Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho expressando a proteína inseticida Vip3Aa20 através da potencialização do custo adaptativo associado à resistência

Bruna Cortes Queiroz

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

Piracicaba
2020

Bruna Cortes Queiroz
Engenheira Agrônoma

Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho expressando a proteína inseticida Vip3Aa20 através da potencialização do custo adaptativo associado à resistência

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO TAKAO YAMAMOTO**

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

Piracicaba
2020

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

Queiroz, Bruna Cortes

Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho expressando a proteína inseticida Vip3Aa20 através da potencialização do custo adaptativo associado à resistência / Bruna Cortes Queiroz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

78 p.

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

1. *Spodoptera frugiperda* 2. Manejo da resistência de insetos 3. Vip3Aa20 4. Custo adaptativo I. Título

DEDICATÓRIA

À minha filha Helena, a razão do meu viver. À minha filha Luiza, que em poucos dias conhecerei seu rosto e descobrirei mais uma razão para viver. À minha amada sogra, Vilma, que tão de repente partiu...seu legado de amor, compaixão, alegria e serenidade nunca será esquecido. Ao meu esposo Aécio, por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Concluir uma tarefa importante como o mestrado me exige expressar gratidão àqueles que compartilharam comigo esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, Leonardo e Zélia, e ao meu irmão, Maurício, agradeço pela presença constante, mesmo estando fisicamente tão distantes. Sobretudo pelo carinho e pela preocupação. São os mais verdadeiros exemplos de amor incondicional.

Ao Aécio, meu esposo, pela cumplicidade e companheirismo, que mesmo em trechos tão difícieis da caminhada da vida consegue ter forças para segurar firme em minha mão, com amor e paciência.

À Helena, minha filha, que chegou há pouco em nossas vidas, agradeço por me ensinar a enxergar o verdadeiro sentido da vida. Helena, agora, aprendeu a falar "mamãe" e repete o chamado incansavelmente ao longo do dia, o que mantém meu coração sempre aquecido com este amor incondicional e peculiar da maternidade.

À Luiza, minha outra filha, que está a caminho e muito em breve chegará para, ao lado da Helena, encher a casa de amor e alegria.

À minha sogra, Vilma, que recentemente nos deixou, e ao meu sogro, Sílvio, pelo suporte e pelo carinho que sempre nos dedicaram.

Agradeço à Serena, amiga-irmã que trabalhou duro ao meu lado e tornou esta dissertação possível em meio a tantas dificuldades que atravessei.

Agradeço à Syngenta Proteção de Cultivos por me proporcionar tamanho crescimento pessoal e profissional, pela permissão e suporte na execução deste projeto.

Ao colega Julio Fatoretto, exemplo de amor à pesquisa, que muito me incentivou a conduzir este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Takao Yamamoto, especialmente pela prontidão, pela paciência e pela sabedoria na condução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade ímpar proporcionada.

Por fim, à Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), que, há alguns anos, me deu a oportunidade de me graduar em Engenharia Agronômica, e agora me permite subir mais um degrau em minha formação acadêmica.

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT 7
LISTA DE FIGURAS 8
LISTA DE TABELAS 11
1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1. Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e milho Bt 17
2.2. Resistência de *S. frugiperda* a inseticidas 19
2.3. Manejo da resistência de *S. frugiperda* a proteínas *Bt* 20
2.4. Custo adaptativo associado a resistência de *S. frugiperda* em milho Bt 23
3. MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1. Coleta de *S. frugiperda* e manutenção em laboratório 25
3.2. Estabelecimento de isofamílias para F2 *Screen* 26
3.3. *Screening* da geração F2 com discos foliares de milho Agrisure® Viptera™ 27
3.4. Manutenção de linhagens suscetível e resistente à toxina Vip3Aa20 28
3.5. Demonstração de resistência fenotípica 29
3.6. Estudo de história de vida de *S. frugiperda* para investigação de custo adaptativo associado à resistência à Vip3Aa20 31
3.7. Efeito de ciantraniliprole em TS na magnitude e/ou dominância de custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 32
4. RESULTADOS 39
4.1. Frequência alélica da resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa20 39
4.2. Demonstração da resistência fenotípica de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 39
4.3. Investigação de custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 45
4.4. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da oferta de tecido foliar fresco extraído de plantas com 15 DAE em laboratório- Metodologia I 47
4.5. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da infestação de plantas com idade de 15 DAE em casa de vegetação- Metodologia II 55
4.6. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da oferta de tecido foliar fresco extraído de plantas com 21 DAE em laboratório- Metodologia III 56
5. DISCUSSÃO 65
6. CONCLUSÃO 69
REFERÊNCIAS 71

RESUMO

Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho expressando a proteína inseticida Vip3Aa20 através da potencialização do custo adaptativo associado à resistência

O milho geneticamente modificado, com expressão de toxinas inseticidas derivadas de genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), atualmente ocupa em quase sua totalidade a área destinada ao cultivo do cereal no Brasil. O principal alvo desta ferramenta é a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), praga de maior relevância para a cultura do milho no país. A durabilidade das tecnologias Bt é grandemente ameaçada pela evolução da resistência desta praga-alvo devido a uma combinação de fatores, tais como: maciça adoção de milho Bt, características bioecológicas da espécie *S. frugiperda*, pressão de seleção constante sobre a praga, plantio insuficiente de áreas refúgio, carência de estratégias viáveis e eficazes dentro do Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Casos de redução crítica da eficácia de algumas toxinas Bt do grupo Cry1 no controle de *S. frugiperda* foram documentados no Brasil. A toxina inseticida Vip3Aa20 é a mais recente tecnologia comercialmente disponível no âmbito dos cultivos Bt. A longevidade da eficácia de Vip3Aa20 no controle de *S. frugiperda* pode ser ampliada com a implantação da estratégia de MRI conhecida como alta dose/refúgio. Áreas refúgio são fonte de indivíduos de genótipo suscetível (*ss*); entretanto, a existência de indivíduos de genótipo heterozigoto (*rs*), carreadores de alelos da resistência, deve ser levada em conta na estruturação de um refúgio eficaz. A manutenção da suscetibilidade da população da praga-alvo é positivamente influenciada quando o valor adaptativo de indivíduos carreadores de alelos *r* é inferior ao valor adaptativo dos indivíduos suscetíveis. A ocorrência e intensidade do custo adaptativo associado à resistência é uma das determinantes na evolução da resistência. Programar áreas refúgio visando maximizar o custo adaptativo dos carreadores de alelos *r* tem grande valor no contexto do MRI. A possibilidade de uso do inseticida químico Fortenza 600® no tratamento de sementes (TS) de milho não-Bt utilizado para formar áreas refúgio pode ser uma ferramenta eficaz para ampliar a magnitude e/ou a dominância do custo adaptativo. Para tal investigação, amostras de *S. frugiperda* foram coletadas em quatro regiões produtoras de milho no Brasil. A técnica F2 *Screen* foi utilizada para estimar a frequência de alelos da resistência à Vip3Aa20 dos locais amostrados e selecionar, em laboratório, uma linhagem resistente. A linhagem selecionada, LRV-MT Vip-R, teve sua resistência fenotípica demonstrada em bioensaio, com sobrevivência larval e viabilidade de ovos sem diferenças significativas ao se alimentar de tecido fresco de milho não-Bt e de milho Viptera™. Os estudos indicaram possível custo adaptativo na sobrevivência larval e viabilidade de adultos na linhagem LRV-MT Vip-R. A linhagem heterozigótica LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) apresentou valor adaptativo semelhante à linhagem SUS. A linhagem heterozigótica LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2), em diversos parâmetros biológicos, apresentou tendência de maior valor adaptativo em relação às outras linhagens estudadas. A oferta de tecido foliar de milho não-Bt com idade de 21 DAE, oriundo de sementes tratadas com Fortenza 600®, causou redução na viabilidade de adultos da linhagem suscetível e linhagens heterozigóticas; a viabilidade de adultos da linhagem LRV-MT Vip-R não foi afetada. Os parâmetros de fecundidade total fêmea^{-1} e longevidade de fêmeas das quatro linhagens não diferiram ao se alimentarem de tecido tratado em comparação ao tecido sem tratamento. A linhagem suscetível apresentou considerável número de adultos com alterações morfológicas visuais quando alimentada com tecido tratado. A utilização de Fortenza 600® em TS de milho para implantação de áreas refúgio não se mostrou eficaz em potencializar o custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*, Manejo da resistência de insetos, Vip3Aa20, Custo adaptativo

ABSTRACT

Management of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) resistance in maize expressing Vip3Aa20 insecticidal protein through increasing fitness cost associated with resistance

Genetically modified maize expressing insecticidal toxins originated from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) entomopathogenic bacteria genes, currently occupies almost entirely the area intended to the cereal growth in Brazil. The main target of this tool is *Spodopterea frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), most relevant pest for maize production in the country. The Bt technologies durability is largely threatened by the target-pest resistance evolution due to a combination of factors such as the massive adoption of Bt maize, bio-ecological characteristics of *S. frugiperda,* constant selection pressure over the pest, insufficient refuge areas, the lack of practicable and efficient strategies in the Insect Resistance Management (IRM). Critical reduction in effectiveness of some Bt toxins from Cry1 group in the control of *S. frugiperda* was documented in Brazil. Vip3Aa20 insecticidal toxin is the latest technology commercially available in the contest of Bt plants. The longevity of Vip3Aa20 efficiency in *S. frugiperda* control can be increased by the implementation of the strategy of MIR known as high- dose/refuge. Refuge areas are source of susceptible phenotype individuals (*ss*) to the Bt toxins; however, the existence of heterozygous phenotype individuals (*rs)*, resistance allele carriers, must be considered when structuring an effective refuge. The maintenance of target-pest population susceptibility is positively influenced when the fitness value of *r* allele carriers is lower than the fitness value of the susceptible individuals. The occurrence and intensity of fitness cost associated with resistance are one of the resistance evolution determinants. Planning refuge areas in order to maximize fitness cost of *r* alleles carriers has great value in the IRM context. The use of chemical insecticide Fortenza 600® in seed treatment of non-*Bt* maize*,* used to grow refuge areas, can be a helpful tool to extend the magnitude and/or dominance of fitness cost. *S. frugiperda* was sampled in four maize growing regions in Brazil. F2 screen technique was used to estimate frequency of resistance alleles to Vip3Aa20 in the sampled areas and to select, in laboratory, a resistant strain. The phenotypic resistance of LRV-MT Vip-R was demonstrated in a bioassay, with no significant difference of larval survival and eggs viability when fed with non-Bt maize and Viptera™ maize fresh leave tissue. The tests showed the possibility of fitness cost presence in LRV-MT Vip-R larval survival and adult viability. LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) showed similar fitness value to the suscetible strain. For several biological parameters, LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) presented higher adaptative value comparing to the other investigated strains. Adult viability of SUS and heterozigous strains was decreased when larvae were fed with Non-Bt maize leaf tissue aged 21 DAE, with Fortenza 600FS®; the adult viability of the resistance strain did not show significant difference. Total fertility female^{-1} and female longevity of the four strains did not differ when fed with treated fresh tissue comparing to non-treated. The suscetible strain showed high number of adults with morphological deformations when the strain was fed with treated fresh foliar tissue. The adoption of Fortenza 600FS® in maize seed treatment for the implamentation of refuge is not an efficiente tool to increase fitness cost associated with *S. frugiperda* resistance to Vip3Aa20.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, Insect resistance management, Vip3Aa20, Fitness cost

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Locais de amostragem de *S. frugiperda* coletadas na 1ª safra e 2ª safra de 2017 para seleção de linhagem resistente à Vip3Aa20 25

Figura 2. Etapas do estabelecimento e condução de isofamílias propostas pelo método F2 Screen (adaptado de Andow e Alstad, 1998)..... 27

Figura 3. Esquema de cruzamentos recíprocos entre linhagem resistente LRV-MT Vip-R e linhagem suscetível de referência para obtenção de linhagens heterozigóticas LRV-MT Vip-R♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT Vip-R♂ x SUS♀ (RS-2)..... 30

Figura 4. Estudo em casa de vegetação para investigação do efeito de Fortenza 600FS® no custo adaptativo de *S. frugiperda* resistente à Vip3Aa20- Metodologia II. A- Planta de milho com idade de 15 DAE, em estágio fenológico V3. B- Plantas de milho após infestação 36

Figura 5. Sobrevivência (%) larval aos 7 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes..... 40

Figura 6. Sobrevivência (%) larval aos 14 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade 40

Figura 7. Viabilidade de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade..... 41

Figura 8. Viabilidade de pupas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade..... 41

Figura 9. Viabilidade de adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade..... 41

Figura 10. Duração da fase larval das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade..... 42

Figura 11. Duração da fase de pupa das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade 42

Figura 12. Duração do período ovo-adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade 42

Figura 13. Fecundidade diária fêmea-1 das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade 43

Figura 14. Fecundidade total fêmea-1 das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade 43

Figura 15. Período de oviposição das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade..... 44

Figura 16. Longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade 44

Figura 17. Longevidade de machos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade 44

Figura 18. Duração das fases de larva, pupa, período ovo-adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. 46

Figura 19. Peso de pupas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 46

Figura 20. Fecundidade diária. fêmea^{-1} e fecundidade total fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. 47

Figura 21. Período de oviposição e longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 47

Figura 22. Sobrevivência (%) larval aos 7 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) não diferem significativamente 48

Figura 23. Sobrevivência (%) larval aos 14 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) não diferem significativamente 48

Figura 24. Viabilidade (%) de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma não diferem significativamente 49

Figura 25. Viabilidade (%) de pupas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 50

Figura 26. Viabilidade (%) de adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 50

Figura 27. Duração da fase larval das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 51

Figura 28. Duração da fase de pupa das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 51

Figura 29. Duração do período ovo-adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 52

Figura 30. Fecundidade diária fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 54

Figura 31. Fecundidade total fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 54

Figura 32. Período de oviposição das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra bçao diferem significativamente 55

Figura 33. Longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente 55

Figura 34. Sobrevivência (%) larval aos 6 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 15 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas 56

Figura 35. Sobrevivência (%) larval aos 7 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 57

Figura 36. Sobrevivência (%) larval aos 14 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 57

Figura 37. Viabilidade (%) de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 59

Figura 38. Viabilidade (%) de pupas das linhagens de LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 59

Figura 39. Viabilidade (%) de adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 59

Figura 40. Duração da fase larval das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes.....60

Figura 41. Duração da fase de pupa das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes.....61

Figura 42. Duração do período ovo- adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 61

Figura 43. Fecundidade diária fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratada. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 62

Figura 44. Fecundidade total fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 62

Figura 45. Período de oviposição das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 63

Figura 46. Longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 63

Figura 47. Longevidade de machos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes 64

Figura 48. Adultos deformados (%) das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas.....64

Figura 49. Adultos de *S. frugiperda* com deformações morfológicas, provenientes de tratamentos com oferta de tecido foliar fresco extraído de milho não-Bt oriundo de sementes tratadas com Fortenza 600FS® 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de *S. frugiperda* coletadas para seleção de linhagem resistente à Vip3Aa20 25

Tabela 2. Número de isofamílias submetidas ao screening da geração F2 em folhas de milho expressando a toxina Vip3Aa20 e duração do bioensaio 27

Tabela 3. Descrição de tratamentos do estudo de demonstração fenotípica da resistência de linhagem *S. frugiperda* oriunda de campo e selecionada em laboratório para resistência à Vip3Aa20. 30

Tabela 4. Descrição de tratamentos da investigação do efeito de Fortenza 600FS® em TS de milho não-Bt na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20- Metodologia I. 33

Tabela 5. Produto fitossanitário registrado para tratamento de sementes na cultura do milho para controle de larvas de *S. frugiperda*. Informações contidas na bula do titular do registro Syngenta Proteção de Cultivos LTDA. 34

Tabela 6. Descrição de tratamentos da investigação do impacto do inseticida químico ciantraniliprole em TS de milho não-Bt na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20- Metodologia II. 35

Tabela 7. Descrição de tratamentos do estudo investigação do impacto do inseticida químico ciantraniliprole em TS de milho não-Bt na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20- Metodologia III 37

Tabela 8. Resultados do F2 *Screen* e estimativa da frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa20 em quatro regiões distintas do Brasil. 39

Tabela 9. Sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, viabilidade de ovos, pupas e adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ X SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ X SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt.....45

1. INTRODUÇÃO

As plantas geneticamente modificadas capazes de sintetizar toxinas inseticidas, dentro do contexto de manejo integrado de pragas (MIP), se enquadram no pilar de resistência de plantas a insetos e são componentes-chave do rol de técnicas de manejo de insetos-praga preconizadas pelos programas de MIP. Estas plantas, por meio de modernas técnicas de engenharia genética, expressam um ou mais genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) e, consequentemente, são capazes de sintetizar proteínas que apresentam ação inseticida em determinados insetos herbívoros.

A utilização de plantas transgênicas com expressão de proteínas inseticidas tem sido amplamente difundida, tornando-se uma das principais estratégias para o controle da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016), praga de maior relevância no cultivo de milho na América do Sul. A longevidade das tecnologias de milho Bt é grandemente ameaçada pela evolução da resistência nas populações de insetos-praga alvos destas tecnologias (TABASHNIK et al., 2004; HUANG et al., 2011; BERNARDI et al., 2016). A espécie *S. frugiperda* possui alto risco de evolução da resistência devido fatores bioecológicos próprios e do atual sistema de cultivos no Brasil (BERNARDI et al., 2015a; BERNARDI et al., 2015b; FATORETTO et al., 2017).

Desde o ano de 1996 observa-se uma crescente adoção das plantas Bt em todo o mundo (JAMES, 2011); entretanto, somente em 2005 a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou, no Brasil, a liberação comercial do primeiro evento com controle de insetos-praga, sendo a planta de algodão expressando a toxina Cry1Ac de B. thuringiensis (Bollgard TM). Inicialmente foram desenvolvidos e liberados para comercialização apenas eventos que expressavam uma única toxina Bt; a partir de 2009 foram liberadas para cultivo comercial no Brasil plantas de milho Bt com mais de uma proteína expressa, os chamados eventos piramidados (CTNBio, 2009; CTNBio, 2010).

A generalização da adoção de milho Bt presenciada no Brasil nos últimos anos possibilitou que a agricultura brasileira atingisse níveis acima de 80% de área plantada com tal tecnologia (CÉLERES, 2017). Este contexto, em conjunto com a pequena implantação de áreas de refúgio, trouxeram consigo o ônus da rápida evolução da resistência de *S. frugiperda* a algumas toxinas em condições de campo, retratada mais recentemente pela queda acentuada na eficácia de Cry1F (FARIAS et al., 2014) e Cry1Ab (OMOTO et al., 2016).

O manejo eficaz da lagarta-do-cartucho na cultura do milho tem sido alvo constante no desenvolvimento de tecnologias. No cenário brasileiro de perda de eficácia das proteínas do grupo Cry1, alternativamente inicia-se a utilização de milho Bt expressando a proteína inseticida vegetativa (Vip), com alta eficácia no controle de *S. frugiperda* (GOUFFON et al., 2011).

A frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa20, expressa em híbridos Agrisure® Viptera™ e Viptera 3™, foi inicialmente estimada nos anos de 2013 e 2014, identificando baixos valores nas linhagens de diversas regiões geográficas representativas na produção de milho no Brasil; entretanto, o estudo alertou para o possível risco de evolução da resistência à toxina (BERNARDI et al., 2015b). A submissão das populações à ininterrupta pressão de seleção ao longo das safras (HARGROVE, 1999; BATES et al., 2005) pressupõe que sejam implementadas estratégias proativas e eficazes norteando o manejo da resistência de insetos (MRI), garantindo que a toxina inseticida Vip3A20 tenha sustentabilidade como ferramenta eficaz na agricultura brasileira.

Até a definição de estratégias de MRI percorre-se etapas como o uso de metodologias de detecção e monitoramento de alelos da resistência em populações da praga- alvo à determinada tecnologia. Métodos genotípicos e fenotípicos compõem as opções de metodologias para acompanhar a evolução da resistência (HUANG, 2006;

SIEGFRIED et al., 2007; ANDOW, 2008). Métodos tradicionais de monitoramento fenotípico são amplamente difundidos e utilizados no MRI, contudo, apesar de oferecerem resultados satisfatórios em situações de alta frequência de alelos da resistência, o mesmo não ocorre em situações de baixa frequência devido à pouca sensibilidade em detectar os alelos raros e recessivos em uma população (HALLIDAY & BURNHAW, 1990; SIEGFRIED et al., 2007). Métodos genotípicos são sensíveis o suficiente para detectar estes alelos, sendo uma ferramenta crucial na avaliação do risco de evolução da resistência e, consequentemente, na definição e aplicação das estratégias de MRI.

Métodos genotípicos tem íntima ligação com a importante estratégia de MIR chamada alta dose/refúgio. Áreas refúgio, compostas por plantas hospedeiras não-Bt, fornecem indivíduos de genótipo homozigoto suscetível (ss) que podem copular com indivíduos de genótipo homozigoto resistente (rr) sobreviventes ao cultivo Bt (TABASHNIK et al., 2004; HUANG et al., 2011), reduzindo a herança da resistência. A progênie heterozigota (rs) proveniente do cruzamento citado pode ser eliminada em aproximadamente 95% caso a área Bt contenha eventos que expressem altas doses de toxina inseticida, incrementando sobremaneira a capacidade de retardar a evolução da resistência (BATES et al., 2005; TABASHNIK et al., 2008; TABASHNIK et al., 2009; HUANG et al., 2011; BERNARDI et al., 2015 b; BERNARDI et al., 2016). A estratégia alta dose/refúgio se mostra eficaz em situações de baixa frequência de alelos da resistência (ROUSH, 1994; BERNARDI et al., 2015b), por isso a detecção precoce da ocorrência destes alelos, possível através de métodos genotípicos, é determinante na evolução da resistência.

Por meio do método genotípico F2 Screen, proposto por Alstad & Andow (1998), é possível detectar os alelos raros e recessivos da resistência em uma população de campo e selecionar linhagens potencialmente resistentes. Estas linhagens são substrato para execução de diversos estudos norteadores do MRI, dentre eles determinar se há ou não a ocorrência de custo adaptativo associado à resistência. Explorar o custo adaptativo associado à resistência tem grande valor dentro do MRI (JAKKA et al., 2014; HUANG et al., 2015).

Indivíduos carreadores de alelos da resistência (r) podem apresentar menor valor adaptativo em alguns componentes do desenvolvimento e reprodução em comparação aos indivíduos suscetíveis, quando na ausência da pressão de seleção (CARRIÈRE et al., 1994; CARRIÈRE et al., 2004; CARRIÈRE et al., 2006; GASSMANN et al., 2009; JAKKA et al., 2014). Uma vez que limitar a dispersão dos alelos r garante manutenção da suscetibilidade, o valor adaptativo do fenótipo rs em relação ao valor adaptativo do fenótipo ss, ambos produzidos em refúgios, é peça-chave para manejar a resistência (GASSMANN et al., 2009).

A resistência estar ligada a um custo adaptativo, diminuindo o valor adaptativo daqueles que carregam alelos r em relação aos que não os carregam, é um dos fatores mais expressivos na evolução da resistência (ACHARYA et al., 2017). A magnitude e a dominância de custos associados à resistência modelam uma nova perspectiva sobre o papel do refúgio no MRI (GASSMANN et al., 2009), surgindo como poderosas ferramentas a serem compreendidas e aplicadas para retardar a evolução da resistência.

Custos adaptativos não-recessivos (fenótipo rs funcionalmente apresenta custo associado à resistência, o que significa que o valor adaptativo do fenótipo rs é inferior em relação ao fenótipo ss) são capazes de retardar ou reverter a resistência na ausência da pressão de seleção temporária (TABASHNIK et al., 2004). A seleção e investigação de uma linhagem brasileira de *S. frugiperda* resistente à Vip3Aa20 sugeriu que há custos associados à resistência e que seriam recessivos (BERNARDI et al., 2016). O caráter recessivo do custo da resistência à Vip3Aa20 (fenótipos rs e ss apresentando mesmo valor adaptativo) impossibilitaria a estruturação de estratégias de MRI neste âmbito; entretanto, a plasticidade do custo adaptativo permite que fatores ambientais/ecológicos promovam incrementos na magnitude e/ou dominância deste (GASSMANN et al., 2009). Programar refúgios capazes de aumentar a magnitude e/ou a

dominância do custo adaptativo representa uma nova e promissora realidade para a maior longevidade das tecnologias Bt.

Na perspectiva de incrementar a expressão do custo adaptativo dos carreadores de alelos r oriundos de refúgios, a utilização de produtos fitossanitários no tratamento de sementes (TS) apresenta-se como uma possível ferramenta. O ingrediente ativo (i.a.) ciantraniliprole, pertencente ao grupo químico 28- moduladores dos receptores de rianodina, subgrupo das diamidas (IRAC-Brasil/ Comitê de ação à resistência a inseticidas), apresenta elevada eficácia no controle de larvas de *S. frugiperda* na modalidade TS, protegendo as plântulas de milho nos primeiros dias após a emergência. No período de queda da eficácia do TS a concentração do i.a. nas plântulas não é suficiente para causar a morte das larvas, que por sua vez poderá ser suficiente para impactar a expressão do custo adaptativo dos indivíduos com alelos r.

O custo adaptativo associado à resistência representa um papel decisivo na evolução da resistência e por isso deve ser compreendido em um sentido mais amplo para fomentar estratégias de MRI. Neste contexto, estudos direcionados a compreender a capacidade de moldar a expressão do custo adaptativo devem ser elencados como primordiais. Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho selecionar uma linhagem de *S. frugiperda* resistente à Vip3A20, determinar se esta linhagem apresenta custo adaptativo associado à resistência, avaliar o efeito do inseticida químico ciantraniliprole utilizado em TS na cultura do milho, quando em doses sub-letais (fase final do efeito de proteção às plântulas), na magnitude e/ou a dominância do custo adaptativo dos fenótipos rs e rr de *S. frugiperda* resistente à Vip3A20.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e milho Bt

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) tem sua amplitude de dispersão desde o Sul da América do Sul até ao sul dos Estados Unidos da América, passando por Argentina e Uruguai (NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Alguns aspectos bioecológicos desta espécie e particularidades do sistema de produção de cultivos – tais como polifagia (PASHLEY, 1988; NAGOSHI et al., 2007; NAGOSHI et al., 2015), elevada capacidade reprodutiva e dispersão de adultos (NAGOSHI; MEAGHER, 2008; NAGOSHI et al., 2015), múltiplas gerações por ano (FITT et al., 2006; FARIAS et al., 2014), sobreposição de cultivos de plantas hospedeiras (MARTINELLI et al., 2006; MARTINELLI et al., 2007; STORER et al., 2012) – favorecem a ocorrência de severas infestações em qualquer época de cultivo e estágio fenológico do milho (FARIAS et al., 2014; BERNARDI, et al., 2015a).

