição de adultos de lagarta rosa suscetíveis e resistentes às plantas Bt.

Foi observado neste trabalho que a sobrevivência e o desenvolvimento de *D. saccharalis* foram afetados negativamente pelo consumo de cana-de-açúcar Bt, demonstrando consistência dos resultados encontrados na literatura. O prolongamento no tempo desenvolvimento de insetos durante a alimentação plantas Bt indica que em campo pode ocorrer um desencontro entre os adultos provenientes das áreas Bt e dos adultos provenientes de áreas de refúgio, levando a um impacto direto sobre a taxa de evolução da resistência, por promover o acasalamento preferencial de indivíduos resistentes, uma vez que, a emergência de adultos derivados de larvas que desenvolvem lentamente deve ocorrer a posteriori à emergência de adultos oriundos de imaturos que se desenvolvem em plantas não-bt (SIEGFRIED; ZOERB e SPENCER, 2001).

O efeito da assincronia na emergência de adultos das populações Bt e não-bt, entretanto pode ser diminuído quando o desenvolvimento mais lento de lagartas resistentes é intensificado pela mortalidade associada à hibernação ou outros fatores, como predação, por exemplo. Peck et al (1999) encontraram que a mortalidade diferencial no inverno parece anular os efeitos do acasalamento seletivo (PECK; GOULD e ELLNER, 1999).

Gryspeirt e Gregóire (2012) observaram que a assincronia de emergência de adultos em áreas Bt e não-bt também pode não ter impacto na evolução da resistência quando as plantas Bt não produzem uma alta concentração de toxinas. Neste caso o aumento da área de refúgio tem impacto semelhante na evolução da resistência independente da assincronia de emergência.

Em contrapartida, o alongamento no desenvolvimento do estágio de vida de insetos resistentes em plantas Bt para a estratégia de manejo da resistência é importante se for um efeito pleiotrópico, ou seja, se um único gene possui controle sobre as manifestações de várias características do alelo de resistência. Neste caso, um atraso no desenvolvimento resultaria em degenerações mais ou menos completas que poderiam diminuir a evolução da resistência em campo. Dessa forma, diferenças nos tempos de desenvolvimento de insetos suscetíveis em plantas não-bt e insetos resistentes em plantas Bt podem causar emergência assíncrona de mariposas, o que poderia favorecer o acasalamento não aleatório e, assim, reduzir os benefícios de uma estratégia de refúgio estruturada (LIU et al. 1999).

Dados biológicos em estudos de laboratório sugerem que a longevidade média de *D. saccharalis* é de aproximadamente 10 dias (PARRA et al, 1999). De acordo com Perez e Long (1964), as fêmeas de *D. saccharalis* têm maior atração e capacidade de acasalamento algumas horas após a emergência. Em um estudo foi observado que mais de 80% das fêmeas acasalam-se em menos de 48 horas após a emergência, e que com o aumento da idade, as taxas de cópula diminuem progressivamente (OSÓRIO-OSÓRIO e TOVAR, 2000). Assim, após a emergência, o acasalamento deve ocorrer num período inferior a 10 dias. Neste contexto, a ocorrência da assincronia na emergência de adultos dentro da população Bt devido a variações nas taxas de desenvolvimento, pode não favorecer o acasalamento seletivo entre mariposas resistentes de plantas Bt. Este desencontro entre machos e fêmeas oriundos de plantas Bt pode ser ainda mais intensificado ao se considerar que, como estimado pelas curvas de emergência obtidas neste estudo, os machos podem se movimentar na paisagem à procura de fêmeas disponíveis em outras áreas mais distantes, antes da emergência das fêmeas da área Bt em que se encontravam quando emergiram.

No campo, a ocorrência da assincronia do tempo de emergência o acasalamento seletivo pode ser afetado pela variação na expressão da toxina, clima e sobreposição entre as gerações. *Diatraea saccharalis* possui de três a quatro gerações sobrepostas por ano na região centro-sul dos Estados Unidos (CAPINERA, 2001; CASTRO; LEONARD e RILEY. 2004). Embora os picos de atividade adulta possam ser observados, mariposas adultas são comuns após a primeira geração e antes da hibernação. Já no Brasil, são observadas até cinco gerações, com sobreposição de gerações (TERAN, 1979; CARBOGNIN, 2019). Assim, o efeito do atraso no desenvolvimento nos padrões de acasalamento entre *D. saccharalis* suscetível e resistente a Bt pode ser reduzido em função da sobreposição de gerações.