O inseto-praga *S. frugiperda* tornou-se a principal praga do milho na parte tropical das américas (BUNTIN et al., 2004; HARDKE et al., 2011), em razão de seu potencial danoso e também pela dificuldade de controle (WAQUIL, 2007), tendo em vista sua adaptação aos inseticidas utilizados (OMOTO; DIEZ-RODRÍGUEZ, 2001).

Mesmo com os avanços nos programas de manejo desta praga na cultura do milho, a rotina de cultivo do milho no Brasil se faz durante o ano inteiro em algumas regiões, tornando-se um fator complicador. Acrescenta-se ainda agravantes oriundos da bioecologia de *S. frugiperda*, que possui alta capacidade de reprodução, inúmeros hospedeiros e a importante capacidade de migração (GIOLO et al., 2002).

A aplicação de inseticidas sem orientação e sem controle tem apresentado elevado custo no cultivo do milho, chegando ao número de 10 pulverizações em uma única safra, sem eficácia no controle (WAQUIL et al., 2007).

As ferramentas encontradas por produtores para manterem suas lavouras a salvo desta praga foram pouco eficazes até a década de 1990, quando iniciou a adoção de plantas de milho transgênicas com expressão de proteínas inseticidas. A partir de então, proteínas inseticidas da bactéria *B. thuringiensis* Berliner (Bt) têm sido amplamente utilizadas para o controle de *S. frugiperda* (TABASHNIK, BREVAULT e CARRIÈRE, 2013). A bactéria *B. thuringiensis* foi analisada por Berliner no ano de 1915, sendo isolada a partir de lagartas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), a traça-da-farinha, na região de Thuringia, Alemanha (GLARE; O' CALLAGHAN, 2000). No começo, a bactéria passou a ser usada no controle biológico de pragas (WEISER, 1986).

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva presente no solo, capaz de produzir cristais proteicos, as delta-endotoxinas, possuindo ação letal sobre algumas espécies de insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera. Aproximadamente 50 diferentes famílias de Bt foram descobertas e classificadas de acordo com sua ação nos grupos de insetos (CARNEIRO et al., 2009).

As proteínas mais conhecidas são as chamadas proteínas cristal, com a denominação Cry, que agem sobre formas juvenis de algumas ordens de insetos. Ao longo das últimas décadas, devido aos avanços da biotecnologia, muitos dos genes Bt responsáveis por expressão de proteínas inseticidas vêm sendo incorporados em espécies de plantas cultivadas, tais como milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e soja (*Glycine max* L.). Surgem, assim, as plantas geneticamente modificadas (GM), conhecidas como plantas Bt, que expressam continuamente tais proteínas em seus tecidos, apresentando elevada especificidade sobre as pragas da lavoura (JAMES, 2011).

No Brasil, a utilização de plantas Bt começou somente em 2005, ano em que a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), ligada ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), aprovou a liberação comercial da

tecnologia para o controle de insetos. A primeira planta Bt liberada no Brasil foi o algodão, expressando uma única proteína Bt nos tecidos da planta (CTNBIO, 2007; CTNBIO, 2008).

O índice de utilização destas proteínas no mercado passou por aumento gradual, em função dos benefícios no controle de pragas e aumento de produtividade e, consequentemente, de maior retorno econômico (CARPENTER, 2010; HUTCHISON et al., 2010; EDGERTON et al., 2012; KATHAGE; QAIM, 2012). Outras razões para a intensificação da presença das referidas proteínas no mercado foram a redução no uso de inseticidas (KLÜMPER; QAIM, 2014) e a preservação de inimigos naturais (COMAS et al., 2014).

Desde a liberação do primeiro evento de milho resistente a insetos, expressando a proteína Cry1Ab, essa tecnologia passou a ser utilizada de forma mais intensa nas safras de milho em todo o país. Os benefícios no controle de pragas e aumento da produtividade trouxeram uma elevação expressiva na utilização do milho Bt em todo o país, principalmente nas regiões de maior infestação da praga. Assim, logo após a liberação do primeiro evento de milho resistente foram aprovados outros eventos expressando outras proteínas Bt, a exemplo da Cry1F e Vip3A, bem como eventos que expressam mais de uma proteína: Cry1A.105/Cry2Ab2, Cry1b/Vip3A, Cry1Ab/Cry1F e Cry1A.105Cry2Ab2/Cry1F (OMOTO, 2012).

O milho de primeira e segunda safra correspondeu à segunda cultura com maior área de cultivo Bt, ocupando aproximadamente 12 milhões de hectares, o que representa cerca de 80% da área total de milho plantada no Brasil (CÉLERES, 2017). As áreas de produção de milho convencional ficaram tão restritas que, atualmente, tem-se a ideia de uma produção apenas com milho Bt dentro dos padrões elevados de produção dessa tecnologia.

Entre os estados brasileiros produtores de milho, o Mato Grosso lidera com a maior área de cultivo de milho Bt, com cerca de 5 milhões de hectares em 2016, o que corresponde a aproximadamente 10% do total da área ocupada com plantas Bt no Brasil. O Paraná aparece em segundo lugar, com aproximadamente 4 milhões de hectares, é dizer, cerca de 7% do total, e depois Rio Grande do Sul, com aproximadamente 2 milhões de hectares, cerca de 4% do total (CÉLERES, 2017).

Juntamente com as proteínas Cry, sintetizadas pela bactéria *B. thuringiensis* durante a sua fase de crescimento reprodutivo, são sintetizadas as proteínas Vip durante a fase vegetatitiva, que têm demonstrado especificidade a insetos da ordem Lepidoptera (ESTRUCH et al., 1996), e as proteínas Cyt, que possuem atividade citolítica *in vitro* e especificidade *in vivo* aos dípteros (DE MAAGD et al., 2003). Contudo, das proteínas produzidas pela bactéria *B. thuringiensis*, Cry e Vip são as mais estudadas, por possuírem atividade inseticida a insetos-praga de diversas culturas de importância econômica, principalmente o milho e o algodão (SENA et al., 2009; CHAKROUN; FERRÉ, 2014; CRIALESI-LEGORI et al., 2014).

As proteínas Vip não são homólogas às proteínas Cry (RANG et al., 2005) e são classificadas em quatro classes diferentes: Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4. Esta última (Vip4) não tem sua especificidade muito bem esclarecida (CRICKMORE et al., 2014). Vale destacar que a proteína Vip3 possui atividade inseticida contra um grande espectro de insetos-praga de importância agronômica, da ordem Lepidoptera, e revela alta bioatividade para *S. frugiperda* (ESTRUCH et al., 1996; DOSS et al., 2002; LIU et al., 2007).

Sobre o modo de ação dessas proteínas, sabe-se que elas atuam por meio de formação de poros nas células epiteliais do intestino médio. As proteínas Vip são ingeridas como protoxinas e são processadas pelas proteases do intestino do inseto, ligando-se a receptores específicos e causando a lise das células do intestino do inseto (LEE et al., 2003).

2.2. Resistência de *S. frugiperda* a inseticidas

O conceito de resistência de pragas é explicado de acordo com os mecanismos de resistência que um indivíduo possui e leva em conta as substâncias químicas às quais essa praga pode ser resistente. Sendo assim, as resistências múltipla e cruzada podem ser conceitos empregados neste contexto, assumindo-se que a resistência pode ocorrer para duas ou mais proteínas Bt (CASELEY; CUSSANS; ATKIN, 1991).

Para início de análise, a resistência cruzada tem como princípio um único mecanismo, conferindo resistência a duas ou mais proteínas inseticidas, que normalmente possuem o mesmo sítio de ação, como, por exemplo, Cry1Ab e Cry1F e Cry1A.105 em *S. frugiperda*. Ao contrário, a resistência múltipla tem pelo menos dois diferentes mecanismos de resistência, trabalhando ao mesmo tempo para conferir resistência a duas ou mais proteínas Bt, com modos de ação diferentes, como exemplificado em Cry1F, Cry2Ab2 e Vip3Aa20 (CASELEY; CUSSANS; ATKIN, 1991).

Mesmo com a possibilidade de utilização das diversas tecnologias de milho para cultivo comercial com Bt, a adesão da tecnologia Bt é mais amplamente representada pelas proteínas inseticidas do grupo Cry1. Outro fato importante é que um número elevado de proteínas desse grupo expressas em milho Bt apresentam resistência cruzada (HUANG et al., 2014; BERNARDI, et al., 2015; SANTOS-AMAYA et al., 2015). Associados a essa prática, os plantios de algodão Bt são realizados na mesma região em que se cultiva o milho Bt, mantendo o mesmo sistema de cultivos no Brasil, trazendo, ao longo dos anos e ciclos de cultivo, as mesmas populações de *S. frugiperda* presentes nas mesmas áreas, infestando ambas culturas (MARTINELLI et al., 2007).

Os aspectos bioecológicos, principalmente as fontes alimentares, têm grande influência sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda*. Lagartas desta espécie apresentaram maior tempo de desenvolvimento em algodão e soja, além de pupas menores em comparação àquelas geradas de lagartas alimentadas com folhas de milho (PITRE; HOGG, 1983). O hábito polífago de *S. frugiperda* proporciona mudanças comportamentais e fisiológicas devido à utilização de diferentes plantas hospedeiras, permitindo a diferenciação de *S. frugiperda* em exemplos como milho e arroz (PROWELL et al., 2004). Apresentam-se, assim, duas raças morfologicamente idênticas, contudo, geneticamente distintas (BUSATO et al., 2004) e com aspectos biológicos distintos, sobretudo quanto a hábitos reprodutivos e desenvolvimento larval (JUAREZ et al., 2012). A existência de raças associadas a hospedeiros influencia nas medidas de controle e manejo de resistência desse inseto.

O uso contínuo da expressão das mesmas proteínas Bt em plantas de milho tem ocasionado uma elevada pressão de seleção sobre a lagarta-do-cartucho, levando a um aumento no índice de resistência (ANDOW, 2008). Desta forma, pesquisadores têm procurado, nos últimos tempos, elucidar os riscos do uso exacerbado de plantas Bt com expressão das mesmas proteínas, chamando a atenção para fatores ambientais inseridos nesse sistema, além do potencial de evolução de resistência nas pragas-alvo.

Outro ponto de destaque dentro das variáveis existentes na relação da planta com o inseto-praga e que pode contribuir para a evolução da resistência é a variação dos níveis de proteína durante o desenvolvimento nas diferentes estruturas da planta (folha, estilo, estigma e grão). Tal variabilidade pode afetar a reação das pragas-alvo devido ao consumo e exposição, levando a uma alteração na resposta dos insetos com incremento hereditário, permitindo a sobrevivência diferencial de alguns insetos e, consequentemente, favorecendo a evolução da resistência, sempre levando em consideração os indivíduos heterozigotos (HUANG et al., 2011).

A resistência em *S. frugiperda* a Cry1F aconteceu pela primeira vez em Porto Rico e no Brasil. O cultivo intensivo de plantas Bt com a expressão em baixa dose da proteína inseticida e a baixa adoção de áreas de refúgio podem ter contribuído para a exposição da praga *S. frugiperda* a constante pressão de seleção durante todo o ano

(STORER et al. 2010; FARIAS et al. 2014a). Esta quebra de resistência se tornou um marco, sendo o mais rápido em termos de evolução da resistência para uma cultura Bt, levando à retirada desse evento do mercado em Porto Rico com o objetivo de restabelecer a suscetibilidade de *S. frugiperda* à proteína Cry1F, buscando resgatar a tecnologia (STORER et al., 2010).

Em geral, entende-se que, na maioria dos casos de evolução da resistência em laboratório, os insetos apresentam mutações em genes que codificam proteínas para qualquer uma das etapas de ação do inseticida (HECKEL et al., 2012). No entanto, para análise em insetos no campo, apenas a alteração do sítio de ligação tem sido detectada (FERRÉ; VAN RIE, 2002; WANG et al., 2007; TABASHNIK et al., 2011).

A detecção e caracterização da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas vêm sendo estudadas e têm informado a presença de variabilidade genética com relação à resistência aos inseticidas. Em um estudo realizado na Flórida, observou-se que a resistência de *S. frugiperda* a inseticidas a base de piretroides obteve variações de até 216 vezes, sendo que para fosforados chegou a 271 vezes e para carbamatos 192 vezes, o que elucidou a grande evolução de resistência que está ocorrendo (YU, 2011). Nesse mesmo estudo, verificou-se um aumento de 1,2 a 11 vezes na concentração de enzimas detoxificadoras em populações de campo quando comparadas às de laboratório (YU, 2011). No Brasil, OMOTO e DIEZ-RODRIGUEZ, (2001) observaram a intensidade de aproximadamente 13 vezes, com o padrão de herança recessiva incompleta de resistência de *S. frugiperda* ao piretroide lambda-cyhalothrin. Essa variação foi ainda maior na Venezuela, onde MORILLO e NOTZ (2001) detectaram intensidades de resistência de 19 a 42 vezes.

Bernardi et al. (2015b) relataram em seus estudos que *S. frugiperda* é capaz de apresentar alta sobrevivência sob o cultivo do milho que expressa proteínas do grupo Cry1 e Cry2 de forma isolada ou em pirâmide. Além do milho Bt, observou-se também que a *S. frugiperda* é resistente à tecnologia do milho Bt utilizando proteínas Cry1 e Cry 2. Também apresentou elevada sobrevivência em tecnologias de algodão Bt (BERNARDI; HORIKOSHI et al., 2016).

Além da resistência a Cry1F, estudos recentes reportaram a seleção em laboratório a partir de populações de campo e caracterização da resistência de linhagens de *S. frugiperda* ao milho YieldGard VT PRO™, que expressa Cry1A.105/Cry2Ab2 (BERNARDI, et al., 2015; SANTOS-AMAYA et al., 2015), PowerCore™, que expressa Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F (BERNARDI, 2015), e Agrisure Viptera™ e Agrisure Viptera™, expressando Vip3Aa20 e Vip3Aa20/Cry1Ab, respectivamente (BERNARDI et al., 2016). Isso demonstra a existência de alelos da resistência a essas tecnologias de milho em populações de campo de *S. frugiperda* e a possibilidade de evolução de resistência, caso estratégias de manejo sejam negligenciadas.

Com o aumento de casos de resistência de insetos a inseticidas e toxinas Bt, pesquisas utilizando-se de ferramentas moleculares estão sendo amplamente conduzidas no intuito de elucidar mecanismos de resistência de insetos e possibilidade de localização de novos alvos para moléculas inseticidas (OAKESHOTT, et al., 2013; RANSON, et al 2002; GAHAN; GOULD; HECKEL, 2001), caracterizando diferentes genes e enzimas potencialmente envolvidos na resistência (RANSON et al., 2002).

2.3. Manejo da resistência de *S. frugiperda* a proteínas *Bt*

Com o intuito de retardar a evolução da resistência dos insetos-praga e prolongar a vida útil das proteínas inseticidas envolvidas, o manejo da resistência dos insetos aos produtos inseticidas torna-se fundamental, pois a necessidade dessa prática advém do consenso de que o cultivo do milho Bt de forma sucessiva em grandes áreas resultará na seleção de biótipos das pragas-alvo resistentes às toxinas Bt. De acordo com Maia (2010), um dos principais riscos ambientais associados à adoção de cultivos transgênicos está no manejo ineficaz de resistência de insetos.

Para conter a evolução da resistência de insetos-praga em milho Bt, faz-se necessário utilizar estratégias de manejo condizentes com as necessidades e dificuldades encontradas em cada situação de resistência. O manejo da resistência de insetos-praga refere-se a um conjunto de procedimentos efetivos e completos aplicados em áreas de cultivo com a finalidade de prevenir, retardar, detectar e mitigar casos de aumento ou evolução da resistência de insetos-praga a proteínas Bt empregadas em seu controle (ROUSH, 1997; ONSTAD, 2008; MACHADO; FIUZA, 2011). Entre as estratégias propostas para o manejo da resistência em milho transgênico, a alta dose, o refúgio e a piramidação de mais de uma toxina com diferentes sítios de ação têm sido apontadas como as mais eficientes (ROUSH, 1997; GOULD, 1998; ROUSH, 1998; ZHAO et al., 2005).

O refúgio gera indivíduos suscetíveis para acasalamento com os poucos resistentes que permanecem na área (TABASHNIK, 2008). O uso de alta dose da proteína Bt nas plantas – promovendo elevada mortalidade dos heterozigotos – associado ao refúgio traz consigo um grande benefício para o uso de plantas *Bt*, tendo em vista que a evolução da resistência da praga-alvo é retardada (BERNARDI et al., 2011).

Vale lembrar que uma proteína pode ter atividade de alta dose para uma espécie-praga e de dose moderada ou baixa para outras, o que não inviabiliza o manejo da praga, pois, mesmo que não tenha sido eficaz, a ação da proteína pode facilitar a ação de outros fatores, como inimigos naturais e variações do ambiente (MARTINELLI; OMOTO, 2005). Neste caso, é de fundamental importância a utilização da área de refúgio e verificação da ação dos inseticidas sobre inimigos naturais.

Neste cenário, muitos casos de resistência às culturas Bt podem estar relacionados a não implantação de estratégias de alta dose/refúgio (HUANG et al., 2011), principalmente à não adoção do refúgio por parte dos agricultores (GASSMANN et al., 2011; KRUGER et al., 2012). A esquematização das áreas de refúgio traz consigo variações específicas em função da área e do tipo de proteína utilizado, além da observação de outras culturas próximas às lavouras Bt e de inimigos naturais (MARTINELLI; OMOTO, 2005) para que essas áreas produzam proporções compatíveis de adultos para o acasalamento e manutenção da suscetibilidade.

Uma opção utilizada em conjunto com a estratégia alta dose/refúgio é a piramidação de genes que expressam toxinas Bt, demonstrando elevada atividade inseticida contra praga-alvo (GHIMIRE et al., 2011; CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015). A premissa básica da piramidação de genes é que as proteínas inseticidas, isoladamente, ocasionem elevada mortalidade da praga-alvo, ou seja, que o os insetos resistentes a uma proteína inseticida sejam controlados pela outra proteína e vice-versa, possibilitando, assim, o "controle redundante" (GOULD, 1986; ROUSH, 1998; IVES et al., 2011; BRÉVAULT et al., 2013).

A vantagem da pirâmide de genes está na evolução da resistência de forma mais lenta em comparação com plantas que expressam uma única proteína inseticida, já que os insetos resistentes a uma determinada proteína são eliminados da área pela ação de outra proteina utilizada nesta piramidação (FERRÉ; VAN RIE, 2002; HUANG et al., 2011). Por ser uma resistência baseada em duas ou mais proteínas, a piramidação traz consigo a possibilidade de melhor atividade inseticida.

A piramidação de genes pode ser classificada como estratégia de ação complexa. No entanto, sua eficácia é garantida se as toxinas expressas apresentarem diferentes modos de ação e a praga-alvo não apresentar resistência cruzada às referidas toxinas (TABASHNIK et al., 2009).

Quando se analisam as plantas Bt "piramidadas", percebe-se que uma das maiores ameaças a essa tecnologia é a evolução de resistência cruzada em populações de pragas-alvo de controle. Os indícios da possibilidade de evolução de resistência cruzada foram demonstrados para duas populações de *Pectinophora gossypiella* selecionadas em laboratório para resistência a Cry1Ac, nas quais foi verificada resistência cruzada para Cry1Aa e Cry1Ab (TABASHNIK et al.,

2000). Essa constatação também foi feita em uma população de *O. nubilalis* resistente a Cry1F, que apresentou baixo nível de resistência cruzada a Cry1Ac e ausência de resistência cruzada a Cry1Ab. A ausência de resistência cruzada entre Cry1F e Cry1Ab demonstra que híbridos de milho expressando essas duas toxinas são compatíveis para o manejo da resistência de *O. nubilalis* e que as proteínas Cry1F e Cry1Ab não se ligam ao mesmo receptor para essa espécie (PEREIRA et al., 2008).

Sendo a dificuldade de utilização de proteínas Cry um empecilho no manejo da resistência, proteínas Vip trazem consigo enorme potencial na aplicação contra insetos que são resistentes às proteínas Cry, pois apresentam ausência de homologia na sequência de aminoácidos com estas proteínas. Outro fator de relevância dessas proteínas é o fato de elas poderem estar junto com as toxinas Cry a partir da piramidação para romper possíveis resistências, haja vista que as Vip ocupam receptores diferentes nos insetos estudados (SENA; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; FERRÉ, 2009).

Muitos estudos dos mecanismos de ação das toxinas Vip trazem consigo importantes descobertas para o manejo de resistência desta classe de proteínas. BENARDI et al. (2016) relataram a obtenção de uma isolinha resistente à proteína Vip3Aa em cultivos de milho, caracterizando esta resistência como monogênica, recessiva, autossômica e com custo adaptativo.

Existem casos em que as plantas expressam mais de uma proteína, mas não entram no conceito de piramidação (ROUSH, 1998; BRÉVAULT et al., 2013). Isto ocorre quando as proteínas inseticidas presentes na planta Bt apresentam resistência cruzada com outra proteína de Bt. Também pode acontecer quando a expressão de uma das proteínas não é suficiente para o controle de insetos resistentes a uma determinada proteína (TABASHNIK; RENSBURG; CARRIÈRE, 2009). Por isso, para que a estratégia de piramidação funcione efetivamente, também existe a necessidade de incremento com outras formas de manejo da resistência, como refúgio e alta dose, que complementam a funcionalidade do manejo (CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015).

Os métodos genotípicos F1 e F2 *screen* também são utilizados e têm como objetivo detectar a frequência inicial de alelos resistentes em populações de campo, sendo essenciais para estruturação de estratégias para o manejo da resistência. Porém, a observação do tempo e da facilidade no emprego devem ser consideradas na escolha do método. O método F1 *screen* necessita do uso de linhagem resistente de laboratório e condução de um grande número de isolinhas, o que dificulta sua adoção, por se tornar um método demorado e de alto custo (BERNARDI et al., 2011). Ao contrário, F2 *screen*, que foi criado por Andow e Alstad (1998), não utiliza linhagens resistentes.

Para atrasar o desenvolvimento da resistência em cultivos Bt, as agências governamentais dos EUA e Canadá adotaram o plano de manejo da resistência, conhecido como a estratégia de "alta dose refúgio" (GOULD, 1998). Referida estratégia foi posteriormente complementada com a técnica de piramidação de genes (ZHAO et al., 2003), potencializando a capacidade de impedir ou retardar a evolução da resistência.

Algumas pressuposições fundamentais para o sucesso da estratégia de refúgio e alta dose são: herança da resistência recessiva e monogênica, baixa frequência inicial de alelos de resistência ($<10^{-3}$), custos adaptativos associados à resistência e abundância de plantas não-Bt perto das culturas Bt, facilitando acasalamentos aleatórios entre indivíduos resistentes e suscetíveis (GOULD, 1998). Segundo Bernardi et al. (2015b), a frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa20 expressa em híbridos Agrisure® Viptera™ e Viptera 3™ possui baixos valores nas linhagens de diversas regiões de produção de milho no Brasil. É importante que estratégias proativas norteiem o MRI, garantindo que a proteína inseticida Vip3A20 tenha sustentabilidade como ferramenta eficaz na agricultura brasileira.

2.4. Custo adaptativo associado a resistência de *S. frugiperda* em milho Bt

O estudo da herança da resistência permite conhecer a base genética associada a um dado mecanismo de resistência, isto é, se a resistência é dominante ou recessiva, autossômica ou ligada ao sexo, monogênica ou poligênica (ROUSH; MACKENZIE, 1987). Cruzamentos recíprocos entre linhagens suscetíveis e resistentes são utilizados para determinar a dominância (TABASHNIK, 1994). A obtenção de uma população resistente também permite conhecer se há custo associado à resistência (COUSTAU et al., 2000).

Com a elevação no número de espécies de insetos resistentes a agentes de controle (ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE, 2020), os estudos que visam avaliar as bases genéticas associadas à resistência têm aumentado ao longo dos últimos anos (CAO; HAN, 2006), mediante análises sobre a herdabilidade de caracteres que conferem resistência a pesticidas e toxinas Bt, imprescindíveis para elaboração do manejo da resistência de insetos (TABASHNIK, 1991).

O padrão de herança genética tem grande influência sobre a evolução da resistência de insetos, sendo determinante para a taxa de aumento de alelos que conferem resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Além disso, estudos sobre a herdabilidade de linhagens de insetos expostas à elevada pressão de seleção exercida por inseticidas têm possibilitado uma melhor compreensão sobre a ação de forças seletivas sobre organismos complexos.

Sabendo que o custo da resistência ocorre quando, na ausência de toxinas, o valor adaptativo de indivíduos com alelos de resistência é menor que aquele de indivíduos sem alelos de resistência, as desvantagens adaptativas provenientes da resistência fazem com que os genes que conferem estas características raramente se fixem na população natural, resultando em um declínio da frequência de alelos da resistência na população quando ausente a pressão de seleção.

Os alelos que conferem resistência, pelo menos em estágios iniciais, podem ter efeitos negativos que causam um custo adaptativo ao indivíduo (CARRIÈRE et al., 1994), o que pode levar à baixa frequência de alelos de resistência nas populações que não tenham sido expostas a culturas Bt (COUSTAU et al., 2000; GASSMANN et al., 2009). É incerto se a resistência a xenobióticos está sempre associada a custo adaptativo. No entanto, algumas estratégias de manejo propostas pressupõem a presença do custo adaptativo associado à resistência (TABASHNIK, 1994; GOULD, 1998; ONSTAD, 2008). Assim, é importante documentar o custo adaptativo em populações de insetos, a fim de desenvolver estratégias de manejo adequadas.

Desde a liberação comercial das culturas transgênicas, tem-se evidenciado que as exposições prolongadas e extensivas às toxinas de *B. thuringiensis* inseridas nas plantas podem gerar resistência em populações de pragas-alvo, reduzindo a longo prazo a utilidade dessa tecnologia (GOULD, 1998; ROUSH, 1998).

A adoção de planos de manejo por parte dos EUA e do Canadá não foi despretensiosa, tendo em vista a necessidade de retardar o surgimento de insetos resistentes a cultivos Bt, surgindo, assim, a estratégia de "alta dose refúgio" (GOULD, 1998), já mencionada anteriormente neste trabalho. Um dos conceitos tomados como fundamentais para o sucesso dessa estratégia é a verificação da existência de custos adaptativos associados à resistência (GOULD, 1998; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2001; TABASHNIK et al., 2004). Esses custos adaptativos são evidenciados quando o desempenho dos insetos resistentes é menor do que o dos insetos suscetíveis na ausência da pressão de seleção (GASSMANN et al, 2009).