Não foram observadas diferenças significativas no peso de pupas entre os tratamentos. No entanto, os insetos oriundos do tratamento Bt, apresentaram uma redução da capacidade reprodutiva (fecundidade), quando comparados aos indivíduos alimentados com plantas não-bt. Os resultados encontrados sugerem que o efeito da planta Bt, ficou restrito aos insetos que se alimentaram da planta hospedeira, uma vez que não foi observado efeito significativo na viabilidade de ovos na geração seguinte.

Para um melhor entendimento sobre os impactos no alongamento de desenvolvimento de *D. saccharalis* em cultivos de cana-de-açúcar Bt, estudos que buscam a avaliação dos custos adaptativos da alimentação de insetos em plantas Bt são de extrema importância, uma vez que estes custos podem afetar a presença do alelo da resistência nas populações. Esse é um dos primeiros estudos a abordar a problemática da resistência de insetos à cultura da cana-

de-açúcar transgênica no Brasil. Tais estudos devem ser refinados e ampliados a sistemas reais, visando a sustentabilidade deste importante método de controle de pragas na agricultura brasileira.

3.5. Conclusões

A mortalidade de *D. saccharalis* em folha de cana-de-açúcar Bt foi superior a cana-de-açúcar não-Bt, evidenciando o potencial de supressão populacional da tecnologia expressando Cry1Ac.

Houve atraso no tempo de desenvolvimento de imaturos que se alimentaram de colmo contendo Cry1Ac relativo àquelas conduzidas em colmo de cana-de-açúcar não-bt. Também houve a emergência assíncrona entre machos e fêmeas dentro deste tratamento, o que pode não favorecer o acasalamento aleatório de indivíduos homozigotos resistentes.

Referências

CAPINERA, J. L. Sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). Gainesville: University of Florida; **Institute of Food and Agricultural Sciences**, 2001.

CARBOGNIN, E. R. Modelagem e previsão de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) Universidade Estadual Paulista 2019.

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.5610573, 2010.

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

CASTRO, B.A., LEONARD, B.R., RILEY, T.J., Management of feeding damage and survival of southwestern corn borer and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) with *Bacillus thuringiensis* transgenic field corn. **Journal of Economic Entomology** 97, 2106–2116, 2004.

CRUZ, I. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. Sete Lagoas: Embrapa, Milho e Sorgo, (**Circular Técnica apresentada ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**) 12p, 2007.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. Cana de açúcar. Campinas: Instituto Agronômico, p. 349 – 404, 2008.

DUTTON, A.; ROMEIS, J. BIGLER, F. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.114, p.161–169, 2005.

ERLER, G. **Controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) através de isca tóxica**. Dissertation (Master in Entomology) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GRIMI, D. A., PARODY, RAMOS, M.L., MACHADO, M., OCAMPO, F., WILLSE, A., MARTINELLI, S., HEAD, G., 2018. Field-envolved resistance to Bt maize in sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Argentina. *Pest Manag. Sci.* 905-913, 2018.

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

GRYSPEIRT, A., J. C. GRÉGOIRE. Lengthening of insect development on Bt zone results in adult emergence asynchrony: does it influence the effectiveness of the high dose/refuge zone strategy? *Toxins* 4: 1323– 1342, 2012.

HUANG, F., L. L. BUSCHMAN, R. A. HIGGINS, AND F. N. HUANG. Susceptibility of different instars of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to diet containing *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology** 92:547–550, 1999.

KHAN, M. T.; KHAN, I. A. Sugarcane Biofuels: Status, Potential, and Prospects of the Sweet Crop to Fuel the World (Springer Publishers, Switzerland, 2019).