Os custos adaptativos nas pragas resistentes a toxinas de B. thuringiens devem ser utilizados na tentativa de retardar ou reverter a evolução de resistência a culturas transgênicas Bt (GOULD, 1998; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2001; CARRIÈRE et al., 2010). Isso ocorre devido ao fato de que o custo adaptativo reduz o coeficiente de seleção,

favorecendo indivíduos suscetíveis em relação a indivíduos resistentes nas áreas de plantas não-Bt, como explicado anteriormente (CARRIÈRE et al., 2010). Daí a necessidade de os refúgios serem feitos de maneira sistemática e correta. Nessas condições, sendo em refúgios ou outros ambientes sem exposição a toxinas Bt, a seleção contra a resistência ocorrerá (GASSMANN et al., 2009), trazendo uma redução na dispersão e na frequência de alelos resistentes em campo (CARRIÈRE; TABASHNIK, 2001; TABASHNIK et al., 2004; GASSMANN et al., 2009).

Indivíduos carreadores de alelos da resistência (r) podem apresentar menor valor adaptativo em alguns componentes do desenvolvimento e reprodução em comparação com os indivíduos suscetíveis, quando na ausência da pressão de seleção (CARRIÈRE et al., 2004; GASSMANN et al., 2009; JAKKA et al., 2014).

Limitar a dispersão dos alelos r garante manutenção da suscetibilidade. Sendo assim, o valor adaptativo do fenótipo rs em relação ao valor adaptativo do fenótipo ss, ambos produzidos em refúgios, é peça-chave para manejar a resistência (GASSMANN et al., 2009).

Vale ressaltar que o declínio da resistência a Bt na ausência de seleção vem sendo observada em estudos de laboratório (GASSMANNet al., 2009). Esse declínio tem sido atribuído ao custo adaptativo, devido à baixa taxa de crescimento larval (LIU et al., 1999) e diminuição de sobrevivência (GROETERS et al., 1994; GROETERS et al., 1993) em indivíduos resistentes na ausência de seleção. Apesar dessas evidências, o custo adaptativo tende a ser reduzido por evolução subsequente (COUSTAU et al., 2000). A conclusão sobre uma possível ausência de custo adaptativo deve ser vista com prudência, pois custos adaptativos podem se manifestar em outros fatores relacionados à biologia de *S. frugiperda*, como fecundidade das fêmeas e sucesso de acasalamento de indivíduos resistentes em relação aos suscetíveis na ausência de Bt (GROETERS et al., 1993).

É importante salientar que em muitos trabalhos realizados mediante observância dos custos adaptativos, a análise foi desenvolvida em condições ótimas aos insetos, o que pode enviesar o resultado da pesquisa (ROUSH; MACKENZIE, 1987) ao subestimar o custo adaptativo. De fato, o custo associado à resistência pode ser mais visível em condições desfavoráveis aos indivíduos, tendo, assim, maior caracterização da resistência envolvida (JANMAAT; MYERS, 2005; RAYMOND et al., 2005). Assim, ainda há necessidade de se estimar mais criteriosamente o custo adaptativo associado à resistênciaa de *S. frugiperda* a proteínas Bt, em condições que aumentem a chance de detectá-lo.

A descoberta dos níveis de custos adaptativos nos casos associados à resistência pode trazer benefícios na análise, desenvolvimento e aplicação de táticas de manejo para eliminar a evolução da resistência ou, pelo menos, colaborar com o retorno da suscetibilidade à tática de controle que apresenta falhas em condições de campo.

Assim sendo, a eficiência do manejo da resistência a inseticidas associa-se, principalmente, à análise dos custos adaptativos, observando-se o desenvolvimento e a reprodução reduzida das progênies na ausência da pressão de seleção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de *S. frugiperda* e manutenção em laboratório

Para selecionar uma linhagem de *S. frugiperda* resistente à toxina Vip3Aa20, foram coletadas amostras em quatro regiões geográficas distintas no Brasil com expressiva produção de milho durante a 1ª e a 2ª safra de 2017. Os estados alvos das coletas foram Minas Gerais, São Paulo, Goiás, e Mato Grosso. Em cada localidade obteve-se ~ 1000 larvas entre 4º- 6º instares, em campos de milho não-Bt, sem pulverização foliar de inseticidas químicos prévia à coleta. As plantas de milho dos campos coletados estavam entre os estádios fenológicos V4-V7. A presença da larva foi identificada através de injúrias características na planta de milho. Para que o material coletado representasse a variabilidade genética da população local da praga, as plantas escolhidas estavam a uma considerável distância entre si. As larvas foram cuidadosamente retiradas dos cartuchos das plantas (uma larva por planta) e individualizadas, ainda no campo, em copos plásticos transparentes de 100 ml contendo dieta artificial, proposta por Kasten Jr. et al. (1978), previamente preparados e acondicionados em caixas de isopor. Em seguida, o material foi levado ao Laboratório de Insect Resistance Managment-Traits, na estação experimental da Syngenta Proteção de Cultivos, Holambra-SP.

Tabela 1. Amostras de *S. frugiperda* coletadas para seleção de linhagem resistente à Vip3Aa20

Município/Estado	Identificação	Mês/Ano de coleta	*n*	Safra agrícola
Aguaí-SP	AG-SP	Dezembro/2016	950	1ª Safra 2017
Vazante-MG	VZT-MG	Janeiro/2017	1100	1ª Safra 2017
Lucas do Rio Verde-MT	LRV-MT	Março/2017	1200	2ª Safra 2017
Rio Verde-GO	RV-GO	Abril/2017	1050	2ª Safra 2017

Figura 1. Locais de amostragem de *S. frugiperda* coletadas na 1ª safra e 2ª safra de 2017 para seleção de linhagem resistente à Vip3Aa20

As amostras coletadas foram submetidas à triagem no laboratório, objetivando eliminar larvas mortas ou de outras espécies, parasitadas por inimigos naturais ou colonizadas por entomopatógenos. As larvas visualmente saudáveis permaneceram nos copos contendo dieta artificial e foram acondicionadas em salas com condições ambientais controladas ideais para o desenvolvimento da espécie em questão (temperatura 27 ± 2°C, umidade relativa

50 ± 10% e fotofase de 14 horas), permanecendo até atingirem o estádio de pupa. Pupas de coloração marrom-avermelhada (esclerotizadas) foram retiradas com o auxílio de pinça entomológica, e então lavadas com solução de água e sulfato de cobre (10%) para desinfecção. Identificou-se cada pupa de acordo com o gênero. As pupas do mesmo sexo foram acondicionadas em gaiolas cilíndricas de material PVC (20 cm de altura × 14,5 cm de diâmetro), forradas ao fundo com papel filtro cilíndrico e vedadas na parte superior com um tecido voil, permanecendo até a emergência dos adultos, fenômeno que ocorre gradualmente a partir do 6º-8º dia após retirada das pupas. As mariposas fêmeas emergem previamente aos machos, e assim essa característica biológica foi respeitada, não os colocando em condições ambientais diferentes a fim de sincronizar a emergência, uma vez que este período antecessor permite que as fêmeas atinjam a maturação sexual. A emergência dos adultos, designados como geração F0, deu início ao método F2 Screen, descrito a seguir.

3.2. Estabelecimento de isofamílias para F2 *Screen*

Casais de adultos F0 (01 ♀ + 01 ♂) foram formados separadamente a partir do início da emergência. Cada um desses cruzamentos constituídos por dois parentais foi identificado como uma isofamília. A rastreabilidade das isofamílias ao longo do F2 Screen é fundamental para a efetividade do estudo. Para cada região coletada, aproximadamente cem isofamílias foram formadas. A formação das isofamílias garante o princípio do método F2 Screen de preservar a variabilidade genética da população proveniente do campo. Cada casal foi alocado em uma gaiola formada por um copo plástico transparente de 500 ml, em posição invertida, com uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro forrada com papel filtro de mesmo diâmetro como fundo. Cada gaiola continha um copo plástico de 50 ml cortado ao meio, com algodão saturado de solução açucarada (90% água + 10% de glucose de milho). Descartava-se a primeira postura, o casal era realocado em uma nova gaiola, com alimentação fresca, onde permanecia por mais dois dias. A postura seguinte, frequentemente maior e mais viável, foi coletada e fixada à tampa de um copo plástico transparente de 500 ml contendo 3 ml de dieta artificial ao fundo (geração F1). As larvas F1 de cada isofamília permaneceram juntas até o 3º instar, quando 120 larvas por isofamília foram individualizadas em copos de 100 ml contendo 2 ml de dieta artificial ao fundo. Ao atingirem o estádio de pupa, retiravam-se os indivíduos dos copos plásticos, e todas as pupas visualmente saudáveis de uma mesma isofamília foram colocadas em uma única gaiola cilíndrica de material PVC (20 cm de altura × 14,5 cm de diâmetro), revestida internamente com papel sulfite, forrada ao fundo com papel filtro cilíndrico e vedada na parte superior com um tecido voil. Após a emergência dos adultos, acasalamento e início de oviposição, as posturas (geração F2) foram coletadas e acondicionadas em copos plásticos transparentes de 500 ml contendo papel filtro constantemente umedecido com água destilada. A etapa de junção de indivíduos irmãos F1 de uma mesma isofamília para cruzamento (endogamia) é responsável pela concentração de alelos da resistência na geração seguinte (F2) em genótipos homozigotos resistentes.

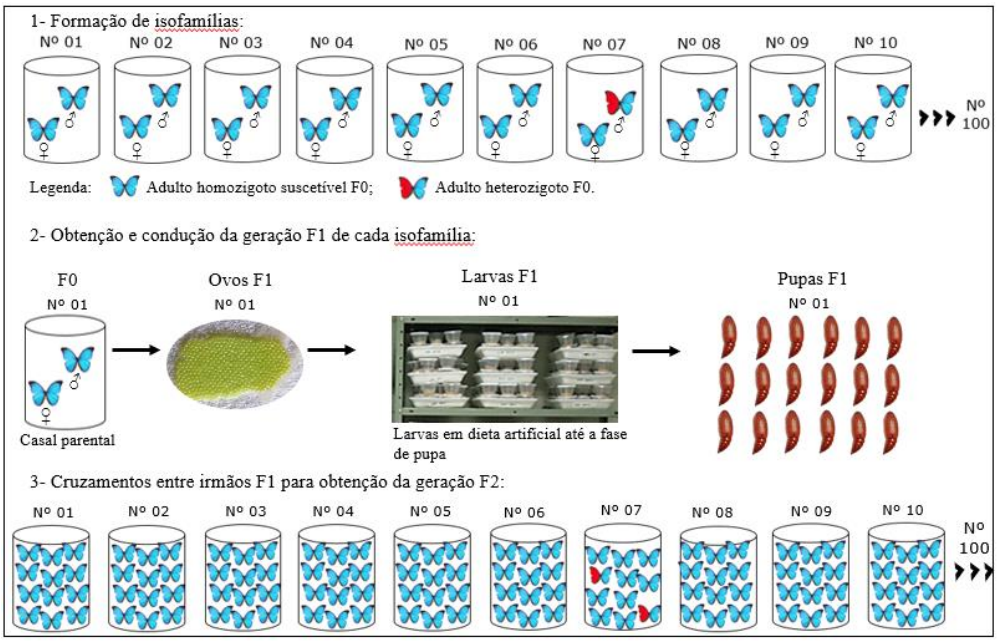

Figura 2. Etapas do estabelecimento e condução de isofamílias propostas pelo método F2 Screen (adaptado de Andow e Alstad, 1998).

3.3. *Screening* da geração F2 com discos foliares de milho Agrisure® Viptera™

Para selecionar uma linhagem de *S. frugiperda* resistente à Vip3Aa20, executou-se o screening da geração F2 de 402 isofamílias geradas a partir de quatro coletas de campo de regiões geograficamente distintas do Brasil.

Tabela 2. Número de isofamílias submetidas ao screening da geração F2 em folhas de milho expressando a toxina Vip3Aa20 e duração do bioensaio

Município/Estado	Identificação da população	Nº de isofamílias testadas	Duração do bioensaio
Aguaí-SP	AG-SP	77	7 dias
Vazante-MG	VZT-MG	103	14 dias
Lucas do Rio Verde-MT	LRV-MT	122	14 dias
Rio Verde-GO	RV-GO	100	14 dias
Total		**402**	

O híbrido de milho Formula Viptera™ e o seu isogênico não-Bt foram inicialmente cultivados em casa de vegetação em vasos plásticos de cinco litros, contendo mistura homogeneizada em betoneira de terra, areia e substrato de casca de pinus (proporção 1:1:1), com adição de adubo na formulação 04-14-08 [(N (nitrogênio), P2O5 (óxido de fósforo), K20 (óxido de potássio)]. Cada vaso recebeu uma semente, as quais foram previamente tratadas com Maxim Advanced®, produto fitossanitário com ação fungicida, para garantir a sanidade das plântulas controlando o fungo de solo Fusarium pallidoroseum. O manejo das plantas, como irrigação e nutrição, foi igualmente executado para todos os vasos, evitando influenciar diferentemente na expressão da proteína inseticida. A semeadura dos vasos foi escalonada propiciando sincronismo entre eclosão de neonatas das diferentes isofamílias e oferta de tecido vegetal no estádio predeterminado.

Discos foliares de 16 milímetros (mm) de diâmetro foram confeccionados a partir de cartuchos das plantas de milho no estádio fenológico V6. Os bioensaios foram conduzidos em bandejas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ), previamente preparadas com uma mistura ao fundo da célula de ágar a 3% em água e um disco foliar em sua superfície. Cada isofamília recebeu uma bandeja a ser infestada com 128 neonatas (~ 12 h após eclosão). A transferência das neonatas foi executada com um pincel de cerdas finas. Como tratamento controle, 16 neonatas por isofamília foram colocadas em discos foliares de milho isogênico não-Bt. A cada 16 neonatas transferidas, vedava-se o grupo de células com uma lâmina plástica auto-adesiva (BIO-BA-16), evitando o escape de indivíduos. O material da lâmina plástica permite trocas gasosas entre o interior da célula e o ambiente. As bandejas infestadas permaneceram em câmara climatizada nas condições de temperatura 27 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 horas. Os bioensaios conduzidos para a população AG-SP tiveram duração de 7 dias; para os demais locais, a duração foi de 14 dias. Neste último caso, aos 7 dias as larvas sobreviventes foram contabilizadas e transferidas individualmente para copos plásticos transparentes de 100 ml, contendo ao fundo a mistura de ágar-água (3%) e um pedaço de ~ 3 cm2 de tecido foliar fresco de milho Formula Viptera™, onde permaneciam por mais 7 dias. Nesta segunda etapa, cada planta de milho a ser utilizada foi submetida a um teste imonucromatográfico ou tira de fluxo lateral (QuickStick, Envirologix), para detecção qualitativa da proteína Vip3Aa20. Em raras ocasiões onde a sobrevivência no sétimo dia foi de ~100%, a isofamília foi excluída do estudo, pois tratava-se de uma situação de mistura de lotes de sementes, onde a planta utilizada não expressou a toxina Vip3Aa20.

As larvas sobreviventes aos biensaios foram contabilizadas e individualmente alimentadas com dieta artificial até que atingissem o estádio pupa, como descrito por Yang et al. (2017). As pupas foram coletadas e mantidas individualizadas em copos plásticos transparentes de 100 ml até a emergência dos adultos. Os adultos emergidos foram contabilizados e então indivíduos de diferentes isofamílias de uma mesma região, com emergência próxima, foram colocados juntos em uma única gaiola, para acasalamento e oviposição. A progênie oriunda dos indivíduos F2 sobreviventes foi exposta à toxina Vip3A20 através da oferta de tecido foliar fresco de milho Formula Viptera™. Em caso de alta % de sobrevivência das larvas F3, haveria um indicativo de resistência à Vip3Aa20 destes indivíduos. Larvas F3 sobreviventes à exposição à toxina foram recuperadas e transferidas individualmente para copos plásticos transparentes de 100 ml contendo dieta artificial.

A estimativa da frequência de alelos r para cada local coletado foi obtida através da fórmula proposta por Andow e Alstad (1998):

$$E[p] = \frac{S + 1}{((2 + Ntotal) \times 4)}$$

onde *p* corresponde à frequência estimada de alelos da resistência, S (sucess) é o número de isofamílias positivas, Ntotal é o número de isofamílias testadas. O intervalo de confiança (IC) foi de 95%.

3.4. Manutenção de linhagens suscetível e resistente à toxina Vip3Aa20

A partir de larvas F3 sobreviventes à exposição à Vip3Aa20, iniciou-se a formação de colônias em condições laboratoriais das diferentes regiões coletadas. A cada três ciclos completos alimentando larvas em dieta artificial, a próxima geração era novamente exposta à Vip3Aa20 oferecendo tecido foliar fresco de milho Agrisure® Viptera™. As ofertas de tecido foliar foram realizadas em copos plásticos de 500 ml preparados com mistura de agar-água a 3% ao fundo e papel filtro separando a mistura não-geleificada do pedaço de tecido foliar fresco, este de aproximadamente

50 cm2. Dez copos foram preparados e quarenta neonatas (~ 12 h após eclosão) foram transferidas por copo. As larvas permaneceram nos copos alimentadas com tecido foliar fresco expressando Vip3Aa20 até atingirem o 3º instar. O pedaço de tecido foliar foi substituído a cada dois dias. Os indivíduos sobreviventes foram recuperados e transferidos individualmente para copos de 100 ml contendo dieta artificial, permanecendo até a fase de pupa.

O híbrido de milho Formula Viptera™ foi constantemente cultivado em casa de vegetação, retirando-se o terço superior das plantas em V5-V7 para cada exposição das colônias à toxina. Amostras de tecido foliar foram submetidas ao teste qualitativo de detecção de Vip3Aa20 para confirmação de presença.

A linhagem suscetível, mantida em condições laboratoriais por mais de dez anos livre da pressão de inseticidas químicos e de proteínas Bt, tinha como fonte alimentar a dieta artificial proposta por Kasten Jr. et al. (1978). As linhagens suscetível e resistente foram mantidas em condições controladas de temperatura 27 ± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 horas.

A linhagem resistente à Vip3Aa20 selecionada a partir do F2 Screen da amostra coletada em Lucas do Rio Verde-MT, denominada LRV-MT Vip-R, foi utilizada nos estudos de demonstração fenotípica da resistência, história de vida para investigação de custo adaptativo associado à resistência e impacto de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo associado à resistência.

3.5. Demonstração de resistência fenotípica

O estudo da sobrevivência e produção de progênie viável através da exposição de linhagens de *S. frugiperda* que carregam o alelo da resistência à Vip3Aa20, objetivando demonstrar a resistência fenotípica, foi conduzido em laboratório. Plantas de milho Viptera™ e seu isogênico não-Bt cultivadas em casa de vegetação foram a fonte de tecido foliar fresco para a realização dos bioensaios. As linhagens estudadas foram: 1-linhagem resistente à Vip3Aa20 (**LRV-MT Vip-R**); 2- linhagem suscetível mantida > 10 anos em laboratório (**SUS**); 3- linhagem heterozigótica oriunda de cruzamento recíproco entre LRV-MT Vip-R♀ e SUS♂ [(**LRV-MT Vip-R♀ × SUS♂ (RS-1**)]; 4- linhagem heterozigótica oriunda de cruzamento recíproco entre LRV-MT Vip-R♂ e SUS♀ [(**LRV-MT Vip-R♂ × SUS♀ (RS-2)**]. LRV-MT Vip-R foi mantida em condições laboratoriais por 24 gerações, das quais 6 gerações foram expostas à Vip3Aa20 através da oferta de tecido foliar fresco expressando a toxina. Para realizar os cruzamentos recíprocos a fim de obter as linhagens heterozigóticas, 40 pupas fêmeas e 40 pupas machos de cada uma das linhagens parentais foram separadas. Com o início da emergência dos adultos, iniciaram-se os cruzamentos recíprocos de acordo com figura 3. Os cruzamentos foram realizados em gaiolas cilíndricas de material PVC (20 cm de altura × 14,5 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite, forradas ao fundo com papel filtro cilíndrico e vedadas na parte superior com um tecido voil. Para a obtenção de cada linhagem heterozigótica, foi destinada uma gaiola contendo 20 casais.

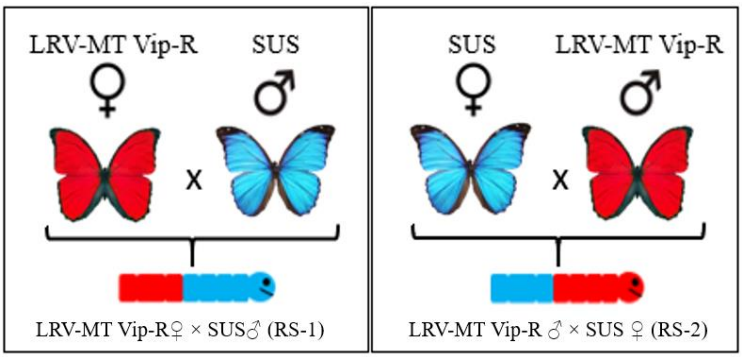

Figura 3. Esquema de cruzamentos recíprocos entre linhagem resistente LRV-MT Vip-R e linhagem suscetível de referência para obtenção de linhagens heterozigóticas LRV-MT Vip-R♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT Vip-R♂ x SUS♀ (RS-2).

Tabela 3. Descrição de tratamentos do estudo de demonstração fenotípica da resistência de linhagem *S. frugiperda* oriunda de campo e selecionada em laboratório para resistência à Vip3Aa20.

Tratamento	Linhagem	Material vegetal
1	LRV-MT Vip-R	Milho Agrisure® Viptera™
2	LRV-MT Vip-R	Milho Não-Bt (isogênico)
3	SUS	Milho Agrisure® Viptera™
4	SUS	Milho Não-Bt (isogênico)
5	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Milho Agrisure® Viptera™
6	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Milho Não-Bt (isogênico)
7	LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2)	Milho Agrisure® Viptera™
8	LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2)	Milho Não-Bt (isogênico)

O híbrido de milho Formula Viptera™ e o seu isogênico não-Bt foram cultivados em casa de vegetação em vasos plásticos de cinco litros, seguindo as mesmas diretrizes da produção de plantas para o F2 Screen. Tecido foliar fresco foi extraído do terço superior das plantas de milho nos estádios V5-V7 para montagem do bioensaio. Bandejas plásticas de 42 células, cada célula com dimensões de 4 cm x 4,3 cm x 2,1 cm (DPLASTIC TERMOFORMAGEM IND. E COM. DE PLÁSTICOS LTDA ME), foram preparadas com uma mistura agar-água (3%), papel filtro e um pedaço de ~ 4 cm2 de tecido foliar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 8 repetições, cada repetição infestada com 21 neonatas, totalizando 168 neonatas/tratamento. A infestação foi realizada com neonatas de ~ 12 h após eclosão, com o uso de um pincel de cerdas finas, sendo 1 neonata por célula. As bandejas permaneceram em sala climatizada nas condições de temperatura 27 ± 2°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 horas. Durante o período larval, o tecido foliar específico do tratamento foi reposto a cada 48 h, até que os indivíduos atingissem o estádio de pré-pupa.

Cada tratamento teve os seguintes parâmetros biológicos avaliados: sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto, razão sexual, longevidade de fêmeas e machos adultos, período de oviposição, fecundidade (número de ovos fêmea-1) total e diária. A viabilidade de ovos foi calculada com base no número de neonatas eclodidas em relação ao número de ovos. A viabilidade de pupas e adultos foram calculadas com base no número de neonatas infestadas. Foram formados 20 casais de adultos por tratamento, cada

casal colocado em uma gaiola confeccionada com copo plástico transparente de 500 ml e fundo de placa de Petri de acrílico forrada com papel filtro, contendo algodão embebido em solução açucarada em um copo plástico de 50 ml cortado ao meio. Os casais foram utilizados para avaliar a longevidade de fêmeas, período de oviposição, número de ovos por fêmea. As massas de ovos de cada casal foram coletadas diariamente, e então os ovos eram contabilizados através de um estereoscópio lupa binocular. A segunda e terceira postura de cada casal foram guardadas após a contagem de ovos, acondicionadas separadamente em placas de Petri com papel filtro umedecido, permanecendo em sala climatizada (temperatura 27 ± 2°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 horas) até que a eclosão de neonatas finalizasse.

Os parâmetros biológicos foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para confirmar a pressuposição de distribuição normal dos resíduos e ao teste de Barlett para confirmar a pressuposição de homogeneidade das variâncias. Quando recomendado pelo programa estatístico, transformações dos dados foram aplicadas. Os dados destes parâmetros foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (P<0,05). O programa estatístico utilizado foi SASM-Agri (Sistema para Análise e separação de Médias em Experimentos Agrícolas) - versão 8.2.

3.6. Estudo de história de vida de *S. frugiperda* para investigação de custo adaptativo associado à resistência à Vip3Aa20

A investigação de custo adaptativo associado à resistência foi conduzida em laboratório ofertando tecido foliar fresco do híbrido Formula não-Bt para as seguintes linhagens: 1- LRV-MT Vip-R; 2- SUS; 3- LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1); 4- progênie LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2). As linhagens heterozigotas foram obtidas por meio de cruzamento recíprocos citados acima (item 3.5). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, seguindo as diretrizes dos itens prévios. Bandejas de 42 células foram preparadas de acordo com item 3.5. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições, cada repetição infestada com 42 neonatas (n= 4 x 42 = 168). A infestação foi realizada com neonatas de ~ 12 h após eclosão, sendo 1 neonata por célula, com o uso de um pincel de cerdas finas. Cada célula recebeu identificação no momento da infestação garantindo rastreabilidade de cada indivíduo ao longo do ciclo. As bandejas permaneceram em sala climatizada nas condições de temperatura 27 ± 2°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 horas. Durante o período larval, a cada 48 h foi realizada a reposição de tecido foliar fresco de milho não-Bt.

Cada tratamento teve os seguintes parâmetros biológicos avaliados: sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto, peso de pupas, razão sexual, longevidade de fêmeas adultas, período de oviposição, fecundidade (número de ovos fêmea-1) total e diária. A viabilidade de ovos, pupas e adultos foram calculadas de acordo com o exposto no item 3.5. As pupas foram pesadas individualmente com 24 h de idade. A partir da detecção da primeira pupa, as bandejas foram vistoriadas diariamente. Foram formados 20 casais de adultos por tratamento, de acordo com método explicado no item 3.5. Os casais foram utilizados para avaliar a longevidade de fêmeas, período de oviposição, número de ovos por fêmea.

Os parâmetros biológicos foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para confirmar a pressuposição de distribuição normal dos resíduos e ao teste de Barlett para confirmar a pressuposição de homogeneidade das variâncias. Transformações dos dados foram aplicadas somente quando indicado. Os dados destes

parâmetros foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (P<0,05). As análises estatísticas foram realizadas no programa R v. 3.5.1 (R Core Team, 2018).

3.7. Efeito de ciantraniliprole em TS na magnitude e/ou dominância de custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20

A investigação do efeito do inseticida químico ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa20 foi realizada por meio de três metodologias:

- Metodologia I: oferta, em laboratório, de tecido foliar fresco extraído de plantas com idade de 15 DAE cultivadas em casa de vegetação;
- Metodologia II: infestação de plantas com idade de 15 DAE em vasos, cultivadas em casa de vegetação, durante 6 dias e posterior oferta de tecido foliar fresco até atingir fase de pupa em laboratório;
- Metodologia III: oferta, em laboratório, de tecido foliar fresco extraído de plantas com idade de 21 DAE cultivadas em casa de vegetação.

3.7.1. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da oferta de tecido foliar fresco extraído de plantas com 15 DAE em laboratório- Metodologia I

Na metodologia I, a história de vida de três linhagens foi estudada para investigação da ocorrência de custo adaptativo associado à resistência à Vip3Aa20. As linhagens foram: 1- LRV-MT Vip-R; 2- SUS; 3- LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1). O bioensaio foi inicialmente conduzido em bandejas plásticas, onde as larvas foram alimentadas com tecido foliar fresco extraído de plantas de milho não-Bt com 15 DAE, provenientes de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas, de acordo com o tratamento. Posteriormente, pupas e adultos foram avaliados em diversos parâmetros biológicos.

A linhagem LRV-MT Vip-R foi mantida em condições laboratoriais por ~ 24 gerações, das quais 6 gerações foram expostas a tecido foliar fresco expressando Vip3Aa20. Os indivíduos da primeira geração após a 6ª seleção massal desta linhagem foram utilizados no presente estudo. Para a obtenção da linhagem heterozigótica LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1), pupas fêmeas da geração sobrevivente à 6ª seleção massal de LRV-MT Vip-R foram separadas e com a emergência das fêmeas, cruzamentos com machos da linhagem SUS foram organizados. A progênie heterozigótica oriunda deste cruzamento, foi utilizada para infestação do bioensaio.

Tabela 4. Descrição de tratamentos da investigação do efeito de Fortenza 600FS® em TS de milho não-Bt na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20- Metodologia I.

Tratamento	Linhagem	Tratamento de sementes
1	LRV-MT Vip-R	Fortenza 600FS®
2	LRV-MT Vip-R	Sem tratamento
3	SUS	Fortenza 600FS®
4	SUS	Sem tratamento
5	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Fortenza 600FS®
6	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Sem tratamento

Determinado número de sementes do híbrido de milho Formula não-Bt recebeu tratamento com o inseticida químico Fortenza 600FS®, de acordo com especificação descrita na tabela 5. Vasos plásticos de cinco litros, contendo mistura homogeneizada de terra, areia e substrato de casca de pinus (proporção 1:1:1), com adição de adubo na formulação 04-14-08, receberam uma semente cada. Metade dos vasos foi semeada com sementes não-tratadas e a outra metade semeada com sementes tratadas. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, recebendo irrigação e nutrição conforme necessidade e homogeneamente. Ao atingirem 15 DAE, as plantas foram coletadas e destinadas à preparação do bioensaio, conduzido em laboratório. As plantas encontravam-se no estádio fenológico V3. Todas as folhas das plantas utilizadas foram coletadas para a montagem das bandejas, devido ao pequeno porte que se encontravam no referido estágio de desenvolvimento vegetativo.

Bandejas plásticas de 42 células foram preparadas seguindo as diretrizes do item 3.5. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 30 repetições, cada repetição infestada com 21 neonatas, totalizando 630 neonatas/tratamento. A infestação foi realizada com neonatas de ~ 12 h após eclosão, com o uso de um pincel de cerdas finas, sendo 1 neonata por célula. As bandejas permaneceram em sala climatizada nas condições de temperatura 27 ± 2°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 horas. Durante o período larval, o tecido foliar específico do tratamento foi reposto a cada 48 h. Como todos os vasos foram semeados no mesmo período, a concentração do ingrediente ativo ciantraniliprole foi decrescendo no tecido foliar tratado (extraído de plantas oriundas de sementes tratadas) ofertado nas reposições.

Tabela 5. Produto fitossanitário registrado para tratamento de sementes na cultura do milho para controle de larvas de *S. frugiperda*. Informações contidas na bula do titular do registro Syngenta Proteção de Cultivos LTDA.

Produto comercial	Ingrediente ativo	Grupo químico	Concentração	Dose	
			g i.a./L[1]	g i.a./ 60.000 sementes[2]	ml p.c./ 60.000 sementes[3]
Fortenza 600FS®	Ciantraniliprole	Antranilamida	600	24	40

[1]Concentração do ingrediente ativo em gramas por litro de produto comercial; [2]Concentração do ingrediente ativo em gramas por hectare; [3]Dose do produto comercial por hectare.

Cada tratamento teve os seguintes parâmetros biológicos avaliados: sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto, razão sexual, longevidade de fêmeas adultas, período de oviposição, fecundidade (número de ovos fêmea-1) total e diária. A viabilidade de ovos, pupas e adultos foram calculadas de acordo com o exposto no item 3.5. Foram formados 20 casais de adultos por tratamento, de acordo com método explicado no item 3.5. Os casais foram utilizados para avaliar a longevidade de fêmeas, período de oviposição, número de ovos por fêmea.

Todos os parâmetros biológicos foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para confirmar a pressuposição de distribuição normal dos resíduos e ao teste de Levene para confirmar a pressuposição de homogeneidade das variâncias. Para os parâmetros viabilidade de ovos, sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, viabilidade de pupas, viabilidade de ovo-adulto, duração do período de pupa, número de ovos.fêmea.dia-1 foram submetidos à transformação Box-Cox (λ), garantindo aproximação da distribuição normal e variância constante. A apresentação em tabelas e gráficos se refere aos dados não transformados. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ($P<0,05$). As análises estatísticas foram realizadas em JMP versão 15 (SAS Institute Inc., 2019).

3.7.2. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da infestação de plantas com idade de 15 DAE em casa de vegetação- Metodologia II

As linhagens propostas a serem estudadas foram: 1- LRV-MT Vip-R); 2- SUS; 3- LRV-MT Vip-R♀ × SUS♂ (RS-1); 4- LRV-MT Vip-R♂ × SUS♀ (RS-2). Plantas de milho não-Bt, cultivadas em casa de vegetação até a idade de 15DAE, estágio de desenvolvimento fenológico V3, foram infestadas com neonatas; posteriormente os indivíduos sobreviventes seriam transferidos para bandejas plásticas, alimentados com tecido foliar fresco oriundo de plantas de milho não-Bt sem TS, mantidos em condições laboratoriais.

A linhagem LRV-MT Vip-R foi mantida em condições laboratoriais por ~ 28 gerações, das quais 7 gerações foram expostas a tecido foliar fresco expressando Vip3Aa20. Os indivíduos da terceira geração após a 7ª seleção massal desta linhagem foram utilizados neste estudo. Para a obtenção das linhagens heterozigóticas, pupas da segunda geração após a seleção massal de LRV-MT Vip-R foram separadas de acordo com o gênero. Com a emergência dos adultos, cruzamentos recíprocos com a linhagem SUS foram organizados, de acordo com esquema citado em item anterior. As progênies oriundas destes cruzamentos -LRV-MT Vip-R♀ × SUS♂ (RS-1) e LRV-MT Vip-R♂ × SUS♀ (RS-2) - foram utilizadas para infestação das plantas deste estudo, bem como LRV-MT Vip e SUS

Tabela 6. Descrição de tratamentos da investigação do impacto do inseticida químico ciantraniliprole em TS de milho não-Bt na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20- Metodologia II.

Tratamento	Linhagem	Tratamento de sementes
1	LRV-MT Vip-R	Fortenza 600FS®
2	LRV-MT Vip-R	Sem tratamento
3	SUS	Fortenza 600FS®
4	SUS	Sem tratamento
5	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Fortenza 600FS®
6	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Sem tratamento
7	LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2)	Fortenza 600FS®
8	LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2)	Sem tratamento

Um total de 432 vasos plásticos de volume 4,5 litros foram enchidos com uma mistura homogênea de terra, areia e substrato de casca de pinus (proporção 2:1:1), com adição de adubo na formulação 04-14-08. Deste total, 216 vasos foram semeados com o objetivo de executar a primeira etapa da metodologia II, sendo a infestação das plantas com 15DAE em casa de vegetação com as linhagens LRV-MT, SUS e linhagens heterozigóticas. Os outros 216 vasos foram semeados com sementes do híbrido de milho Formula não-Bt sem tratamento de sementes, sendo que as plantas obtidas seriam utilizadas para alimentar as larvas na segunda etapa do presente estudo, caracterizada pela condução dos indivíduos, sobreviventes à primeira etapa, em bandejas para avaliação de diversos parâmetros biológicos de desenvolvimento e fertilidade, em condições ambientais.

Para a primeira etapa do estudo, metade dos vasos foi semeada com o híbrido de milho Formula não-Bt tratado com Fortenza 600FS® e a outra metade semeada com mesmo híbrido sem tratamento de sementes. Os vasos receberam apenas uma semente cada. A data da semeadura foi calculada para que ocorresse sincronismo entre a data que as plantas atingissem 15 dias de idade após a emergência de plântulas e a eclosão das neonatas das 04 linhagens, possibilitando assim a infestação de plantas com 15 DAE. O delineamento experimental foi blocos casualizados, com 9 repetições e 3 sub-repetições. Cada planta foi infestada com 10 neonatas com ~12 horas após eclosão (n= 9 x 3 x 10 = 270). A recuperação de larvas sobreviventes e contabilização destas foi realizada no sexto dia após infestação (6 DAI), quando as plantas atingiram 21 DAE.

Para a condução da segunda etapa, 21 larvas sobreviventes de cada repetição da etapa em casa de vegetação (n= 9 x 21 = 189) deveriam ser transferidas para bandejas de 42 células (1 bandeja = 2 repetições) previamente preparadas. Entretanto, para as quatro linhagens, o número de indivíduos sobreviventes foi muito baixo em plantas de milho provenientes de sementes tradadas com Fortenza 600FS®. Nas condições do teste, as plantas com idade de 15 DAE ainda apresentavam concentração de ciantraniliprole suficiente para causar mortalidade na maioria das larvas. Não foi possível prosseguir com a investigação para determinar se Fortenza 600FS® impactaria na expressão do custo

associado à resistência à Vip3Aa20 nas condições dadas. De acordo com as circunstâncias, a única avaliação possível de ser realizada foi a sobrevivência larval aos 6 DAI.

Figura 4. Estudo em casa de vegetação para investigação do efeito de Fortenza 600FS® no custo adaptativo de *S. frugiperda* resistente à Vip3Aa20- Metodologia II. A- Planta de milho com idade de 15 DAE, em estágio fenológico V3. B- Plantas de milho após infestação

3.7.3. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da oferta de tecido foliar fresco extraído de plantas com 21 DAE em laboratório- Metodologia III

Na metodologia III, investigou-se a história de vida de quatro linhagens alimentadas com tecido foliar fresco de milho não-Bt com presença e ausência do ingrediente ativo ciantraniliprole, em condições laboratoriais. As linhagens estudadas foram: 1- LRV-MT Vip-R; 2- SUS; 3- LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1); 4- LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2). A linhagem LRV-MT Vip-R foi mantida em condições laboratoriais por ~ 30 gerações, das quais 8 gerações foram expostas a tecido foliar fresco expressando Vip3Aa20. Os indivíduos da segunda geração após a 8ª seleção massal desta linhagem foram utilizados no estudo de infestação de plantas. Para a obtenção das linhagens heterozigóticas RS-1 e RS-2, pupas da primeira geração após a seleção massal de LRV-MT Vip-R foram separadas de acordo com o gênero. Com a emergência dos adultos, cruzamentos recíprocos com a linhagem SUS foram realizados. As progênies oriundas destes cruzamentos- LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2) - foram utilizadas para infestação das plantas deste estudo.

Tabela 7. Descrição de tratamentos do estudo investigação do impacto do inseticida químico ciantraniliprole em TS de milho não-Bt na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20- Metodologia III

Tratamento	Linhagem	Tratamento de sementes
1	LRV-MT Vip-R	Fortenza 600FS®
2	LRV-MT Vip-R	Sem tratamento
3	SUS	Fortenza 600FS®
4	SUS	Sem tratamento
5	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Fortenza 600FS®
6	LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1)	Sem tratamento
7	LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2)	Fortenza 600FS®
8	LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2)	Sem tratamento

A condução do bioensaio foi realizada em bandejas plásticas, alimentando as larvas com tecido foliar fresco extraído de plantas de milho não-Bt com 21 DAE, provenientes de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas, de acordo com o tratamento. Posteriormente, pupas e adultos foram avaliados em diversos parâmetros biológicos.

Vasos plásticos de sete litros, contendo mistura homogeneizada de terra, areia e substrato de casca de pinus (proporção 1:1:1), com adição de adubo na formulação 04-14-08, receberam uma semente cada. Metade dos vasos foi semeada com sementes do híbrido de milho Formula não-tratadas e a outra metade semeada com sementes do mesmo híbrido tratadas com o inseticida químico Fortenza 600FS®, de acordo com especificação descrita na tabela 2. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, recebendo irrigação e nutrição conforme necessidade e homogeneamente. Ao atingirem 21 DAE, estádio fenológico V5, as plantas foram coletadas e destinadas à preparação do bioensaio, conduzido em laboratório.

Bandejas plásticas de 42 células foram preparadas previamente, de acordo com as diretrizes dos bioensaios anteriores. Neste estudo, somente o cartucho e folha adjacente não expandida das plantas de milho foram utilizados como fonte de tecido foliar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 8 repetições, cada repetição infestada com 21 neonatas (n= 8 x 21 = 168). A infestação foi realizada com neonatas de ~ 12 h após eclosão, com o uso de um pincel de cerdas finas, sendo 1 neonata por célula. As bandejas permaneceram em sala climatizada nas condições de temperatura 27 ± 2°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 horas. O pedaço de tecido foliar inicialmente ofertado permaneceu na bandeja por 7 dias, sendo então colocado um novo pedaço proveniente de milho não-Bt sem tratamento de sementes, para todos os indivíduos sobreviventes do estudo. A partir disso, até o final do período larval, o tecido foliar foi reposto a cada 48 h.

Cada tratamento teve os seguintes parâmetros biológicos avaliados: sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, duração e viabilidade das fases de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto, razão sexual, longevidade de fêmeas e machos adultos, período de oviposição, fecundidade (número de ovos fêmea-1) total e diária. As diretrizes das avaliações estão

expostas no item 3.5. A expectativa seria formar 22 casais de adultos por tratamento; entretanto, alguns tratamentos tiveram significativa mortalidade larval, impossibilitando a formação do total de casais. Os casais formados foram utilizados para avaliar a longevidade de fêmeas e machos, período de oviposição, número de ovos por fêmea. Os casais foram observados para detectar e documentar deformações morfológicas visuais. A porcentagem de adultos deformados foi calculada com base no total de adultos utilizados na formação de casais de cada tratamento.

Os parâmetros foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para confirmar a pressuposição de distribuição normal dos resíduos e ao teste de Barlett para confirmar a pressuposição de homogeneidade das variâncias. Quando recomendado pelo programa estatístico, transformações dos dados foram aplicadas. Os dados destes parâmetros foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($P<0,05$). O programa estatístico utilizado foi SASM-Agri (Sistema para Análise e separação de Médias em Experimentos Agrícolas) - versão 8.2.

4. RESULTADOS

4.1. Frequência alélica da resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa20

Utilizando-se o método F2 *Screen*, 402 isofamílias foram estabelecidas e submetidas ao *screening* com tecido foliar fresco expressando Vip3Aa20, com os objetivos de estimar a frequência alélica da resistência a esta toxina nos locais coletados e de selecionar linhagens resistentes. As isofamílias do F2 *Screen* que originaram adultos F2 sobreviventes foram denominadas isofamílias positivas, significando serem potenciais carreadoras do alelo da resistência à Vip3Aa20.

Tabela 8. Resultados do F2 *Screen* e estimativa da frequência de alelos da resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa20 em quatro regiões distintas do Brasil.

Local	Número de testados		Larvas sobreviventes	Adultos emergidos	Isofamílias positivas	Frequência alélica estimada	IC 95%
	Isofamílias	Larvas					
VZT-MG	103	12288	14	11	2	0,007743	0,0016-0,01864
LRV-MT	121	15488	16	9	4	0,010321	0,0034-0,0211
RV-GO	100	12800	28	7	1	0,004938	0,0006-0,01376

A progênie oriunda dos sobreviventes de CB-SP (geração F3) foi submetida à Vip3Aa20 através da oferta, durante 7 dias, de tecido foliar fresco expressando a toxina; entretanto, não foram detectados indivíduos sobreviventes, concluindo que os sobreviventes F2 ao *screening* foram falsos-positivos. Por esse motivo, a duração dos bioensaios passou de 7 para 14 dias para as outras três amostras.

A amostra de *S. frugiperda* coletada em Lucas do Rio Verde- MT apresentou um total de 16 larvas sobreviventes após 14 dias de alimentação em tecido foliar fresco oriundo de milho Viptera™, as quais foram transferidas para dieta artificial onde permaneceram até a fase de pupa. Ao final foram obtidos nove adultos, dos quais derivou-se a linhagem de *S. frugiperda* resistente à Vip3Aa20- LRV-MT Vip-R- utilizada nos estudos do presente projeto.

4.2. Demonstração da resistência fenotípica de *S. frugiperda* à Vip3Aa20

Diferenças significativas não foram detectadas na sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI da linhagem LRV-MT Vip-R ao se alimentar de tecido foliar extraído de milho Viptera™ e de seu isogênico não-Bt (figuras 5 e 6). As larvas das linhagens SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) não sobreviveram ao serem infestadas em tecido de milho Viptera™. Aos 14 DAI, nos tratamentos com tecido não-Bt, a sobrevivência larval das linhagens estudadas não diferiu significativamente; entretanto observou-se uma tendência de menor sobrevivência larval na linhagem resistente e maior sobrevivência larval na linhagem heterozigótica LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2).

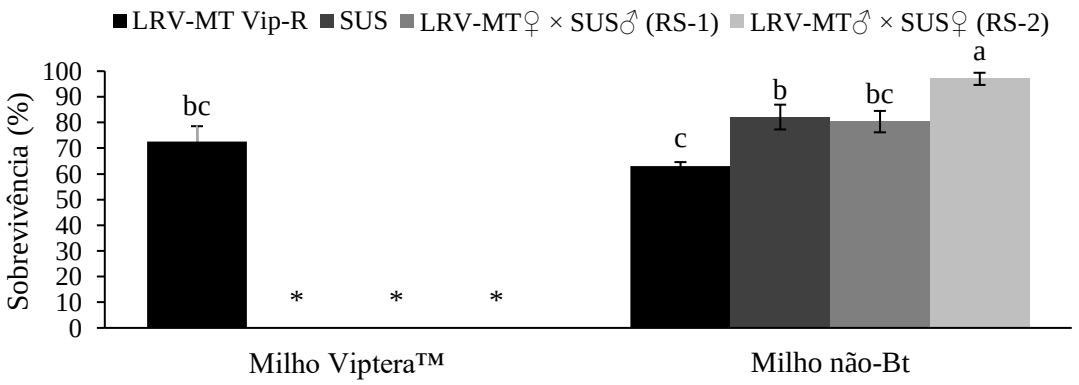

Figura 5. Sobrevivência (%) larval aos 7 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

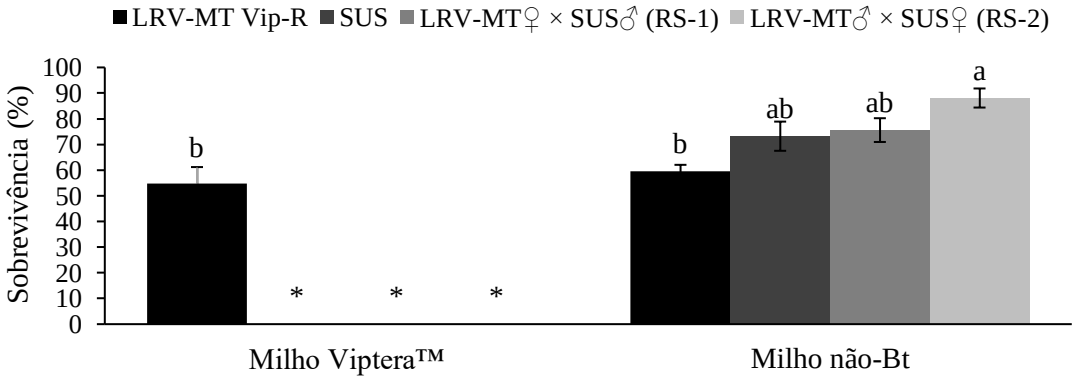

Figura 6. Sobrevivência (%) larval aos 14 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

A viabilidade de ovos das quatro linhagens não diferiu significativamente ao serem comparadas quando ofertado tecido de milho não-Bt (figura 7). A linhagem resistente não sofreu efeito significativo na viabilidade de ovos ao se alimentar de tecido Viptera™ em comparação à alimentação com tecido não-Bt.

A comparação feita entre a viabilidade de adultos da linhagem resistente ao ser ofertado tecido Viptera™ e tecido não-Bt não indicou diferença significativa. As comparações feitas entre as quatro linhagens, ao ofertar tecido não-Bt, indicaram que a viabilidade de adultos da linhagem heterozigótica LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) foi superior à viabilidade de adultos de SUS e LRV-MT Vip-R; a viabilidade de adultos das duas linhagens heterozigóticas não diferiu significativamente; a linhagem heterozigótica LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não indicou diferenças significativas na viabilidade de adultos em comparação à SUS e LRV-MT Vip-R.

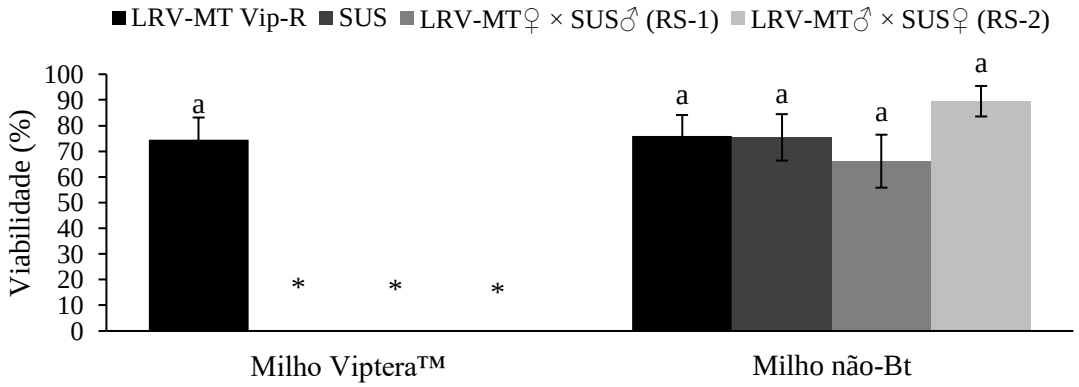

Figura 7. Viabilidade de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

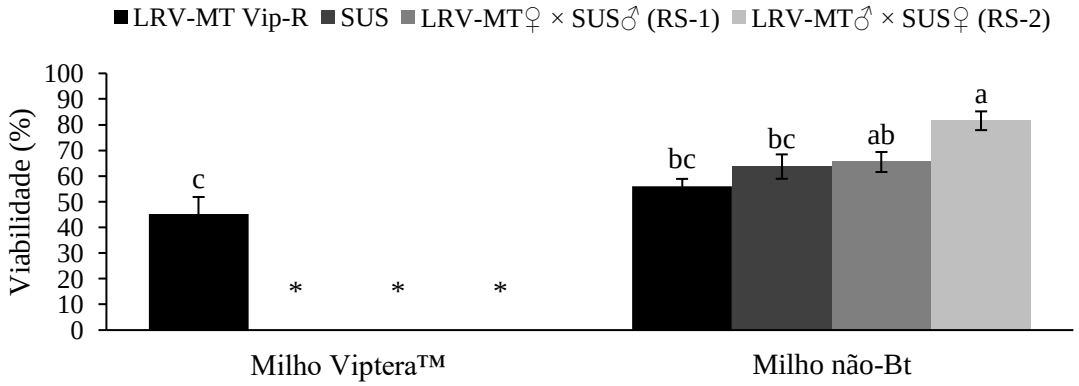

Figura 8. Viabilidade de pupas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

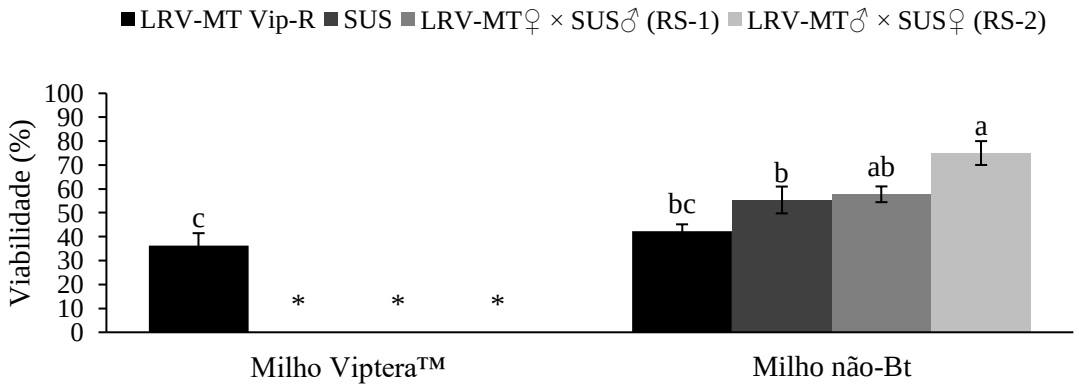

Figura 9. Viabilidade de adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

A duração da fase larval e do período ovo-adulto na linhagem resistente foram significativamente superiores ao ofertar tecido Viptera™ em comparação ao tecido não-Bt. O período ovo-adulto desta linhagem apresentou acréscimo de 5,8 dias. Ao ofertar milho não-Bt, as linhagens heterozigóticas não diferiram entre si para a duração da

fase larval e período ovo-adulto; ambas as durações foram inferiores em comparação à SUS, indicando que as linhagens heterozigóticas podem apresentar maior número de gerações em um determinado período. A linhagem resistente apresentou menor duração do período ovo-adulto em comparação à linhagem suscetível.