LAJOLO, F. M; YOKOYAMA, S. M.; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. Sugar derived from genetically modified sugarcane. **Food Science and Technology**, v. 2061, p. 1–7, 2020.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; PATIN, A. L.; BARTLETT, A.C. Development time and resistance to Bt crops. How was the Sdic gene fixed? **Nature** 400: 519, 1999.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; PATIN, A. L.; SIMS, M.A.; MEYER, S. K.; CARRIÈRE Y. Effects of Bt cotton and Cry1Ac toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 5, p. 1237–1242, 2001.

SIEGFRIED, B. D.; ZOERB, A. C.; SPENCER, T. Development of European corn borer larvae on Event 176 Bt corn: influence on survival and fitness. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.100, p.15-20, 2001

LYNCH, R.E.; WISEMAN, B.R.; PLAISTED, D.; WARNICK, D. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1A(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.92, p.246-252, 1999.

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

MORAL, R., HINDE.J., DEMÉTRIO, C. Half-normal and overdispersed models in r: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, Articles 81, 1-23, 2017.

OSORIO-OSORIO, R. Y J. CIBRAN-TOVAR. Comportamiento reproductivo del barrenador de la caña de azúcar *Diatraea considerata* Heinrich (Lepidoptera: Pyralidae). **Agrociencia**, 43: 595–602, 2000.

PARISI, C., TILLIE, P., AND RODRÍGUEZ-CEREZO, E. The global pipeline of GM crops out to 2020. **Nat. Biotechnol.** 34, 32–36, 2016.

PARRA, J.R.P., P. MILANO, F.L. CONSOLI, N.G. ZERIO; M.L. HADDAD. Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **An. Soc. Entomol. Brasil** 28: 49-57, 1999.

PECK, S. L., GOULD, F.; ELLNER, S. P. Spread of resistance in spatially extended regions of transgenic cotton: implications for management of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v92, n.1, p.1-16, 1999.

PEREZ, R.; LONG, W. H. Sex attractant and mating behavior in the sugarcane borer. **Journal of Economic Entomology**. Res. 57, 688–690, 1964.

SIEGFRIED, B. D.; ZOERB, A. C.; SPENCER, T. Development of European corn borer larvae on Event 176 Bt corn: influence on survival and fitness. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.100, p.15-20, 2001

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

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

TERAN, F. O. Dinâmica populacional de adultos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) em canaviais do estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 8 n. 1, 1979.

4. METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) EM COLMOS CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

Os danos provocados por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar se dá pela forma imatura, que provoca galerias ascendentes no interior do colmo da planta ao se alimentar, impactando significativamente a qualidade da matéria-prima e podendo provocar grandes perdas econômicas. Diversos estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de compreender os aspectos bioecológicos de *D. saccharalis*, contudo, a maioria dos estudos estão restritos a experimentações com dietas artificiais. Dessa maneira, o presente capítulo teve por objetivo apresentar metodologia desenvolvida para avaliação de biologia com *D. saccharalis* utilizando o substrato alimentar natural do inseto - o colmo de cana-de-açúcar, simulando a bioecologia da praga em condições de laboratório. Para isso foi proposto um aparato experimental contendo segmentos de colmo, selados com diferentes tipos de materiais vedação para conservação da umidade no interior dos colmos: cera de abelha, parafina e parafina gel. Para isto, lagartas neonatas de *D. saccharalis* foram distribuídas em copos plásticos de 150mL contendo os colmos de cana-de-açúcar com os diferentes tipos de vedação. Os aparatos foram mantidos em BOD a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60\pm 10\%$ e fotofase 14h. A sobrevivência e o desenvolvimento larval foram avaliados após 15 dias da infestação. Constatou-se que a vedação com parafina promoveu uma maior sobrevivência e desenvolvimento larval mais curto comparado aos colmos com outros tipos de vedação. A metodologia desenvolvida visa subsidiar futuros estudos de MRI (Manejo de Resistência de Insetos), bem como possibilitar bioensaio de toxicidade de plantas inseticidas de cana-de-açúcar em todas as suas estruturas fisiológicas sobre lagartas de *D. saccharalis*.