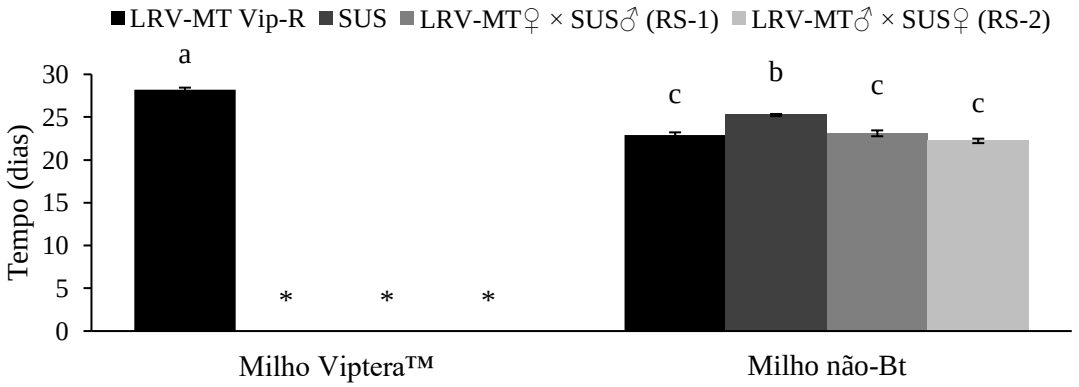

Figura 10. Duração da fase larval das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

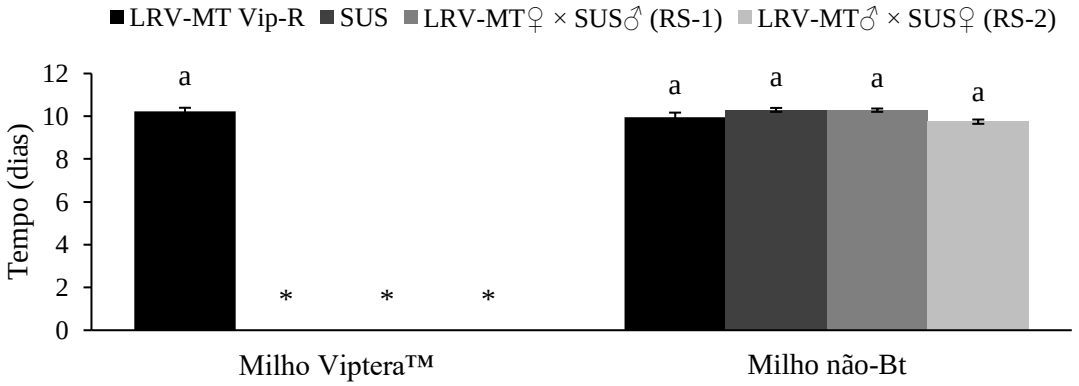

Figura 11. Duração da fase de pupa das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

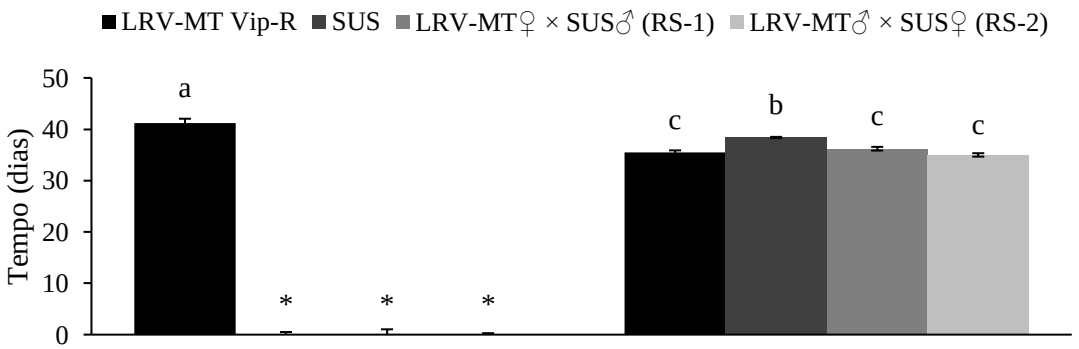

Figura 12. Duração do período ovo-adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

As taxas de fecundidade, período de oviposição e longevidade de machos não diferiram ao serem feitas comparações entre as linhagens alimentadas, quando ofertado tecido não-Bt. A longevidade de fêmeas resistentes foi negativamente afetada quando ofertado tecido Viptera™ em comparação ao tecido não-Bt, com redução de quatro dias. Ao comparar a longevidade de fêmeas das quatro linhagens ao serem alimentadas com tecido não-Bt, diferenças significativas não foram detectadas.

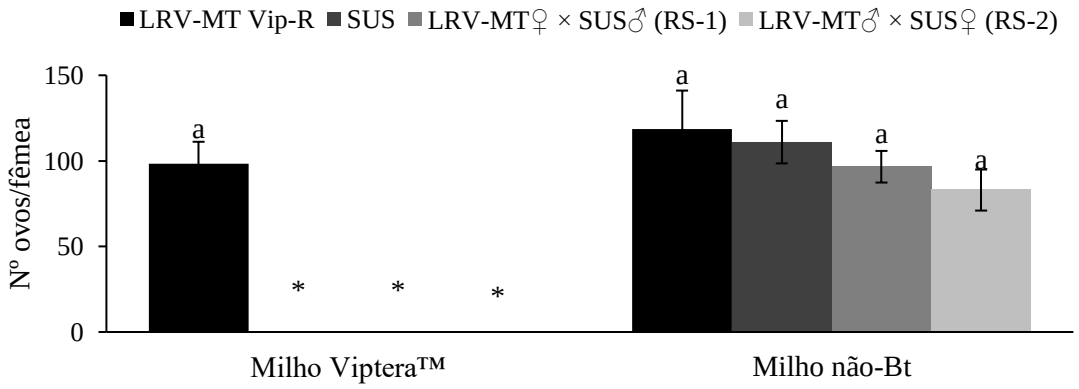

Figura 13. Fecundidade diária fêmea-1 das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

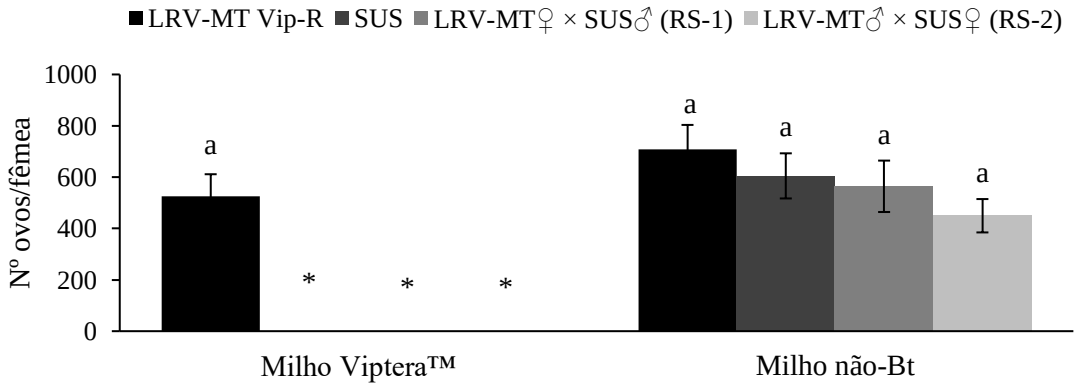

Figura 14. Fecundidade total fêmea-1 das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

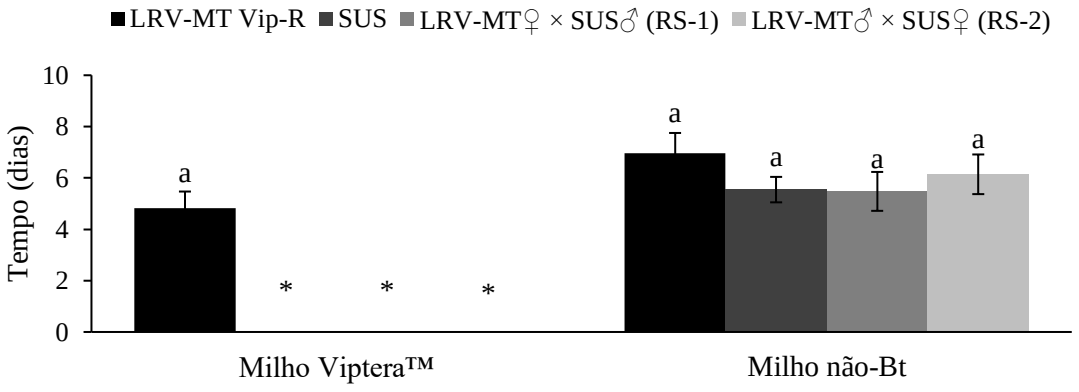

Figura 15. Período de oviposição das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

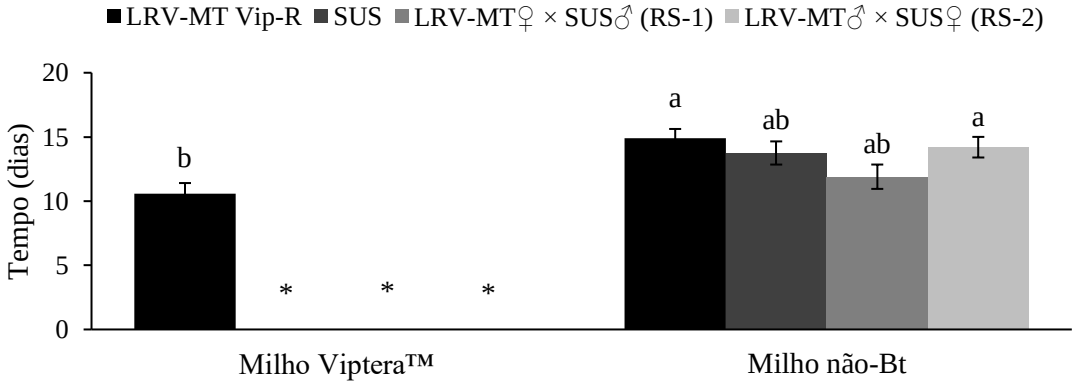

Figura 16. Longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

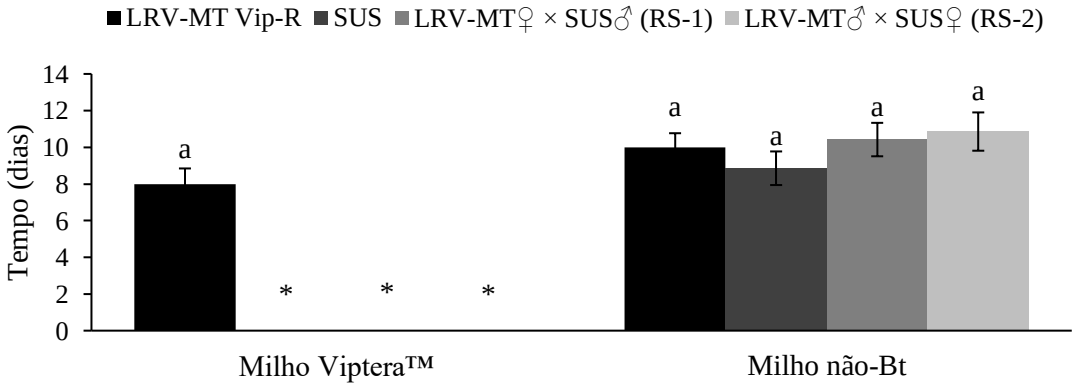

Figura 17. Longevidade de machos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de S. frugiperda em milho Viptera™ e milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes. * Dados excluídos da análise estatística devido à ausência de variabilidade

4.3. Investigação de custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20

Ao comparar a sobrevivência larval aos 7 DAI das linhagens alimentadas com milho não-Bt não foi detectada diferença estatística para este parâmetro; aos 14 DAI, os valores médios de sobrevivência larval de LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não se diferenciaram significativamente em comparação à SUS; entretanto, este parâmetro foi significativamente superior na linhagem LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) em comparação à SUS. A sobrevivência larval aos 14 DAI nas duas linhagens heterozigóticas foi significativamente superior à linhagem resistente (Tabela 9).

Diferença significativa não foi detectada na viabilidade de ovos entre as quatro linhagens alimentadas com milho não-Bt. Para a viabilidade de pupas e adultos, as linhagens heterozigóticas e resistente, em comparação à linhagem SUS, não apresentaram diferenças significativas. Observou-se valores médios significativamente inferiores na linhagem LRV-MT Vip-R em comparação à LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2). A viabilidade de pupas e adultos não se diferenciaram significativamente ao comparar as duas linhagens heterozigóticas (Tabela 9).

Tabela 9. Sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, viabilidade de ovos, pupas e adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ X SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ X SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt.

Linhagem	Sobrevivência (%)[a]		Viabilidade (%)[a]		
	Larva		Ovo	Pupa	Adulto
	7 DAI[b]	14 DAI[b]			
LRV-MT Vip-R	79,2±5,89 a	60,1± 5,00 c	68,8±8,29 a	47,0±3,64 b	40,4±3,71 b
SUS	85,1±4,36 a	70,2± 4,48 bc	68,4±10,29 a	62,5±4,26 ab	51,8±4,88 ab
LRV-MT♀× SUS♂ (RS-1)	90,5±4,31 a	83,3± 4,03 ab	80,5±6,59 a	69,1±5,01 ab	59,5±4,50 ab
LRV-MT♂× SUS♀ (RS-2)	95,2±2,69 a	88,1±5,55 a	92,9±1,06 a	70,8±8,27 a	66,6±8,34 a

[a]Valores representam média ±EP.
[b]Médias dentro da mesma coluna seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes.

A linhagem LRV-MT Vip-R apresentou duração das fases de larva, pupa e período ovo-adulto significativamente superior em comparação à SUS, indicando um possível custo adaptativo associado à resistência nestes parâmetros (Figura 18). Diferença significativa não foi detectada na duração da fase larval e período ovo-adulto ao comparar as linhagens SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1); entretanto, na duração da fase de pupa foi detectada diferença significativa entre essas duas linhagens, onde a duração desta fase em SUS foi inferior à LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), indicando um possível custo adaptativo. A duração da fase larval de LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) foi significativamente inferior à SUS; por outro lado, o contrário ocorreu para a duração da fase de pupa, pois a duração desta fase em LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) foi superior à SUS. Ao comparar a duração do período ovo-adulto destas duas linhagens, não foi detectada diferença significativa. Comparações da duração das fases de larva, pupa e período ovo-adulto entre as duas linhagens heterozigóticas não mostraram diferenças significativas, indicando similaridade no padrão de desenvolvimento das progênies heterozigóticas independente do parental transmissor do(s) alelo(s) da resistência. A duração da fase ovo-adulto da linhagem LRV-MT Vip-R foi significativamente superior em comparação às linhagens heterozigóticas.

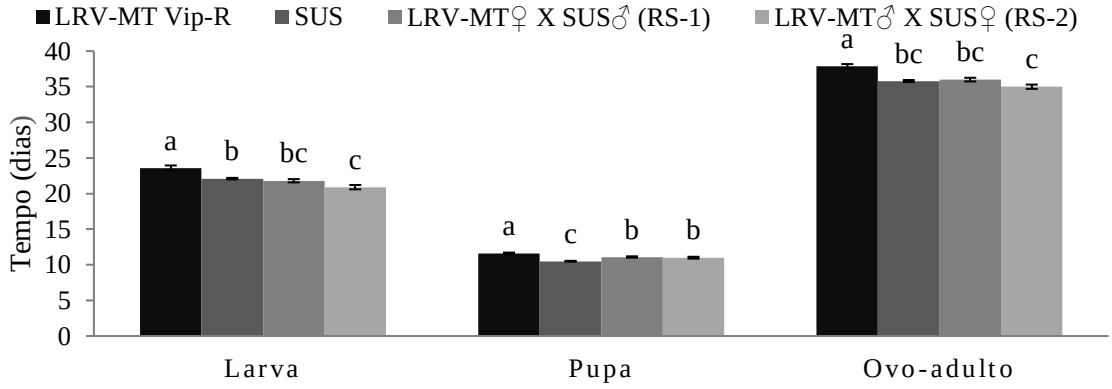

Figura 18. Duração das fases de larva, pupa, período ovo-adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes.

A linhagem SUS apresentou peso de pupas significativamente superior em comparação à linhagem LRV-MT Vip-R e às linhagens heterozigóticas (figura 19), possivelmente ocasionado pela submissão da linhagem SUS à exclusiva alimentação em dieta artificial ao longo de mais de dez anos ao ser mantida em condições laboratoriais.

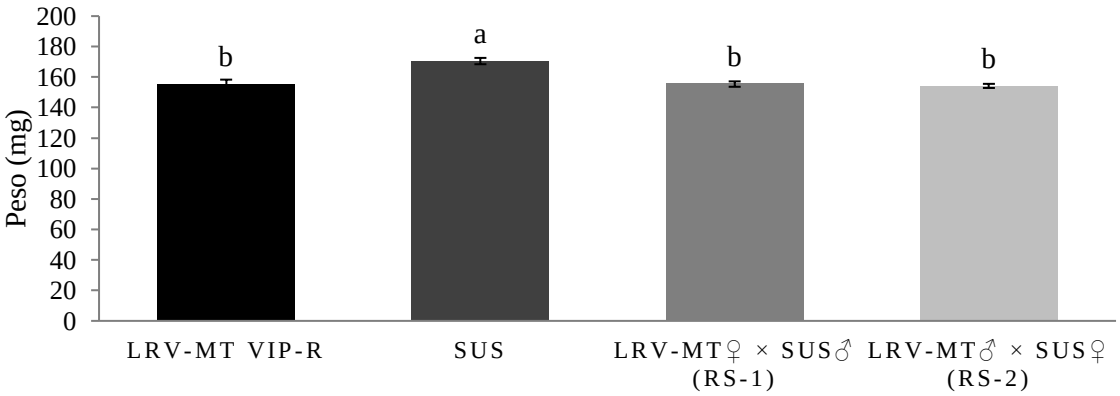

Figura 19. Peso de pupas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

Diferença significativa não foi detectada no parâmetro fecundidade diária fêmea^{-1} ao comparar as quatro linhagens. Para a fecundidade total fêmea^{-1}, as linhagens LRV-MT Vip-R, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) não apresentaram diferenças significativas ao serem comparadas com SUS. Ambos resultados sugerem possível ausência de custo adaptativo associado à resistência em relação à fecundidade das linhagens carreadoras de alelos *r*. Apesar da ausência de diferença significativa na fecundidade diária fêmea^{-1}, a fecundidade total fêmea^{-1} de LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) foi significativamente superior em comparação à LRV-MT Vip-R, sendo ovipositado, em valor médio, 30% mais ovos. Os valores observados do período de oviposição e longevidade de fêmeas não explicam a superioridade da fecundidade total fêmea^{-1} de LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) em relação à LRV-MT Vip-R, uma vez que as comparações destes dois parâmetros entre todas as linhagens não indicaram presença de diferenças significativas. É importante ressaltar que os resultados obtidos para fecundidade diária e total fêmea^{-1} precisam ser compreendidos juntamente com os resultados obtidos para a viabilidade de ovos, período de oviposição e longevidade de fêmeas adultas, uma vez que estes parâmetros são interligados e indicadores relevantes do potencial biológico das linhagens estudadas.

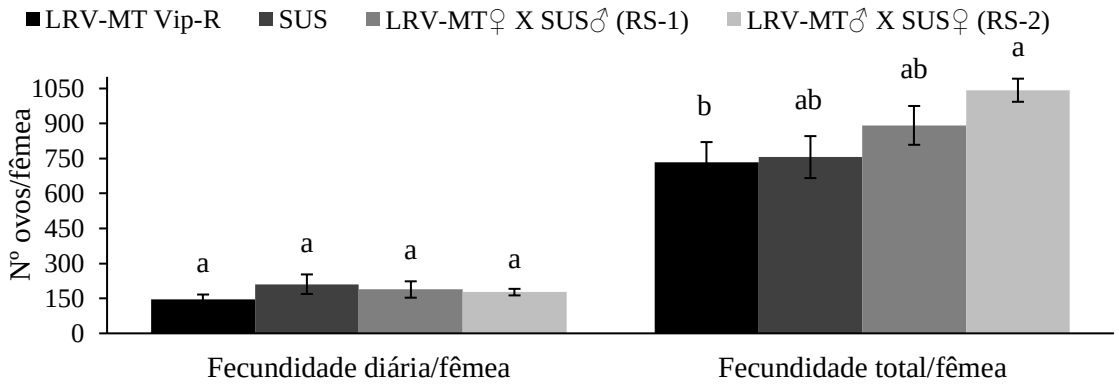

Figura 20. Fecundidade diária. fêmea^{-1} e fecundidade total fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes.

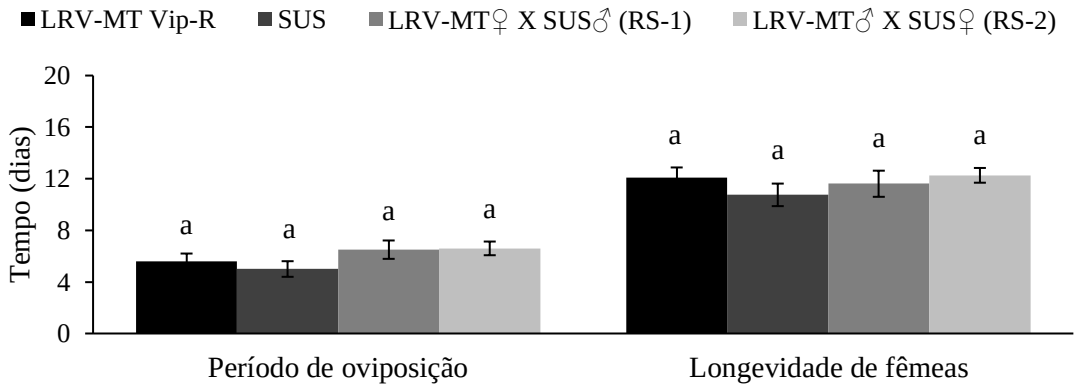

Figura 21. Período de oviposição e longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ × SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

4.4. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da oferta de tecido foliar fresco extraído de plantas com 15 DAE em laboratório- Metodologia I

A linhagem LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não apresentou diferença significativa na sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI comparando o efeito da oferta de tecido foliar oriundo de sementes tratadas e não tratadas com Fortenza 600FS®. Para a linhagem SUS foram detectadas diferenças significativas neste parâmetro para as duas datas avaliadas: menor sobrevivência larval quando a linhagem foi alimentada com tecido foliar proveniente de sementes tratadas, indicando que a concentração do ingrediente ativo ciantraniliprole no tecido foliar de idade de 15 DAE foi suficiente para incrementar a mortalidade larval em aproximadamente 20 % em ambas as datas de avaliação. Diferenças significativas foram detectadas na sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI da linhagem LRV-MT Vip-R, sendo superior quando alimentada com tecido foliar oriundo de TS com Fortenza 600FS® em comparação ao tecido sem tratamento, em ambas as datas. Este resultado está em direção oposta aos possíveis resultados esperados, uma vez que a concentração de ciantraniliprole em plantas de milho aos 15 DAE possivelmente é suficiente para ocasionar baixa mortalidade larval, como ocorreu na linhagem SUS, ou não causar mortalidade, como ocorreu em LRV-MT♀ x SUS♂

(RS-1), mas não pode ser explicado o fato de promover incrementos na sobrevivência como ocorreu em LRV-MT Vip-R.

A comparação da sobrevivência larval aos 7 DAI das linhagens LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e SUS alimentadas com tecido tratado e tecido não tratado não mostrou diferença significativa. Isso não foi observado para a sobrevivência aos 14 DAI, pois ao se alimentarem de tecido não tratado, a linhagem SUS apresentou sobrevivência significativamente superior à LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) (em média, 14 % superior), e quando alimentadas com tecido oriundo de sementes tratadas não foi detectada diferença significativa. Este resultado sugere a possibilidade de que Fortenza 600FS® tenha promovido uma mudança na relação entre estas linhagens para este parâmetro nas condições do estudo. A explicação para tal mudança pode basear-se na ideia de que larvas SUS sejam mais sensíveis à concentração de ciantraniliprole em plantas aos 15 DAE em comparação a larvas heterozigóticas LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), ao serem alimentadas por 14 dias. Estas indicações são desfavoráveis do ponto de vista do MRI.

Ao comparar a sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI de SUS e LRV-MT Vip-R, observou-se uma inversão significativa na relação das linhagens de acordo com o tipo de tecido ofertado: ao serem alimentadas com tecido não tratado, a sobrevivência larval da linhagem suscetível foi superior à linhagem resistente, ocorrendo o contrário quando as larvas foram alimentadas com tecido tratado. O decréscimo na sobrevivência de SUS e o acréscimo em LRV-MT Vip-R, observados no tratamento com Fortenza 600FS® em comparação ao tratamento sem TS, promoveu esta mudança na relação entre as duas linhagens.

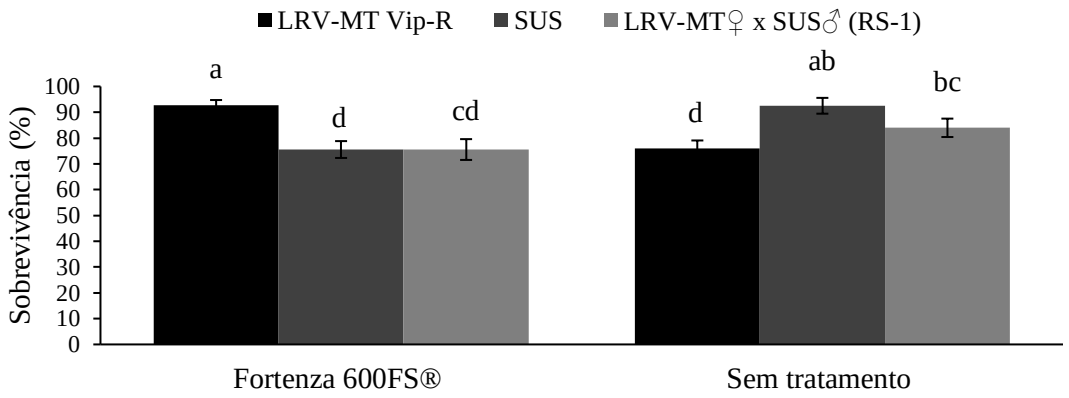

Figura 22. Sobrevivência (%) larval aos 7 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) não diferem significativamente

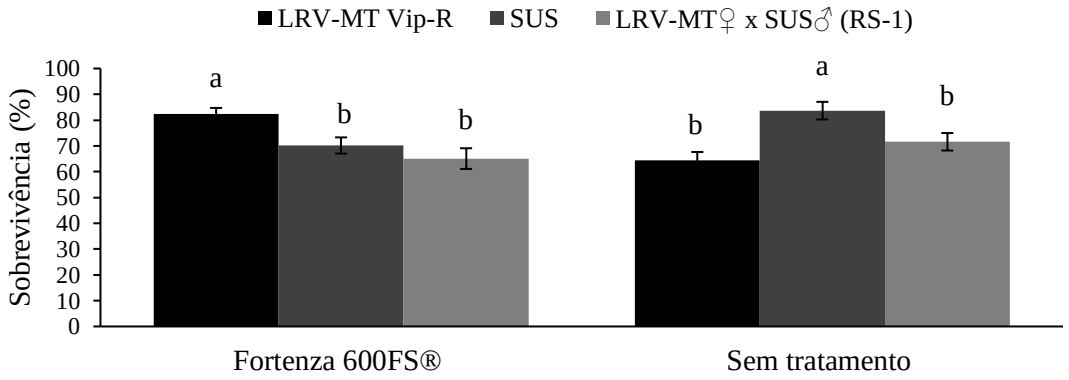

Figura 23. Sobrevivência (%) larval aos 14 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) não diferem significativamente

Ao analisar cada linhagem separadamente, alimentada com tecido tratado e com tecido sem tratamento, não foi detectada diferença significativa na viabilidade de ovos de nenhuma das três linhagens estudadas (figura 24). A viabilidade de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não apresentaram diferenças significativas ao serem comparadas à linhagem SUS em ambos tipos de tecido foliar ofertado, indicando possível ausência de efeito de Fortenza 600FS® na expressão de custo adaptativo para tal parâmetro. Ao comparar a viabilidade de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) foram detectadas diferenças significativas em ambos tipos de tecido foliar ofertado: os valores médios da linhagem heterozigótica foram aproximadamente 34 % superior em relação à linhagem homozigótica resistente em ambas situações, indicando ausência de efeito do inseticida na relação de proporcionalidade do parâmetro entre as duas linhagens carreadores de alelos *r*.

Assim como observado na sobrevivência larval, a viabilidade de pupas e adultos da linhagem LRV-MT Vip-R apresentram incrementos ao ofertar tecido tratado com Fortenza 600FS® em comparação ao tecido sem tratamento. Uma vez que sobreviveu maior número de larvas no tratamento com tecido tratado, manteve-se a tendência por todo o ciclo de desenvolvimento dos indivíduos. Para SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), analisadas separadamente com oferta de tecido tratado e com oferta de tecido sem tratamento, não foi detectada diferença significativa para viabilidade de pupas e adultos. Apesar da redução significativa na sobrevivência larval aos 14 DAI em SUS ao ofertar tecido tratado, ao final do ciclo de desenvolvimento a viabilidade dos indivíduos SUS não mostrou diferença significativa ao comparar a oferta de tecido com Fortenza 600FS® e sem TS. Ao comparar a viabilidade de pupas e adultos entre SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não foram detectadas diferenças significativas, independentemente do tipo tecido foliar ofertado. A indicação de que Fortenza 600FS® poderia afetar negativamente, do ponto de vista do MRI, a relação de produção de indivíduos suscetíveis e heterozigóticos, como observado em sobrevivência larval, não foi corroborada pelos resultados obtidos para viabilidade de pupas e adultos.

No estudo de investigação de custo adaptativo descrito no presente trabalho, ao comparar a viabilidade de pupas e adultos das linhagens SUS e LRV-MT Vip-R, ofertando tecido de milho não-Bt sem TS às larvas, não foram detectadas diferenças significativas. Já neste estudo de efeito de ciantraniliprole na expressão do custo adaptativo, assim como observado para sobrevivência larval, a viabilidade de pupas e adultos foram significativamente superiores na linhagem SUS em comparação à LRV-MT Vip-R, sugerindo possível ocorrência de custo adaptativo nestes parâmetros de LRV-MT Vip-R, nas condições do estudo.

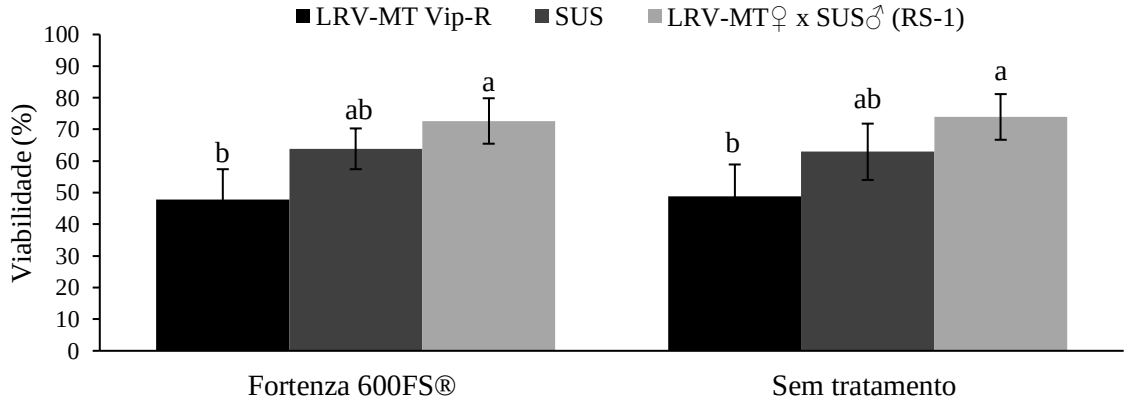

Figura 24. Viabilidade (%) de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma não diferem significativamente

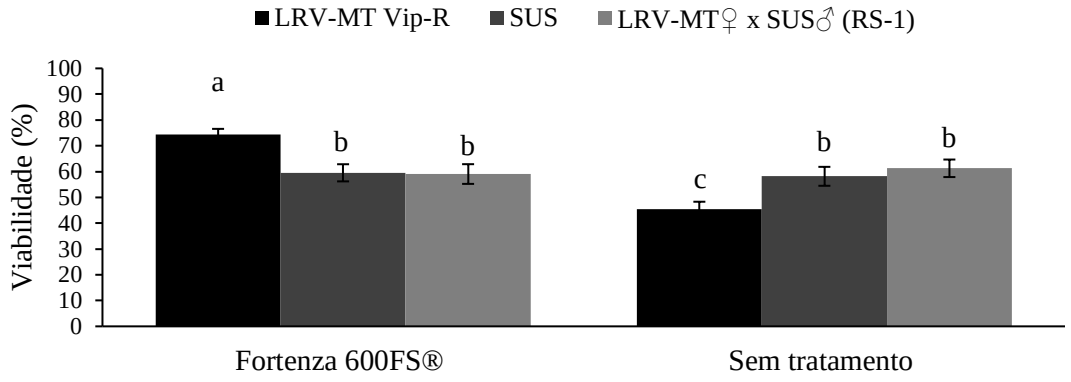

Figura 25. Viabilidade (%) de pupas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

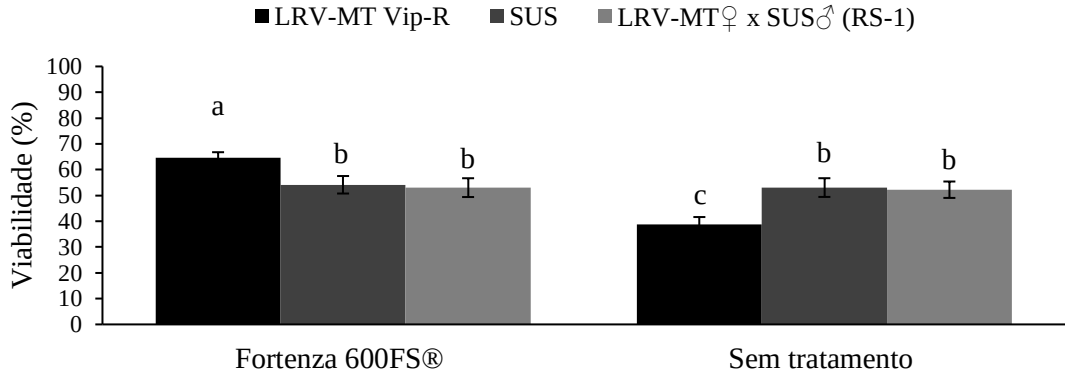

Figura 26. Viabilidade (%) de adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

Ao analisar cada linhagem separadamente, comparando a oferta de tecido foliar com Fortenza 600FS® e tecido foliar sem tratamento, diferenças significativas foram detectadas na duração da fase larval e período ovo-adulto de LRV-MT Vip-R e de SUS. Em LRV-MT Vip-R, ambos foram mais longos quando larvas foram alimentadas com tecido foliar tratado em comparação ao tecido sem tratamento; a linhagem SUS mostrou comportamento contrário, pois ambas as fases foram mais curtas quando ofertado tecido tratado. Em relação à LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), não foram detectadas diferenças significativas na duração de todas as fases analisadas (figuras 27, 28 e 29), indicando novamente a estabilidade no padrão de desenvolvimento desta linhagem independentemente do tipo de tecido ofertado, ou seja, há indícios, nas condições do estudo, de que a oferta a larvas de tecido foliar de milho com 15 DAE, oriundo de sementes tratadas com Fortenza 600FS®, não afeta os parâmetros biológicos estudados de LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), comparando à alimentação de tecido foliar de milho sem TS.

Comparando as linhagens LRV-MT Vip-R e SUS para os parâmetros de duração das fases de larva, pupa e período ovo-adulto, ao se alimentarem de tecido foliar sem tratamento, não foram detectadas diferenças significativas; entretanto, quando alimentadas com tecido foliar tratado, foram detectadas diferenças significativas na duração da fase larval e período ovo-adulto, as quais foram mais longas em LRV-MT Vip-R em comparação à SUS. Este resultado sugere que a oferta de tecido com Fortenza 600FS®, nos métodos do estudo, pode afetar a relação entre as linhagens para a duração da fase larval e período ovo-adulto, comparando à oferta de tecido sem TS, indicando que a

concentração de ciantraniliprole em plantas de milho com 15 DAE pode afetar favoravelmente, sob o prisma do MRI, a expressão do custo adaptativo de LRV-MT Vip-R.

Para a duração da fase de pupa, não foi detectada diferença significativa ao comparar uma mesma linhagem alimentada com tecido foliar tratado e tecido foliar sem tratamento, sendo observado nas três linhagens estudadas. Comparando LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) à linhagem SUS, não foram observadas alterações na relação de cada dupla de linhagem comparada quando alimentadas com tecido tratado e com tecido não tratado.

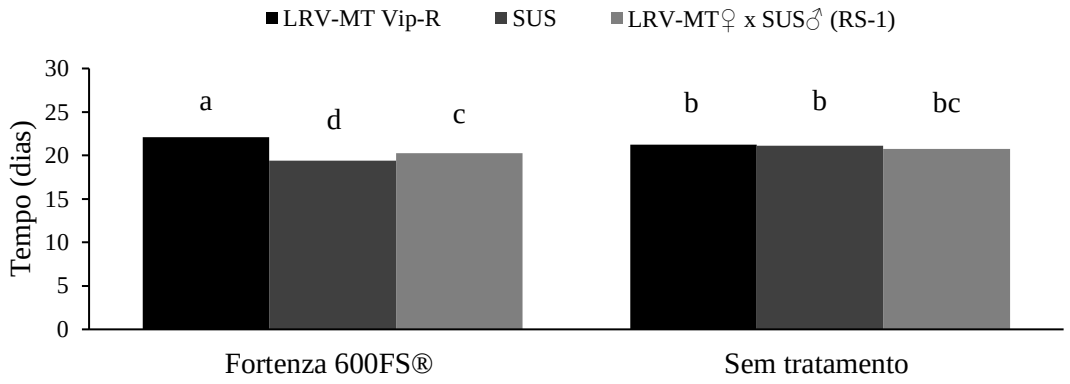

Figura 27. Duração da fase larval das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

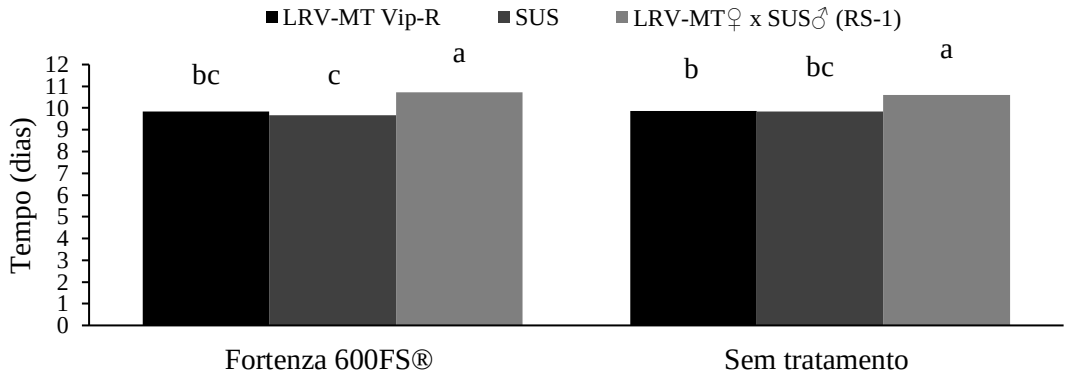

Figura 28. Duração da fase de pupa das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

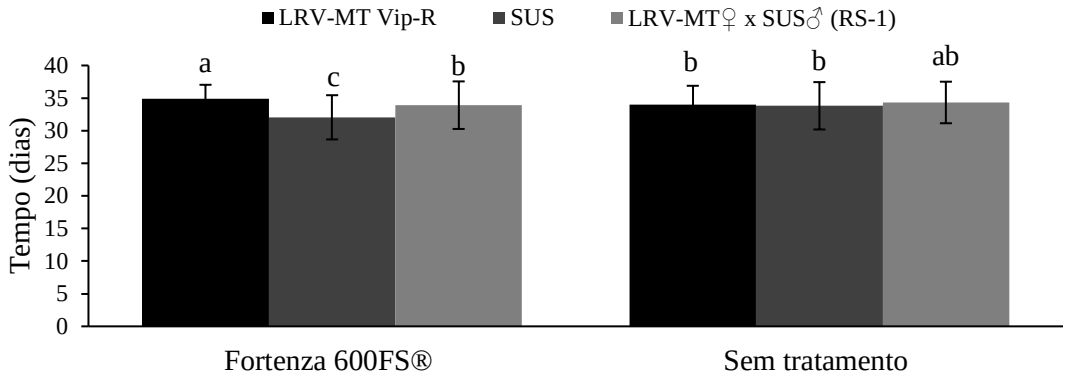

Figura 29. Duração do período ovo-adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

Analisando a fecundidade diária fêmea^{-1} de cada uma das linhagens, comparando a oferta de tecido tratado e tecido sem tratamento, foram observados os seguintes pontos: nas linhagens LRV-MT Vip-R e SUS, este parâmetro foi significativamente superior ao ofertar tecido foliar com Fortenza 600FS® em comparação à oferta de tecido sem tratamento (média de 40 % mais ovos para ambas as linhagens); entretanto, a fecundidade diária fêmea^{-1} de LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não apresentou diferença significativa comparando a oferta dos dois tipos de tecido foliar. Sugere-se que a ingestão, pelas larvas, de tecido foliar proveniente de sementes tratadas, promove um estímulo às fêmeas LRV-MT Vip-R e SUS a ovipositarem maior número de ovos diariamente, o que poderia ser uma estratégia de preservação da espécie mediante uma ameaça. As mesmas comparações foram analisadas para o parâmetro fecundidade total fêmea^{-1}. Neste caso somente em LRV-MT Vip-R observou-se diferença significativa ao comparar a oferta dos dois tipos de tecido, sendo que ao ofertar tecido tratado a fecundidade total fêmea^{-1} foi superior.

A comparação entre as linhagens LRV-MT Vip-R e SUS para fecundidade diária fêmea^{-1} apontou diferenças significativas nas duas situações- alimentadas com tecido tratado e alimentadas com tecido sem tratamento- e em ambas as fêmeas SUS ovipositaram em média 35 % mais ovos em comparação a fêmeas LRV-MT Vip-R. A manutenção da diferença percentual do número de ovos ao ofertar tecido foliar com Fortenza 600FS® em comparação à oferta de tecido sem tratamento, indica possível ausência de efeito do inseticida, nas devidas circunstâncias, na expressão do custo adaptativo de LRV-MT Vip-R para o parâmetro em questão. A comparação entre as duas linhagens para fecundidade total fêmea^{-1} não indicou diferença significativa ao ofertar tecido sem tratamento e ao ofertar tecido tratado.

Ao comparar a fecundidade diária fêmea^{-1} das linhagens SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) alimentadas com as duas diferentes fontes de tecido foliar, não foi detectada diferença significativa, porém numericamente ocorreu uma inversão: SUS alimentada com tecido sem tratamento ovipositou em média 26 % mais ovos que LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) alimentada com mesmo tecido; ao serem alimentadas com tecido tratado com Fortenza 600FS®, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) ovipositou em média 28 % mais ovos que SUS. A análise da fecundidade total fêmea^{-1} comparando estas linhagens não indicou o mesmo resultado citado acima. Em ambos os tipos de oferta de tecido foliar, a linhagem LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) ovipositou significativamente mais ovos em comparação à SUS (em média, 33 % mais ovos ao ofertar tecido sem tratamento e 25 % mais ovos ao ofertar tecido tratado). A redução média de 8 % na diferença de número de ovos das linhagens ao ofertar tecido tratado em relação ao tecido sem tratamento, pressupõe uma possível tendência de Fortenza 600FS® promover alteração na relação entre SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) no parâmetro fecundidade total fêmea^{-1} em comparação a uma alimentação sem ingestão do inseticida. A base para tal alteração pode

estar ligada a mudanças na relação entre estas linhagens no período de oviposição e na longevidade de fêmeas ao ser ofertado tecido tratado em comparação ao tecido sem tratamento.

Diferenças significativas não foram detectadas no período de oviposição quando uma mesma linhagem foi alimentada com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. O período de oviposição de fêmeas SUS não se diferenciou significativamente de LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) quando estas linhagens foram comparadas se alimentando de tecido foliar sem tratamento; entretanto, ao serem feitas as mesmas comparações no regime de alimentação com tecido tratado, observou-se um decréscimo estatisticamente significativo no período de oviposição de fêmeas SUS em comparação a fêmeas LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1). É plausível conjeturar um possível efeito negativo do inseticida na relação das linhagens SUS e LRV-MT Vip-R e SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) em relação ao período de oviposição.

Comparando a longevidade de fêmeas de uma mesma linhagem em dois tipos de oferta de tecido, apenas a comparação feita na linhagem SUS mostrou diferença significativa: ao ofertar tecido foliar tratado com Fortenza 600FS®, a longevidade de SUS apresentou decréscimo médio de dois dias em comparação ao tecido não tratado.

A linhagem LRV-MT Vip-R apresentou longevidade de fêmeas adultas significativamente superior em comparação à SUS, em ambos tipos de tecido foliar ofertado. Ao ser mantido o padrão de relação entre as linhagens, há indícios de ausência do efeito de Fortenza no valor adaptativo de LRV-MT Vip-R em comparação à SUS para longevidade de fêmeas. Numericamente, fêmeas adultas LRV-MT Vip-R viveram em média 2,2 dias a mais que SUS com tecido foliar sem tratamento e em média 3,2 dias a mais com tecido foliar tratado, ou seja, a oferta de folhas tratadas incrementou, numericamente, um dia em média na diferença de longevidade das duas linhagens. Mesmo que no presente estudo este incremento na diferença do período de oviposição ao ofertar tecido tratado não tenha indicado afetar a relação entre SUS e LRV-MT Vip-R para a fecundidade diária e total fêmea-1, é preciso entender com mais propriedade se existe o potencial de Fortenza 600FS® em resultar, de alguma forma, em maior número de indivíduos resistentes em relação aos indivíduos suscetíveis.

A longevidade das fêmeas LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não diferiu significativamente de SUS quando as linhagens foram alimentadas com tecido sem tratamento; entretanto, quando alimentadas com tecido tratado, detectou-se diferença significativa, sendo que fêmeas adultas heterozigóticas viveram em média 1,9 dia a mais que as suscetíveis. A indicação da capacidade de Fortenza 600FS®, nas condições do estudo, em promover alteração significativa na relação entre LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e SUS para a longevidade de fêmeas, permite explorar a possibilidade de alteração no valor adaptativo da linhagem heterozigótica, sempre em relação à linhagem suscetível, e mesmo abordar a possibilidade de efeito do inseticida na expressão do custo adaptativo. Mesmo que não tenha sido observado efeito de Fortenza 600FS® na relação das linhagens para a fecundidade total fêmea^{-1}, o que ao final é um parâmetro de grande impacto no potencial biológico da praga, a mudança nesta relação observada para a longevidade de fêmeas precisa ser levada em consideração, já que o resultado obtido vai em direção contrária à premissa do MRI em minimizar a dispersão de alelos *r*.

A comparação feita entre as linhagens LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) para a longevidade das fêmeas indicou ausência de diferença significativa, tanto ao ofertar tecido sem tratamento quanto ao ofertar tecido tratado.

É importante destacar a discrepância de resultados deste estudo em relação ao estudo de investigação de custo adaptativo para alguns parâmetros de fertilidade, ao comparar as linhagens quando alimentadas com tecido foliar de milho não-Bt sem TS. No estudo de custo adaptativo, a fecundidade diária fêmea^{-1} e a longevidade de fêmeas SUS

e LRV-MT Vip-R não diferiram ao comparar as linhagens, sugerindo ausência de custo adaptativo para estes parâmetros; entretanto, neste presente estudo foi observado um comportamento distinto destes tratamentos, uma vez que a fecundidade diária fêmea^{-1} de SUS foi superior em comparação à LRV-MT Vip-R, sugerindo possível custo adaptativo, e a longevidade de fêmeas SUS apresentou valor médio inferior em comparação à LRV-MT Vip-R, indicando ausência de custo adaptativo na linhagem heterozigótica.

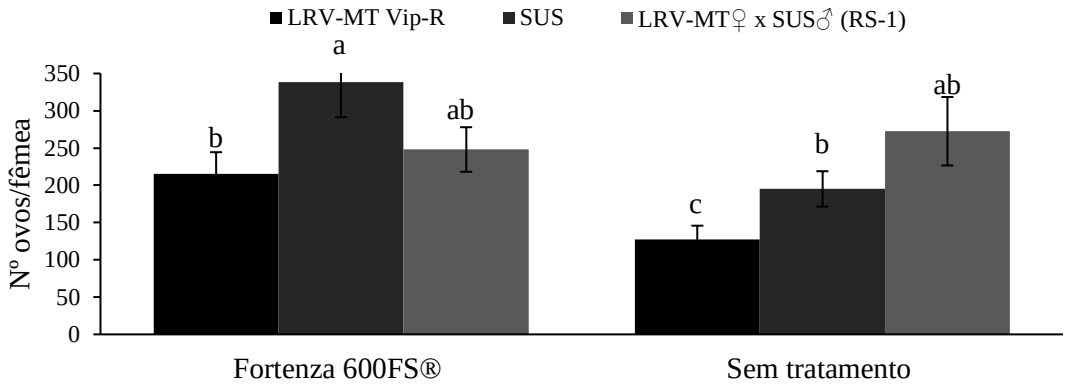

Figura 30. Fecundidade diária fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

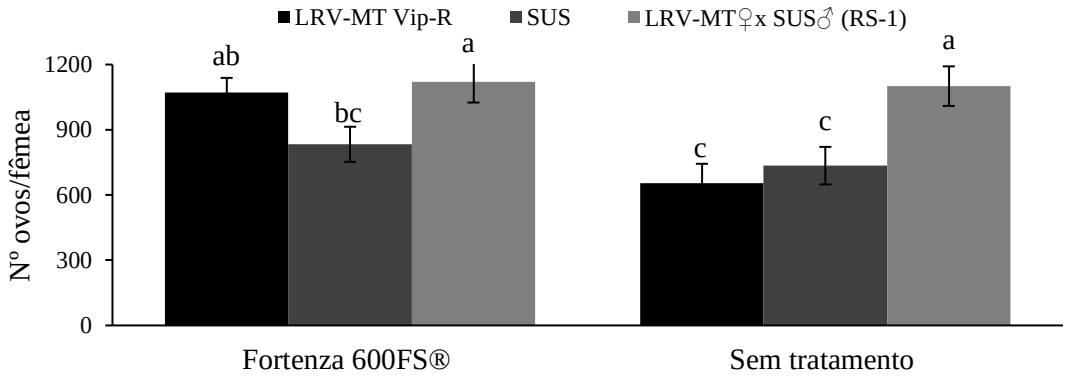

Figura 31. Fecundidade total fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

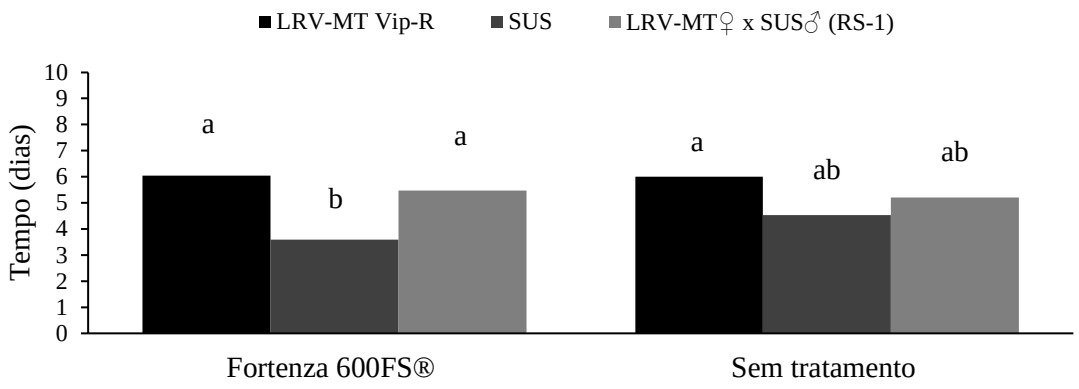

Figura 32. Período de oviposição das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra bçao diferem significativamente

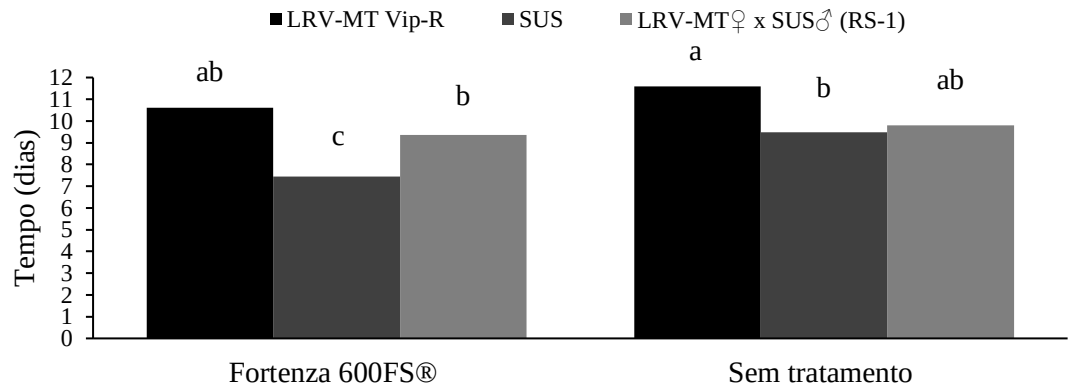

Figura 33. Longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não diferem significativamente

4.5. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da infestação de plantas com idade de 15 DAE em casa de vegetação-Metodologia II

As linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* apresentaram sobrevivência larval inferior à 5%, seis dias após serem infestadas em plantas de milho não-Bt com idade de 15 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS®. A linhagem resistente e linhagens heterozigóticas, ao serem infestadas em plantas de milho não-Bt sem tratamento de sementes, apresentaram sobrevivência larval entre 80 e 90%. Já a linhagem suscetível apresentou menor valor (53%), uma vez que a condição a qual foi exposta (dieta natural em casa de vegetação) difere sobremaneira da condição em que vem sendo mantida por mais de dez anos (dieta artificial em laboratório).