Palavras-chave: Broca-da-cana, Dieta natural, Viabilidade larval

ABSTRACT

METHODOLOGY FOR ASSESSING THE DEVELOPMENT OF IMMATURES OF *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IN SUGARCANE STALKS

Larvae of *Diatraea saccharalis* can damage the sugar cane due to the ascending galleries inside of the plant stem caused during the feeding, significantly impacting the quality of the raw material causing huge economic losses. Several studies have been carried out to understand the bioecological aspects of *D. saccharalis*, however, most studies are restricted to experiments using artificial diets. The present chapter aimed to present a methodology developed to facilitate the evaluation of biological cycle life of *D. saccharalis* using the insect's natural food substrate - the sugarcane stalk under laboratory conditions. For this purpose, an experimental apparatus was proposed containing stalk segments, sealed with different types of sealing materials and moisture conservation inside the stalk: beeswax, paraffin, and paraffin gel. For this, neonate larvae of *D. saccharalis* were distributed in 150mL plastic cups containing sugarcane stalks with different types of sealing. The apparatus was maintained in BOD at $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity $60 \pm 10\%$ and photophase 14h. Survival and larval development were assessed 15 days after stalk infestation. Paraffin sealing promoted greater survival and shorter larval development compared to stalks with other types of sealing. The developed methodology aimed to support future studies of MRI (Insect Resistance Management), as well as to enable bioassay of toxicity of sugarcane insecticidal plants in all their physiological structures on *D. saccharalis* larvae.

Keywords: Sugarcane borer, Natural diet, Larval viability

4.1. Introdução

A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), é conhecida por reduzir consideravelmente a produtividade da cana-de-açúcar em campo, impactando significativamente a qualidade da matéria-prima e provocando diversos danos econômicos ao setor sucroalcooleiro (DINARDO-MIRANDA e FRACASSO, 2013). Os danos podem ser classificados como diretos, quando diz respeito às aberturas de galerias no interior dos colmos, ocasionando perdas de peso e provocando a morte das gemas, com consequentes falhas na germinação; ou danos indiretos, quando provocado por contaminação secundária por fungos oportunistas como *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, que causam a inversão da sacarose e afetam a qualidade da matéria-prima (PARRA; BOTELHO e PINTO; 2010).

As fêmeas de *D. saccharalis* depositam seus ovos na face inferior das folhas de cana-de-açúcar, de maneira imbricada com sobreposição parcial. O período embrionário leva em torno de 12 dias e logo após a eclosão, as lagartas se alimentam do parênquima foliar raspando a folha da planta até chegar ao terceiro instar de desenvolvimento larval (PINTO *et al.*, 2009). Posteriormente, as lagartas perfuram o colmo e dão início a formação de galerias, no sentido ascendente na região do palmito da planta, podendo provocar galerias circulares, no sentido transversal o que torna o colmo enfraquecido, aumentando os riscos de quebra e acamamento da cultura (BOTELHO e MACEDO, 2002).

O desenvolvimento de dietas artificiais para criação de insetos permitiu um grande avanço para os programas de Manejo de Pragas, pois viabilizou a realização de diversas pesquisas (COHEN, 2015). Para *D. saccharalis* a primeira dieta artificial foi desenvolvida por Hensley e Hammond (1968), utilizando um meio a base de germe de trigo e caseína, considerada nutricionalmente completa. Eles observaram que o desenvolvimento larval da espécie até a fase de pupa foi compatível em tamanho e vigor, às obtidas em campo, sobre cana-de-açúcar ou milho.

Diversos trabalhos foram realizados para compreender os aspectos bioecológicos de *D. saccharalis* (MELO e PARRA, 1988; COSTA *et al.*, 2010; BOIÇA JUNIOR *et al.* 2011), contudo, a maioria dos estudos são restritos a experimentações com dietas artificiais.