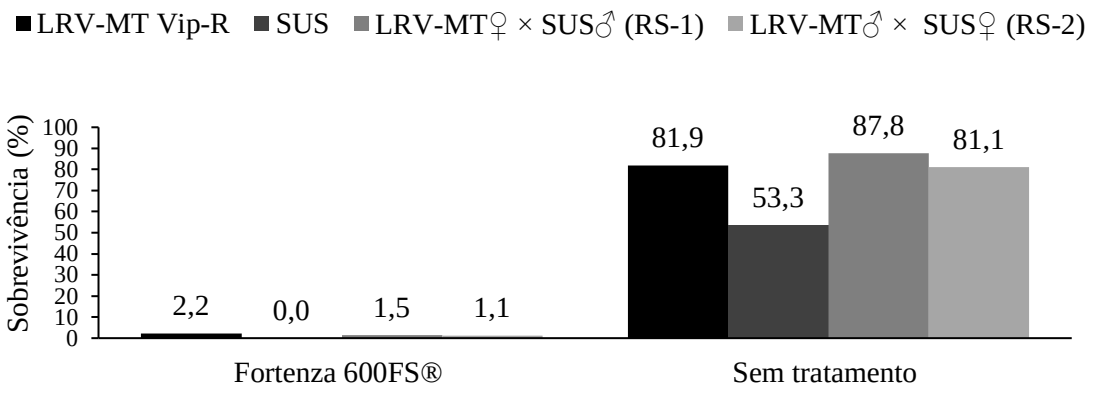

Figura 34. Sobrevivência (%) larval aos 6 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 15 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas

4.6. Efeito de ciantraniliprole em TS na expressão do custo adaptativo de *S. frugiperda* por meio da oferta de tecido foliar fresco extraído de plantas com 21 DAE em laboratório- Metodologia III

Ao comparar a oferta de dois tipos de tecido foliar a cada uma das linhagens, observou-se que a sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI não diferiu significativamente na linhagem LRV-MT Vip-R, sugerindo que a oferta de tecido com Fortenza 600FS® não impactou significativamente a sobrevivência larval nas referidas avaliações (figuras 35 e 36). A sobrevivência da linhagem LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) foi significativamente superior aos 7 DAI quando ofertado tecido sem tratamento em comparação à oferta de tecido tratado (em média, 19%); entretanto não foi detectada diferença significativa aos 14 DAI. Nas linhagens SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) foram detectadas diferenças significativas na sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI, comparando a alimentação com tecido tratado e não tratado: no tecido tratado, SUS apresentou decréscimo de 44% (7 DAI) e 59% (14 DAI); LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1) apresentou decréscimo de 66% (7 DAI) e 70% (14 DAI).

O resultado das comparações de sobrevivência larval da linhagem LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) neste estudo difere do resultado obtido no estudo realizado por meio da Metodologia I (item 4.4), na qual mesmo ofertando tecido foliar extraído de plantas aos 15 DAE, supostamente com maior concentração do ingrediente ativo em comparação à 21 DAE, não foi detectada diferença significativa em ambas as avaliações de sobrevivência larval ao comparar a oferta de tecido tratado e tecido não tratado. A explicação pode estar na diferença de concentração do ingrediente ativo ciantraniliprole no tecido ofertado. No estudo utilizando-se a Metodologia I, o tecido foliar ofertado foi extraído do cartucho e folhas +2 e +3; no estudo utilizando-se a Metodologia III, ofertou-se tecido extraído do cartucho e da folha adjacente ainda não expandida. Como destacado anteriormente, tecidos mais jovens possivelmente apresentam maior concentração de ingrediente ativo.

A análise da comparação da sobrevivência larval aos 7 DAI das linhagens SUS e LRV-MT Vip-R indicou ausência de diferenças significativas nas situações de oferta de tecido sem tratamento e oferta de tecido tratado; aos 14 DAI, não foi detectada diferença significativa entre as linhagens ofertando tecido sem tratamento, porém, ao ofertar tecido tratado, a sobrevivência larval de SUS foi significativamente inferior, na ordem de 40% em média, em comparação à LRV-MT Vip-R.

A sobrevivência larval aos 7 DAI diferiu significativamente ao comparar as linhagens SUS e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2), tanto ao ofertar tecido sem tratamento quanto ao ofertar tecido tratado. Observou-se, nestas comparações, um aumento na amplitude da diferença de sobrevivência larval ao ofertar tecido tratado (SUS: em média, 15% inferior) em comparação à oferta de tecido sem tratamento (SUS: em média, 41% inferior), o que sugere uma tendência de Fortenza 600FS® em alterar a relação das linhagens SUS e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) para o parâmetro de sobrevivência larval. Aos 14 DAI, ofertando tecido foliar sem tratamento, não se detectou diferença significativa na sobrevivência larval ao comparar tais linhagens; entretanto, ao ofertar tecido tratado, a sobrevivência larval de SUS foi significativamente inferior em comparação à LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) (em média, 57,5%).

O resultado das análises feitas para as comparação da sobrevivência larval de SUS e LRV-MT Vip-R e de SUS e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) sugerem um possível efeito negativo da adoção de Fortenza 600FS® com o objetivo proposto, ao levar em conta a necessidade do MRI em potencializar o valor adaptativo de indivíduos suscetíveis em detrimento do valor adaptativo dos carreadores de alelos *r*.

A comparação da sobrevivência larval aos 7 e 14 DAI das linhagens SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), ao ofertar tecido sem tratamento e tecido tratado não indicou diferenças significativas, sugerindo que, para a relação da sobrevivência larval destas duas linhagens, Fortenza 600FS® possivelmente não afeta a expressão do custo adaptativo.

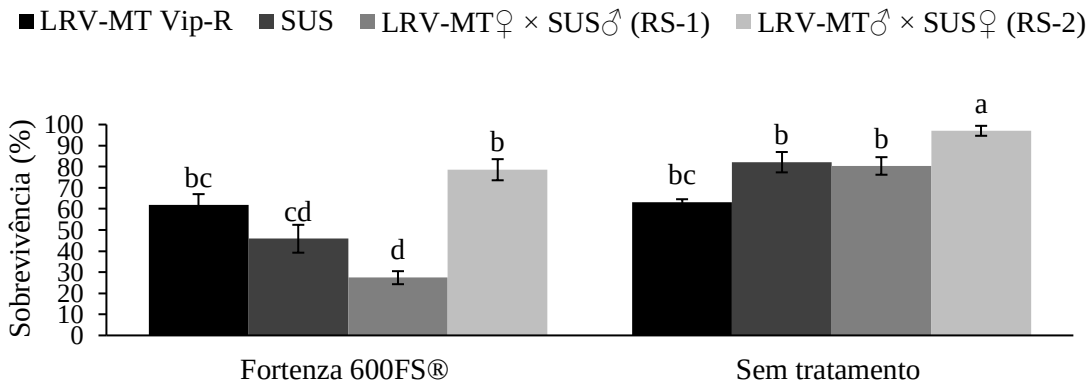

Figura 35. Sobrevivência (%) larval aos 7 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

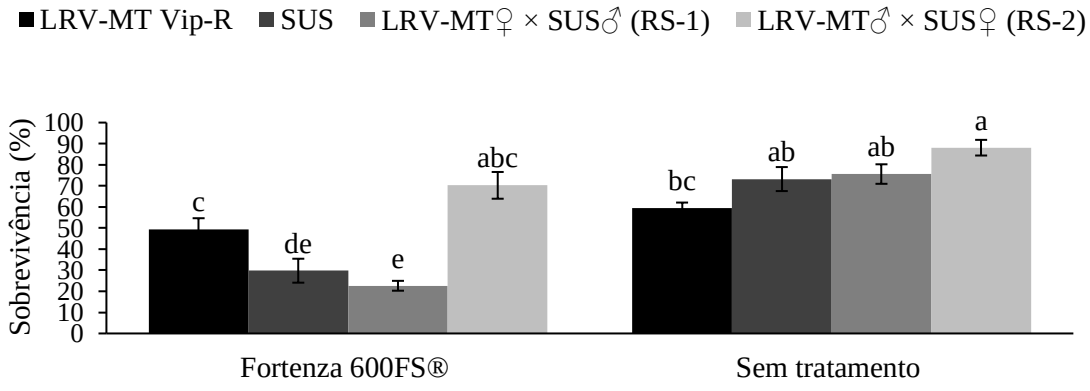

Figura 36. Sobrevivência (%) larval aos 14 DAI das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

A análise da viabilidade de ovos de cada uma das quatro linhagens estudadas, comparando a oferta de tecido foliar sem tratamento e de tecido foliar tratado, não indicou diferenças significativas. No estudo do efeito de Fortenza no custo adaptativo- Metodologia I- o mesmo comportamento foi identificado para as linhagens estudadas [LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ × SUS♂ (RS-1)] ao comparar os tipos de tecido foliar ofertado. As comparações da viabilidade de ovos das linhagens resistente e heterozigóticas à linhagem suscetível ao ofertar tecido sem tratamento e tecido tratado indicou alguma discrepância somente ao comparar LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) e SUS. A viabilidade de ovos destas duas linhagens não diferiu significativamente ao ofertar tecido sem tratamento; entretanto, ao ofertar tecido tratado, a viabilidade de ovos de SUS foi significativamente inferior, sendo em média 38% menor que LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2).

Ao comparar a viabilidade de pupas de cada uma das linhagens, alimentadas com tecido foliar sem tratamento e com tecido foliar tratado, foram detectadas diferenças significativas nas linhagens suscetível e heterozigóticas; em todas as três linhagens, ao ofertar tecido tratado, a viabilidade de pupas sofreu decréscimo. O valor do decréscimo foi, em média, 65% em SUS, 75% em LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), 30% em LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2). Para a linhagem LRV-MT Vip-R não foi detectada diferença significativa neste parâmetro.

As comparações da viabilidade de pupas das linhagens SUS e LRV-MT Vip-R e SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), ao ofertar tecido sem tratamento e ofertar tecido tratado, não indicaram diferenças significativas, sugerindo que, para a relação de sobrevivência de pupas de SUS e LRV-MT Vip-R e SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), Fortenza 600FS® possivelmente não afeta a expressão do custo adaptativo. Ao ofertar tecido sem tratamento, a comparação da viabilidade de pupas de SUS e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) não indicou diferença significativa; ao ofertar tecido tratado com a viabilidade de pupas LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) foi significativamente superior, na ordem de 61% em média, comparada à SUS, sugerindo expressivo efeito de Fortenza 600FS® na relação das linhagens SUS e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) para viabilidade de pupas, favorável ao valor adaptativo da linhagem heterozigótica.

A viabilidade de adultos da linhagem LRV-MT Vip-R não apresentou diferença significativa ao comparar a oferta de tecido sem tratamento e oferta de tecido tratado, corroborando com o resultado de ausência de efeito negativo de Fortenza 600FS® na viabilidade de adultos desta linhagem, obtido no estudo de Fortenza 600FS® no custo adaptativo- Metodologia I. Em relação às linhagens SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2), analisadas separadamente, a viabilidade de adultos das três linhagens foi significativamente inferior ao ofertar tecido tratado em comparação ao tecido sem tratamento. A redução numérica foi, em média, 69% em SUS, 79% em LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), 34% em LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2).

Ao comparar a viabilidade de adultos das linhagens SUS e LRV-MT Vip-R e SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), por meio da oferta de tecido sem tratamento e oferta de tecido tratado, não foram detectadas diferenças significativas, ou seja, há indícios de que Fortenza 600FS® não possui efeito na relação de SUS e LRV-MT Vip-R e SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) para a viabilidade de adultos. O resultado da comparação entre as linhagens SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) indica o mesmo comportamento da relação entre estas linhagens, observado no estudo por meio da Metodologia I, mesmo que a idade das plantas das quais extraiu-se os tecidos ofertados tenha sido diferente nas duas metodologias. Isso não foi observado para a relação entre SUS e LRV-MT Vip-R nos dois estudos, pois, ao ofertar tecido foliar tratado extraído de plantas aos 15 DAE, foi observada uma alteração na relação entre estas linhagens.

A relação entre as linhagens SUS e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) para o parâmetro viabilidade de adultos foi afetada ao ofertar tecido tratado, ao comparar com a relação na oferta de tecido sem tratamento. Em ambas as situações, a viabilidade de adultos SUS foi significativamente inferior à LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2); entretanto, a

amplitude da diferença de viabilidade de adultos entre as duas linhagens foi maximizada ao ofertar tecido tratado (a diferença na oferta de tecido sem tratamento foi, em média, 26% e na oferta de tecido tratado foi, em média, 65%).

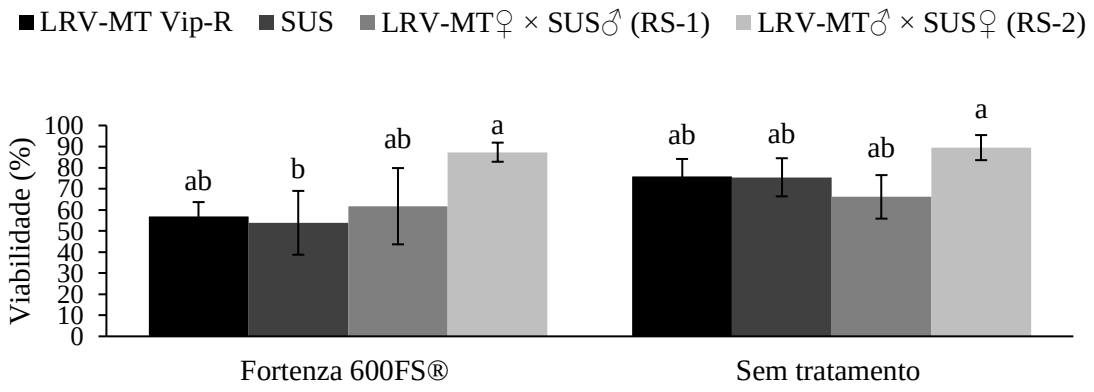

Figura 37. Viabilidade (%) de ovos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

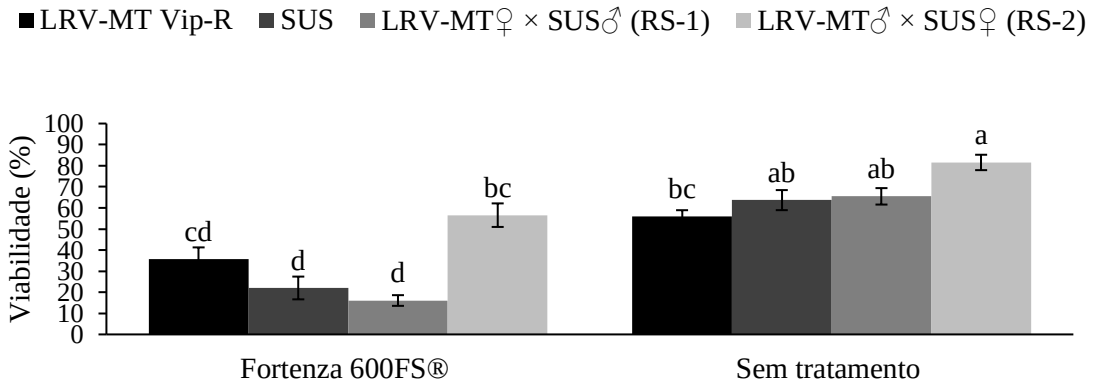

Figura 38. Viabilidade (%) de pupas das linhagens de LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

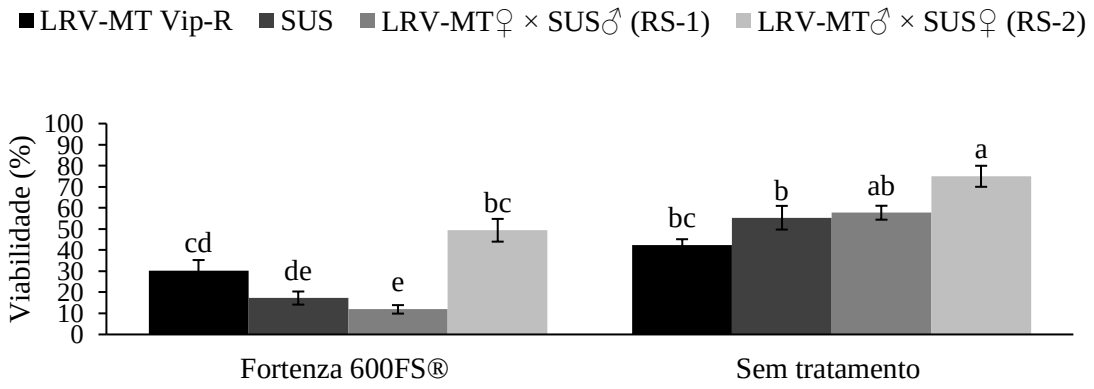

Figura 39. Viabilidade (%) de adultos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

As comparações de duração da fase larval (figura 40) e duração do período ovo-adulto (figura 42), feitas entre a oferta de tecido sem tratamento e tecido tratado para cada linhagem, somente detectou ausência de diferença significativa na linhagem SUS. A duração da fase larval e período ovo-adulto foi superior nas linhagens LRV-MT Vip-R, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) ao serem alimentadas com tecido foliar tratado em comparação ao tecido foliar sem tratamento, indicando possível efeito negativo de Fortenza 600FS®, nas condições do estudo, na velocidade de desenvolvimento destas linhagens. Ao comparar a duração da fase larval e ovo-adulto entre LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e SUS não foi detectada diferença significativa ao ofertar tecido sem tratamento e quando ofertado tecido tratado. Já nas comparações realizadas entre LRV-MT Vip-R e SUS e entre LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) e SUS, ao ofertar tecido sem tratamento não foi detectado diferença significativa em ambas as comparações; entretanto, quando ofertado tecido tratado, foram detectadas diferenças significativas para ambas as comparações, nas quais a linhagem SUS apresentou durações de fase larval e período ovo-adulto mais longas em comparação às linhagens resistente e heterozigótica.

A duração da fase de pupa de cada uma das linhagens estudadas não indicou diferença significativa ao comparar a oferta de tecido sem tratamento e tecido tratado. As comparações feitas para as linhagens resistente e heterozigóticas em relação à linhagem suscetível, ofertando tecido sem tratamento e tecido tratado, não apresentou diferenças significativas em nenhuma das situações, sugerindo que Fortenza 600FS® não afetou a relação das linhagens carreadoras de alelos *r* e a linhagem suscetível, em relação à oferta de tecido sem tratamento (figura 41).

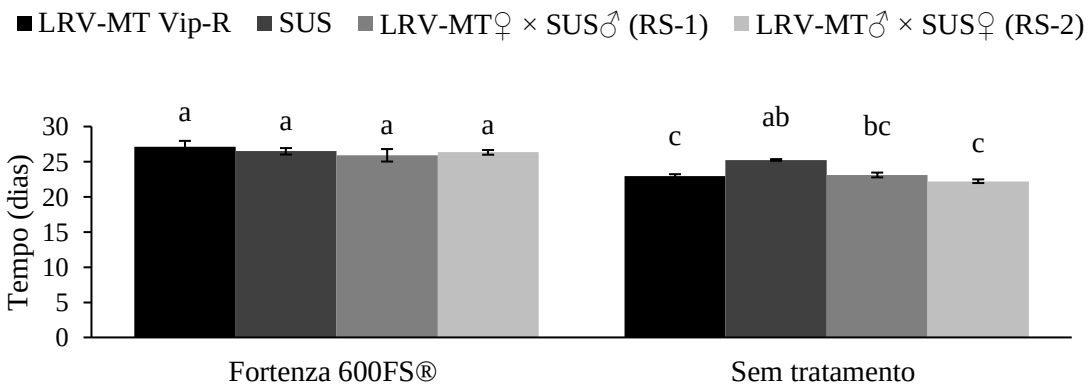

Figura 40. Duração da fase larval das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

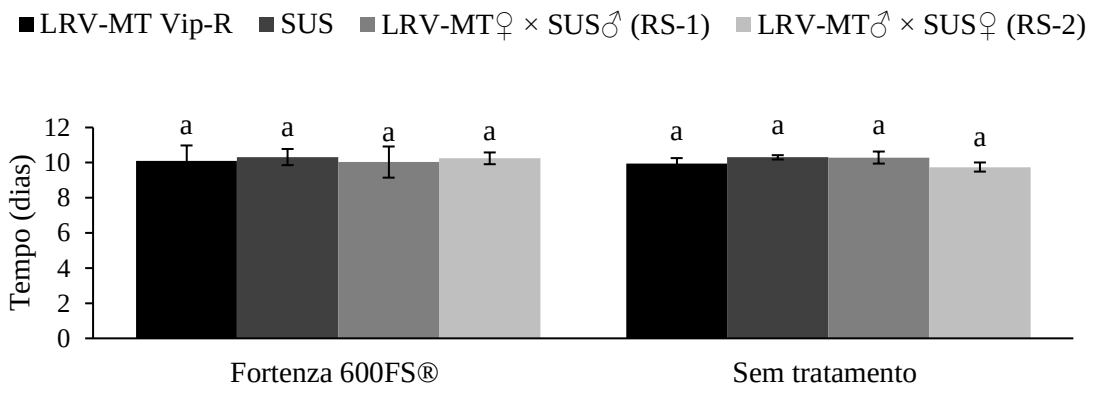

Figura 41. Duração da fase de pupa das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

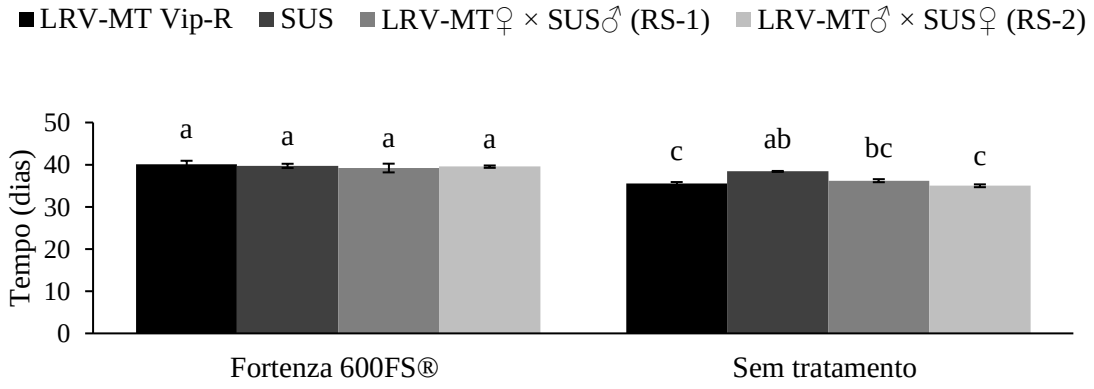

Figura 42. Duração do período ovo- adulto das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* em milho não-Bt com idade de 21 DAE proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

A fecundidade diária fêmea^{-1} e a fecundidade total fêmea^{-1} de cada uma das linhagens estudadas não indicou diferença significativa ao comparar a oferta de tecido sem tratamento e tecido tratado. Levando em consideração as três linhagens estudadas no estudo de Fortenza 600FS® realizado através da Metodologia I, somente os resultados para a linhagem LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) indicam a mesma direção do presente estudo. No estudo inicial, a fecundidade diária fêmea^{-1} foi superior quando as linhagens SUS e LRV-MT Vip-R receberam tecido tratado, e a fecundidade total fêmea^{-1} foi superior quando LRV-MT Vip-R recebeu tecido tratado, ao comparar à oferta de tecido sem tratamento em ambos os casos. Há indícios de que, neste presente estudo (Metodologia III), não ocorreu o estímulo às fêmeas a ovipositarem maior número de ovos por parte de Fortenza 600FS®. A diferença de idade das plantas das quais o tecido foliar foi extraído, consequentemente a diferença de concentração de ciantraniliprole, pode auxiliar no esclarecimento da divergência dos resultados.

As comparações de fecundidade diária fêmea^{-1} e a fecundidade total fêmea^{-1} feitas para as linhagens LRV-MT Vip-R, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) em relação à linhagem SUS, não apresentaram diferenças significativas ao ofertar tecido sem tratamento e ao ofertar tecido tratado (figuras 43 e 44). A ausência de alterações nas relações entre as linhagens ao comparar a oferta de tecido tratado com Fortenza 600FS® e a oferta de tecido sem tratamento para a fecundidade diária e total fêmea-1, observada neste estudo, é suportada pelos resultados observados no estudo da Metodologia I.