A recente aprovação comercial da cana-de-açúcar transgênica trouxe a necessidade de compreender a dinâmica de desenvolvimento de *D. saccharalis* em todos os tecidos que expressam a proteína inseticida. Dessa forma, considerando a dinâmica de ataque da praga, na qual inicialmente consome o tecido foliar, a bainha e posteriormente o colmo, viu-se a

necessidade de desenvolver um aparato experimental que permitisse quantificar parâmetros biológicos de *D. saccharalis*, tais como o tempo de desenvolvimento, número de instares, bem como avaliar a eficácia da tecnologia em condições de consumo de colmo de cana-de-açúcar. Para isso, se faz necessário promover condições experimentais adequadas para promover maior durabilidade do colmo, de maneira que o meio fornecido ao inseto seja ideal para o desenvolvimento completo dos insetos.

A quantidade e a qualidade do alimento ingerido pelas lagartas têm efeitos diretos sobre a taxa de crescimento, o período de desenvolvimento, sobrevivência, fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição dos adultos (PARRA, 1991). Da mesma forma, o tipo de recipiente utilizado em criações é de suma importância para que haja um bom desenvolvimento do inseto, uma vez que caso ocorra perda excessiva de água da dieta, ou mesmo que se apresente alguma característica que dificulte a alimentação, impactará diretamente em seu desenvolvimento (PARRA, 1996).

Dessa maneira, o presente capítulo teve por objetivo apresentar metodologia desenvolvida para avaliação de biologia com *D. saccharalis* utilizando o substrato natural do inseto - o colmo de cana-de-açúcar, simulando a bioecologia da praga em condições de laboratório, a metodologia desenvolvida teve como objetivo subsidiar futuros estudos de MRI (Manejo de Resistência de Insetos), bem como possibilitar bioensaios de toxicidade de plantas inseticidas de cana-de-açúcar em todas as suas estruturas fisiológicas sobre lagartas de *D. saccharalis*.

4.2. Material e métodos

Para os testes de eficácia do uso de dieta natural na criação de *D. saccharalis* foi utilizada a variedade de cana-de-açúcar não-bt CTC9001. Os colmos foram seccionados em segmentos de cinco centímetros de altura contendo a gema apical e aproximadamente 1 cm de base da bainha, aos 200 dias após o plantio. Para evitar o ressecamento dos segmentos e aumentar sua durabilidade, evitando trocas frequentes do material vegetal, foram avaliados três diferentes tipos de vedação (tratamentos): (i) Parafina, (ii) Cera de abelha e (ii) Parafina em gel.

Posteriormente à vedação, os colmos foram acondicionados em copos plásticos de 150 mL e em seguida, foram infestados com 10 lagartas neonatas de *D. saccharalis*, colocadas livremente no centro do segmento, próximo a gema. Os copos foram mantidos em câmara climatizada (temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase 14h) (Figura 17).

A mortalidade larval e a variação dos instares larvais foram avaliados após 15 dias da infestação dos colmos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições (10 lagartas/repetição).



Figura 17. Unidades experimentais com seções de colmo de cinco centímetros de cana-de-açúcar com os diferentes tipos de vedação.

4.2.1. Análise estatística

O efeito dos tratamentos (Parafina, Cera de abelha e Parafina em gel) sobre a sobrevivência das lagartas após 15 dias foi analisado através de regressão logística, com erros corrigidos para superdispersão. A avaliação da qualidade do ajuste obtido foi avaliada por meio do gráfico “half-normal-plot” com envelopes simulados ao nível de 95% (MORAL et al., 2017). A variação da proporção dos instares larvais nos diferentes tratamentos ao final de 15 dias foi avaliada através do teste exato de Fisher. As análises foram realizadas no software estatístico R Core Team (2019) v. 3.6.1.

4.3. Resultados

Foi observado que a maior parte das lagartas, em todos os tratamentos penetraram nos colmos pela gema apical contida no segmento. O tipo de material utilizado na vedação dos colmos teve efeito significativo sobre a sobrevivência das lagartas ($Dev_{2,29} = -57,186$; $p < 0.05$). A sobrevivência das lagartas em colmos vedados com parafina gel foi a mais baixa, diferindo significativamente dos demais tratamentos. A sobrevivência das lagartas nos

tratamentos com vedação de parafina em gel, cera de abelha e parafina foram respectivamente 22%, 51% e 74% (Figura 18).

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre a vedação de cera de abelha e parafina, a cera de abelha foi o material que apresentou maior quantidade de fissuras e quebras em torno do segmento durante a condução do experimento (Figura 19). Essa condição permitiu um maior ressecamento dos colmos entre todos os tratamentos, em função da perda de umidade.

Após 15 dias foram observadas variações na quantidade de lagartas nos diferentes instares larvais. A proporção de diferentes estágios larvais nos tratamentos diferiu significativamente entre si (Figura 20). Ao final da experimentação, nos tratamentos com cera de abelha e parafina foram observadas lagartas em quarto instar, ou seja, o tempo de desenvolvimento das lagartas se deu mais rapidamente quando comparadas ao tratamento com parafina em gel (Figura 20).

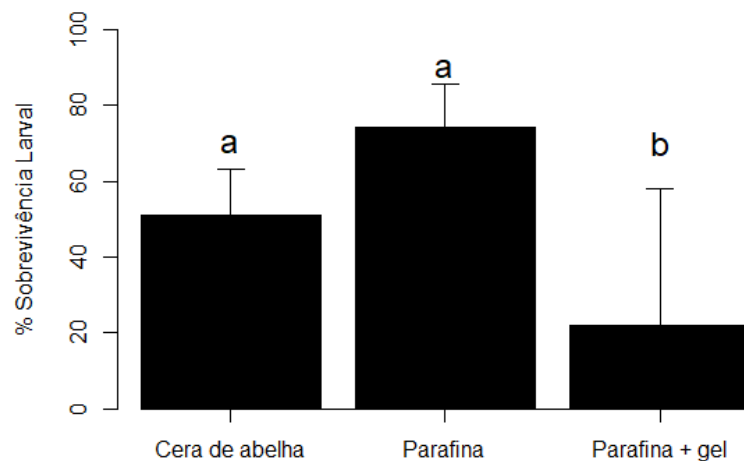


Figura 18. Sobrevivência larval de *Diatraea saccharalis* alimentadas com colmo de cana-de-açúcar com diferentes tipos de vedação, mantidos a 27°C por 15 dias. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tipos de vedação de colmos de cana-de-açúcar ($P < 0.05$)

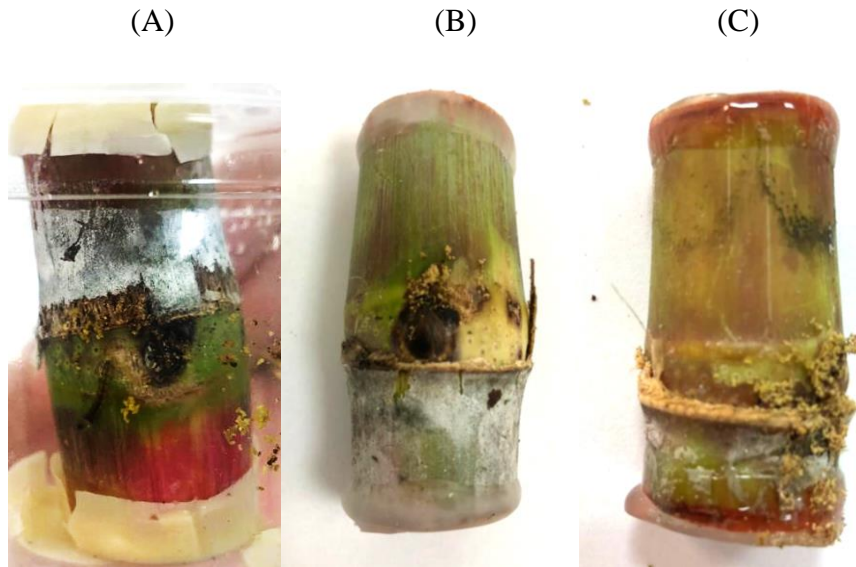


Figura 19. Colmos vedados com os diferentes materiais (tratamentos): (A) Cera de abelha; (B) Parafina (C) Parafina gel

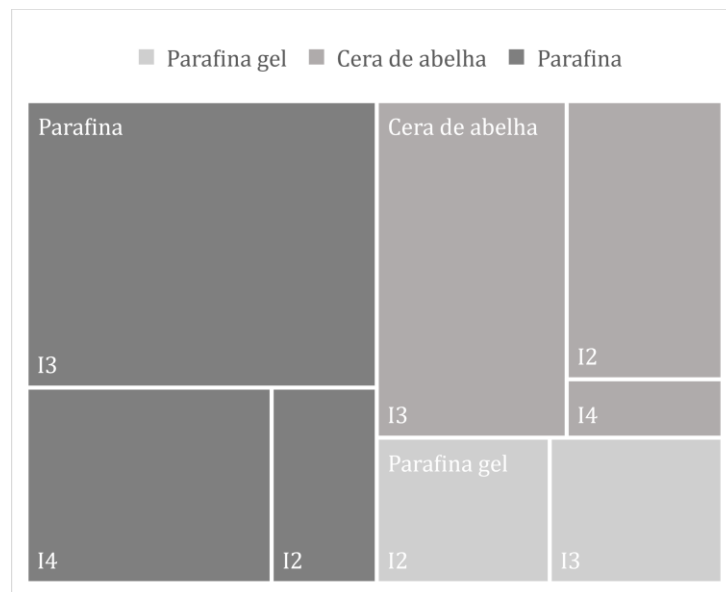


Figura 20. Proporção de lagartas no segundo, terceiro e quarto instares (I2, I3 e I4, respectivamente) após 15 dias em colmos de cana-de-açúcar vedados com cera de abelha, parafina e parafina em gel.

4.4. Discussão

O melhor método de vedação dos colmos de cana-de-açúcar se deu pela utilização da parafina, uma vez que o número de larvas sobreviventes foi numericamente superior aos tratamentos de cera de abelha e parafina, além disso, o tratamento também propiciou tempo de desenvolvimento das lagartas mais curto após a avaliação ao final de 15 dias.

Em um estudo desenvolvido por Wongsiri e Randof (1962), foi comparado o desenvolvimento de *D. saccharalis* em dieta artificial à base de germe-de-trigo e em colmos de sorgo. Neste estudo, não foi observado diferença no número de instares nos dois substratos, com a duração da fase larval menor em meio natural. Contudo, foi observado que o período pupal foi maior em dieta artificial, com ciclo total de 42,8 e 40 dias respectivamente, nos meios artificial e natural.

Comparativamente, assim como visualizado neste estudo no qual, lagartas em 4º instar foram encontradas no tratamento contendo parafina, Parra e Melo (1988) também observaram em um estudo de biologia de *D. saccharalis* em dieta artificial em 25°C UR:70% ± 10%, lagartas em 4º instar a partir do décimo terceiro dia após a transferência de neonatas em dieta.

Embora a sobrevivência das lagartas nos tratamentos com parafina e cera de abelha não tenham apresentado diferença significativo, o menor valor numérico de sobrevivência encontrado nos colmos vedados com cera de abelha pode ter sido provocado pela ocorrência de rápida oxidação dos colmos, em virtude das rachaduras (caracterizada pelo seu escurecimento), o que pode ter influenciado a fago-estimulação de lagartas. As rachaduras no tratamento com cera de abelha podem ter levado a perdas de umidade no interior do colmo e assim explicar o ligeiro atraso no desenvolvimento das lagartas no tratamento em comparação com o tratamento com parafina (na figura 21 observe a maior quantidade de lagartas em segundo e terceiro instares nos colmos com vedação de cera de abelha comparados aos colmos com vedação por parafina). Estudos mostram que na elaboração de uma dieta artificial, a água é de fundamental importância e deve ser incorporada à dieta para atender às necessidades dos insetos, pois a maioria dos insetos terrestres contém cerca de 70% de água no corpo (COHEN, 2015). O mesmo deve ser aplicado às dietas naturais, nas quais as perdas nos níveis de umidade devem ser evitadas.

Trabalhos que utilizam dietas naturais com o uso de colmos para alimentar lagartas são escassos na literatura. O uso de material natural na alimentação tem se dado pela adição de colmo seco triturado em dieta artificial. Boiça Junior et al. (2011) encontraram neste tipo de dieta duração do período larval de 28,8 dias.

De acordo com Parra (2012), uma dieta artificial é considerada ideal quando são atendidas as exigências nutricionais dos insetos, ou seja, quando a dieta propicia um ótimo desenvolvimento na fase pré-imaginal com sobrevivência superior a 75% e com a produção de adultos com elevada capacidade reprodutiva. Nestas condições, o uso de dietas artificiais na criação de insetos em tem possibilitado avanços nos programas de manejo de pragas,

permitindo a realização de diversos estudos sobre as exigências nutricionais qualitativas (GARCIA et al., 2006).

Embora as dietas artificiais contornem o problema da variação complexa em muitos compostos vegetais de função desconhecida, as conclusões ecológicas são limitadas por causa dessa simplificação. Diferenças sutis na textura, desequilíbrios de nutrientes, fagoestimulantes e dissuasores podem influenciar o desempenho (SCRIBER e SLANSKY JR., 1981).

Nesse sentido, considerando que os efeitos da alimentação de *D. saccharalis* em plantas Bt necessitam ser completamente compreendidos, analisar a resposta biológica do inseto em função do hospedeiro é fundamental para a caracterização completa da tecnologia. A metodologia proposta permite a realização de bioensaios para avaliação da toxicidade de cana-de-açúcar Bt em todo o ciclo de desenvolvimento da cultura.

4.5. Conclusões

A metodologia proposta permitiu o desenvolvimento larval de *D. saccharalis*, com lagartas em quarto instar em 15 dias após a infestação. A metodologia proposta permite o desenvolvimento adequado de *D. saccharalis*, facilitando a utilização de colmos de cana-de-açúcar para estudos de biologia. Essa metodologia subsidia futuros estudos de MRI em cana-de-açúcar Bt.

Referências

BOIÇA JUNIOR, A. L.; LEONELO, A. F.; JESUS, F. G. Dietas artificiais incorporadas ou não a colmos triturados de variedades de cana-de-açúcar na biologia de *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 39-48, 2011

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole cap. 25, p. 409-425, 2002.

COHEN, A. C. Insect diets: science and technology. Boca Raton: **CRC Press**, p. 1-164., 2015.

COSTA, D. M. da; FRANCEZ, A. C. C.; RIGOLINSÁ, O. Biologia da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (Lepidoptera: Crambidae) em dieta artificial. **Ciência et Praxis**, Belo Horizonte, v. 3, n. 5, p. 13-16, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V. Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. **Sci Agric** 70:305–310, 2013.

GARCIA, M. S.; BUSATO, G. R.; BERNARDI, O.; ZOTTI, M. J.; NORMBERG, S. D.; ZART, M.; NUNES, A. M. Efeito da posição do recipiente de criação no consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 173-177, 2006.

MELO, A. B. P de.; PARRA, J. R. P. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações anuais de broca da cana-de-açúcar em quatro localidades canavieiras de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 7, p. 691-696, 1988.

MORAL, R., HINDE.J., DEMÉTRIO, C. Half-normal and overdispersed models in r: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, Articles 81, 1-23, 2017.

PARRA J.R.P.; BOTELHO P.S.M.; PINTO A.S. Biological control of pests as a key component for sustainable sugarcane production. In: Cortez LAB (ed) Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability. **Blucher**, São Paulo, pp 441–45, 2010.

PARRA, J. R. P. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. In: PANIZZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) Insect bioecology and nutrition for integrated pest management. **Boca Ratón: CRC Press**. p. 51- 92, 2012.

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZZI, A. R.; PARAA, J. R. P.; (Ed.) Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo: **Manole**, cap. 2, p.9-65, 1991.

PINTO, A. S.; BOTELHO, P.S.M.; OLIVEIRA, H.N. Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar. Piracicaba: CP2, 160p. 2009.

SCRIBER, J.M.; SLANSKY JR., F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.26, p.183-211, 1981.

WONGSIRI, T.; RANDOLPH, N. M. A comparison of the biology of the sugarcane borer on artificial and natural diets. **Journal of Economic Entomology**, v.55, n.4, p.472-473, 1962.