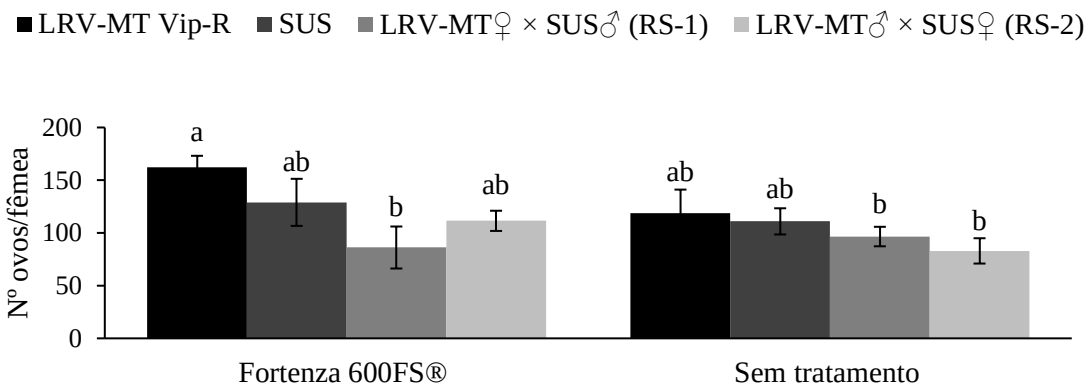

Figura 43. Fecundidade diária fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratada. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

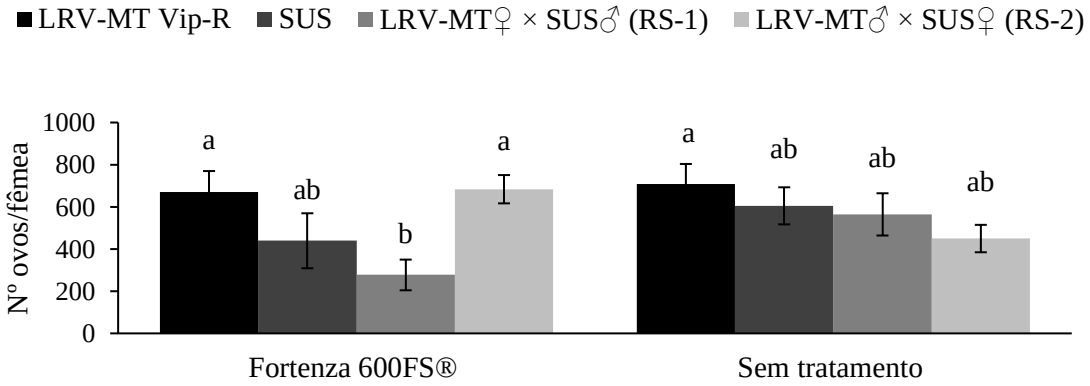

Figura 44. Fecundidade total fêmea^{-1} das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

Ao comparar o período de oviposição das linhagens estudadas, entre a oferta de tecido foliar sem tratamento e de tecido foliar tratado, não foram identificadas diferenças significativas. O mesmo ocorreu no estudo do efeito de Fortenza 600FS® no custo adaptativo- Metodologia I- para as linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1). Ao comparar LRV-MT Vip-R, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) à linhagem SUS, ofertando tecido sem tratamento, diferenças significativas não foram detectadas. Para a oferta de tecido tratado, somente a comparação entre SUS e LRV-MT Vip-R mostrou diferença significativa, onde o período de oviposição da linhagem SUS foi inferior à linhagem LRV-MT Vip-R.

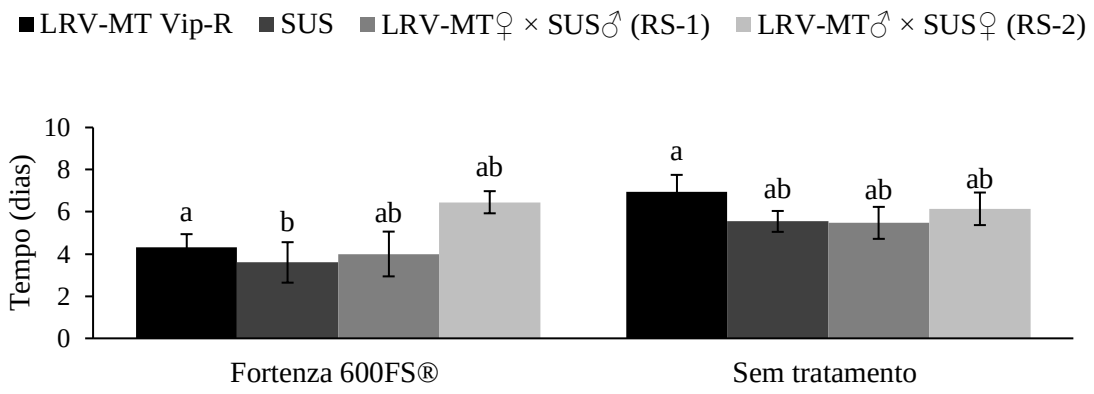

Figura 45. Período de oviposição das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

A longevidade de machos e fêmeas adultos de cada uma das linhagens estudadas não indicaram diferenças significativas ao comparar a oferta de tecido sem tratamento e tecido tratado. As comparações de destes parâmetros feitas para as linhagens LRV-MT Vip-R, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) em relação à linhagem SUS, não apresentaram diferenças significativas ao ofertar tecido sem tratamento e ao ofertar tecido tratado, sugerindo, nas condições do presente estudo, a ausência de efeito de Fortenza 600FS® em cada uma das linhagens e também nas relações feitas entre as linhagens resistente e a linhagem suscetível.

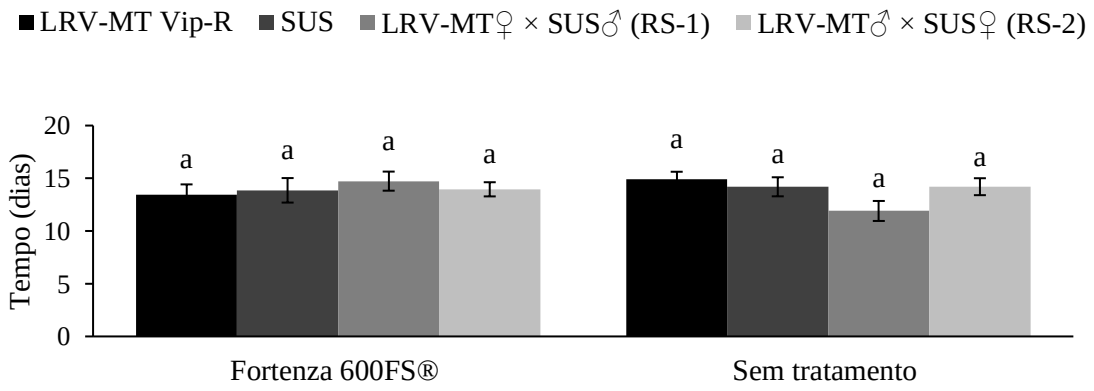

Figura 46. Longevidade de fêmeas das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

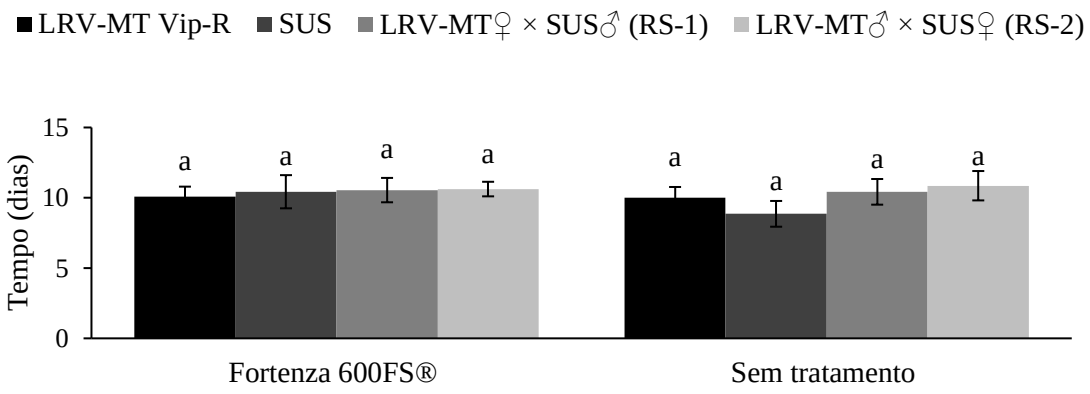

Figura 47. Longevidade de machos das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas. Barras (±EP) com mesma letra não são significativamente diferentes

Observou-se expressiva incidência de adultos com alterações morfológicas aparentes na linhagem SUS ao ofertar tecido tratado com Fortenza 600FS®. De 42 indivíduos machos e fêmeas separados para formação de casais para este tratamento, 46% dos indivíduos apresentavam deformações, especialmente observada em asas.

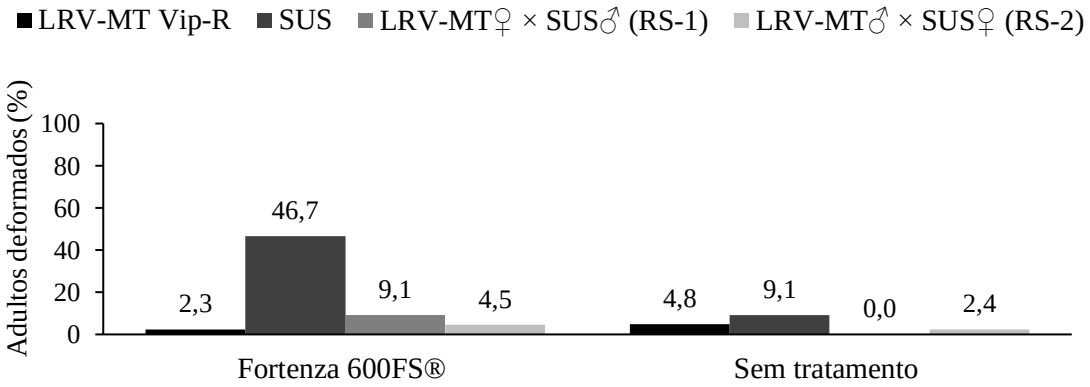

Figura 48. Adultos deformados (%) das linhagens LRV-MT Vip-R, SUS, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) de *S. frugiperda* alimentadas com tecido foliar extraído de milho não-Bt proveniente de sementes tratadas com Fortenza 600FS® e sementes não tratadas

Figura 49. Adultos de *S. frugiperda* com alterações morfológicas, provenientes de tratamentos com oferta de tecido foliar fresco extraído de milho não-Bt oriundo de sementes tratadas com Fortenza 600FS®

5. DISCUSSÃO

Em 2013 foi estimada a frequência inicial de alelos da resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 em algumas regiões do Brasil (Bernardi et al., 2015b). Para Rio Verde- GO, na primeira safra do referido ano, os autores estimaram frequência alélica inicial de 0,0048, por meio do método genotípico F2 *Screen* e bioensaio com uso de dose diagnóstica. A frequência alélica da resistência de *S. frugiperda* coletada em Rio Verde- GO, segunda safra de 2017, teve valor estimado pelo presente trabalho em 0,004938 (uma isofamília positiva em 100 isofamílias testadas); Amaral et al. (2019) estimaram o valor de 0,0145 (duas isofamília positiva em 50 isofamílias testadas) para a mesma região na primeira safra de 2017. Os dois estudos utilizaram o método genotípico F2 *Screen* e bioensaio com tecido foliar fresco de milho Viptera™. A discrepância nos resultados estimados no presente trabalho e por Amaral et al. (2019) não permite afirmar que a resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 evoluiu de 2013 a 2017 em Rio Verde- GO.

Para Lucas do Rio Verde- MT, segunda safra de 2017, o presente trabalho testou 121 isofamílias, das quais quatro foram positivas, estimando a frequência alélica da resistência à Vip3Aa20 em 0,010321; Amaral et al. (2019) testaram 117 isofamílias formadas a partir de uma amostra coletada no mesmo município e na mesma safra de 2017, identificando uma isofamília positiva, estimando a frequência alélica da resistência em 0,0042. Bernardi et al. (2015b) estudaram *S. frugiperda* oriunda de Lucas do Rio Verde- MT entre 2013 e 2015, indicando incremento na mortalidade larval em comparação à população suscetível de referência, por meio de teste fenotípico com dose diagnóstica; entretanto, os indivíduos sobreviventes não atingiram a fase adulta. A frequência alélica inicial não foi estimada para Lucas do Rio Verde-MT; porém, Bernardi et al. (2015b) indicou frequência inicial de 0,047 para o estado do Mato Grosso. Apesar de não permitir uma conclusão definitiva, há indícios da possibilidade de evolução da resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 em Lucas do Rio Verde- MT.

Em 2015, Bernardi et al. (2015b) alertaram sobre a possibilidade de risco de evolução da resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 no Brasil. A determinação da existência de custo adaptativo, sua magnitude, dominância ou recessividade, associado à resistência de *S. frugiperda* à toxina Bt Vip 3Aa20, tem um papel de extrema importância na durabilidade desta tecnologia na cultura do milho. No trabalho de custo adaptativo, a linhagem resistente LRV-MT Vip-R e as linhagens heterozigóticas LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) apresentaram viabilidade de adultos e taxas de fecundidade diária e total significativamente similares à linhagem suscetível, indicando ausência de custo adaptativo, nas condições do estudo, para estas linhagens carreadoras de alelos *r*. Este resultado difere do que foi obtido por Bernardi et al. (2016) para uma linhagem resistente à Vip3Aa20 originária de Correntina-BA, a qual apresentou viabilidade de adultos e taxas de fecundidade significativamente inferiores à linhagem suscetível de referência, indicando a ocorrência de custo adaptativo. Os resultados dos referidos estudos são convergentes em relação à ausência de custo adaptativo na viabilidade de adultos e taxas de fecundidade das linhagens heterozigóticas.

A discrepância dos resultados entre os estudos poderia estar ligada à diferença de origem das linhagens resistentes estudadas, uma vez que as metodologias empregadas em ambos os trabalhos foram similares. Entretanto, os resultados obtidos nos estudos de Fortenza 600FS® no custo (Metodologias I e III), analisando as linhagens somente ao ofertar tecido de milho não-Bt sem tratamento, foram detectadas similaridades no comportamento das linhagens. Não é possível fazer inferências mais aprofundadas e concretas devido o desconhecimento do mecanismo de resistência à Vip3Aa20 destas linhagens.

Ao observar o comportamento das linhagens alimentadas com tecido de milho não-Bt nos diferentes estudos deste presente trabalho, algumas considerações podem ser feitas auxiliando na compreensão da ocorrência ou não de custo adaptativo. No estudo de investigação de custo, a sobrevivência larval aos 14 DAI de SUS não diferiu significativamente da sobrevivência de larvas LRV-MT Vip-R e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1); no estudo do efeito de Fortenza 600FS® no custo- Metodologia I, ao analisar somente as linhagens alimentadas com tecido não tratado, a linhagem SUS apresentou maior sobrevivência larval aos 14 DAI em comparação à LRV-MT Vip-R e à LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1). No estudo de Fortenza 600FS® no custo- Metodologia III, apesar de estatisticamente não apresentarem diferenças, a sobrevivência larval linhagem LRV-MT Vip-R, aos 14 DAI, foi aproximadamente 13% inferior às linhagens SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1).

Conforme citado acima, a investigação de custo adaptativo na viabilidade de adultos não diferiu entre as linhagens SUS e LRV-MT Vip-R. Os resultados obtidos na Metodologia I, observando as linhagens somente alimentadas com tecido de milho não-Bt sem tratamento, SUS apresentou valor superior em comparação à LRV-MT Vip-R, sugerindo possível ocorrência de custo adaptativo. Na - Metodologia III, ocorreu o mesmo observado para a sobrevivência larval, uma vez que a viabilidade de adultos da linhagem resistente foi aproximadamente 13% inferior às linhagens SUS e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1). A viabilidade de adultos e fecundidade total fêmea^{-1}, nos três estudos conduzidos, não diferiram entre as linhagens suscetível e LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) ao ofertar tecido foliar de milho não-Bt. A convergência dos resultados permite concluir que a linhagem heterozigótica LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), recebedora de alelos *r* do parental fêmea, não possui custo adaptativo associado à resistência à Vip3Aa20. A linhagem LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2), recebedora de alelos *r* do parental macho, mostrou ter maior valor adaptativo em comparação à linhagem suscetível. A recessividade do custo adaptativo associado à resistência de S. frugiperda à Vip3Aa20 foi igualmente demonstrada por Bernardi et al. (2016).

A duração do período ovo-adulto influencia no número de gerações que determinada linhagem terá em um intervalo de tempo, auxiliando em modelos de predição de evolução da resistência. No estudo de custo adaptativo, a duração do período ovo-adulto foi 1,9 dia superior na linhagem resistente LRV-MT Vip-R em comparação à linhagem suscetível; já as linhagens heterozigóticas não diferiram da linhagem suscetível. Já na Metodologia I, nos tratamentos com oferta de tecido sem Fortenza 600FS®, a duração deste período não diferiu entre a linhagem resistente e linhagem suscetível. O resultado obtido no estudo da Metodologia III não fomenta uma conclusão final, uma vez que o período ovo-adulto foi 3 dias menor para a linhagem resistente. Os resultados não permitem concluir se a linhagem LRV-MT Vip-R apresenta custo adaptativo associado à resistência para a duração do período ovo-adulto. Yang et al. (2017) detectaram atraso significativo no desenvolvimento de larvas de uma linhagem *S. frugiperda* resistente à Vip3Aa20 originária do estado da Louisiana, EUA, ao compará-la a uma linhagem suscetível de referência na ausência da toxina Vip3Aa20.

Os resultados obtidos para a fecundidade total fêmeas^{-1} nos três estudos deste trabalho indicaram não ocorrer custo adaptativo neste parâmetro para a linhagem LRV-MT Vip-R. Em relação à linhagem LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1), a fecundidade total fêmea $^{-1}$ foi um dos poucos parâmetros onde a linhagem heterozigótica mostrou ter maior valor adaptativo em relação à linhagem suscetível.

A ocorrência ou não de custo e sua intensidade precisa ser completamente elucidada na resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa2, pois se configura como premissa para tomada de decisões dentro do MRI. Entretanto, a origem das populações estudadas, métodos empregados nos testes, possível subestimação do custo em condições laboratoriais, são fatores que podem gerar um viés na interpretação dos resultados.

O inseticida químico Fortenza 600FS®, utilizado em TS de milho para controle de larvas de *S. frugiperda*, foi alvo de investigações para entender seu efeito na magnitude/intensidade e dominância do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20. Em condições de campo, a proteção às plantas contra o ataque de larvas de *S. frugiperda* é observado por aproximadamente vinte dias após a emergência das plantas, sendo este período sujeito a alteração devido ao efeito de diversas variáveis. Ao longo deste período de proteção, a eficácia do produto entra em declínio, e a concentração do ingrediente ativo nas plantas se torna insuficiente para controlar 100% das larvas. Nesta fase, os estudos do presente trabalho indicaram que a concentração de ciantraniliprole não tiveram efeito positivo, do ponto de vista do MRI, no custo adaptativo das linhagens LRV-MT Vip-R e linhagens heterozigóticas.

6. CONCLUSÃO

A comprovação da resistência fenotípica da linhagem LRV-MT Vip-R, selecionada em condições laboratoriais a partir de uma população de *S. frugiperda* proveniente de campo de milho não-Bt de Lucas do Rio Verde- MT, permitiu a execução dos demais estudos propostos para responder ao principal objetivo do presente trabalho.

O estudo de investigação de custo adaptativo não foi conclusivo para determinar a existência de custo adaptativo associado à resistência à Vip3Aa20 nas linhagens LRV-MT Vip-R, LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) e LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2); entretanto, os resultados obtidos nos estudos de efeito do Fortenza 600FS® no custo adaptativo- Metodologias I e III- possibilitaram entender com maior clareza o comportamento das linhagens na ausência da pressão de seleção, ao ofertar tecido de milho não-Bt sem tratamento. A sobrevivência larval e a viabilidade de adultos da linhagem resistente apresentaram custo adaptativo; entretanto, parâmetros decisivos no sucesso de uma linhagem, como taxa de fecundidade, não diferiram entre as linhagens resistente e suscetível. A linhagem heterozigota LRV-MT♀ x SUS♂ (RS-1) não apresentou custo adaptativo e seu valor adaptativo foi semelhante à linhagem suscetível. A linhagem heterozigota LRV-MT♂ x SUS♀ (RS-2) não apresentou custo adaptativo e seu valor adaptativo foi superior em comparação à linhagem suscetível. Este cenário exposto é desfavorável à longevidade da toxina Vip3Aa20 no controle de *S. frugiperda* ressltando a importância do desenvolvimento de estratégias que possam alterar a expressão (magnitude/dominância) do custo adaptativo.

A investigação do efeito de Fortenza 600FS® na expressão do custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* à Vip3Aa20 não mostrou ser uma estratégia promissora visando potencializar a magnitude e/ou dominância do custo adaptativo. O tratamento com Fortenza 600FS® das sementes de milho não-Bt, para a implantação de áreas refúgio, objetivando depreciar o valor adaptativo dos indivíduos carreadores de alelos *r* em comparação aos indivíduos suscetíveis, para que a suscetibilidade à Vip3Aa20 seja conservada, não agregaria benefícios ao MRI.

REFERÊNCIAS

AMARAL, F. S.; GUIDOLIN, A. S.; SALMERON, E.; KANNO, R. H.; PADOVEZ, F. O.; FATORETTO, J. C.; OMOTO, C. Geographical distribution of Vip3Aa20 resistance allele frequencies in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.169-178, 12 jun. 2019. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.5490.

ACHARYA, B.; HEAD, G. P.; PRICE, P. A.; HUANG, F. Fitness costs and inheritance of Cry2Ab2 resistance in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 149, p.8-14, out. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2017.06.014.

ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. Disponível em:<http://www.pesticideresistance.org/> Acesso em: 23 fevereiro de 2020.

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 Screen for Rare Resistance Alleles. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 91, n. 3, p.572-578, 1 jun. 1998. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/91.3.572.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.147-163, jan. 2009. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090518.

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

BATES, S. L; ZHAO, J.; ROUSH, R. T; SHELTON, A. M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.57-62, jan. 2005. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt1056.

BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M.; BANDEIRA, J. M.; MAGALHÃES, T. R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações *de Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.709-716, dez. 2004. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1590/s1519-566x2004000600008.

BREVAULT, T.; HEUBERGER, S.; ZHANG, M.; ELLERS-KIRK, C.; NI, X.; MASSON, L.; LI, X.; TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 110, n. 15, p.5806-5811, 25 mar. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1216719110.

BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: Borém, A.; Almeida, G. D. de. Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais. Visconde de Rio Branco: Suprema, 2011. p. 179-204.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L; FATORETTO, J. C.; MEDEIROS, F. C.; BURD, T.; OMOTO, C. Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 72, n. 9, p.1794-1802, 9 fev. 2016. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.4223.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.140-150, 16 out. 2015. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140130.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R. S.; OKUMA, D. M.; SALMERON, E.; FATORETTO, J. C.; MEDEIROS, F. C..; BURD, T.; OMOTO, C. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, [s.l.], v. 76, p.7-14, out. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.06.006.

BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; AMADO, D.; SOUSA, R. S.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F. C. L.; CONVILLE, J.; BURD, T.; OMOTO, C. Resistance Risk Assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera). **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 108, n. 6, p.2711-2719, 27 jul. 2015. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov219.

BUNTIN, G. D.; ALL, J. N.; LEE, R. D.; WILSON, D. M. Plant-incorporated *Bacillus thuringiensis* resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Journal Economic Entomology**, v. 97, p.1603-1611, 2004.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos da ordem lepidoptera e pragas do milho, evento TC1507. In: **Parecer Técnico N 1679/2008**. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12818.html>. Acesso em: 25 janeiro. 2020.

CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. 2007. Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos evento MON810. In **Parecer Técnico N 1.100/2007**. 2007.

CNTBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. 2008. Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos da ordem lepidoptera e pragas do milho, evento TC1507. In **Parecer Técnico N 1679/2008**. 2008.

CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos e Tolerante a herbicidas, MON 89034xTC1507xNK603. In: **Parecer Técnico N 2753/2010**. Disponível em:<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15833.html>. Acesso em: 15 de fev. 2020.

CÉLERES. 20 anos da adoção da biotecnologia agrícola no Brasil: lições aprendidas e novos desafios. Disponível em:

<http://www.celeres.com.br/wp-content/uploads/2014/10/20_anos_biotecnologia.pdf> Acesso: 28 jan.2020.

CAO, G.; HAN, Z. Tebufenozide resistance selected in *Plutella xylostella* and its cross-resistance and fitness cost. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 62, n. 8, p.746-751, 2006. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.1234.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p.161-168, 19 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3099.

COMAS, C.; LUMBIERRES, B.; PONS, X.; ALBAJES, R. No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. **Transgenic Research**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.135-143, 2 ago. 2013. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s11248-013-9737-0.

CARPENTER, J. Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.319-321, abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt0410-319.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVOLOS, C. C.; LEMES, A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.79-87, fev. 2014. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2014000200001.

CARNEIRO, A. A. Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**. p. 25, 2009.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H.; *Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature, 2014. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acessado em 21 de fev. de 2020.

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. In Vivo and In Vitro Binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* Midgut and Characterization of Binding Sites by 125I Radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 80, n. 20, p.6258-6265, 7 jul. 2014. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/aem.01521-14.

COUSTAU, C.; CHEVILLON, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.378-383, set. 2000. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347(00)01929-7.

CARRIÈRE, Y; CROWDER, D. W.; TABASHNIK, B. E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, [s.l.], v. 3, n. 5-6, p.561-573, 30 abr. 2010. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00129.x.

CARRIÉRE, Y; TABASHNIK, B. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B**: Biological Sciences, [s.l.], v. 268, n. 1475, p.1475-1480, 22 jul. 2001. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2001.1689.

CARRIÉRE, Y.; DELAND, J. P.; ROFF, D. A.; VINCENT, C. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. **Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B**: Biological Sciences, [s.l.], v. 258, n. 1351, p.35-40, 22 out. 1994. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1994.0138.

CARRIÈRE, Y.; ELLERS-KIRK, C.; BIGGS, R.; HIGGINSON, D. M.; DENNEHY, T. J.; TABASHNIK, B. E. Effects of Gossypol on fitness costs associated with resistance to Bt cotton in pink bollwom. **Journal of Economic Entomology,** 97 (5), p. 1710-1718, 2004.

CARRIÈRE, Y.; ELLERS-KIRK, C.; BIGGS, R. W.; NYBOER, M. E.; UNNITHAN, G. C.; DENNEHY, T. J.; TABASHNIK, B. E. Cadherin-Based Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cotton in Hybrid Strains of Pink Bollworm: Fitness Costs and Incomplete Resistance. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 99, n. 6, p.1925-1935, 1 dez. 2006. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/99.6.1925.

DOSS, V. A.; KUMAR, K. A.; JAYAKUMAR, R.; SEKAR, V. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.82-88, out. 2002. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s1046-5928(02)00515-6.

EDGERTON, M. D; FRIDGEN, J.; ANDERSON, J. R; AHLGRIM, J.; CRISWELL, M.; DHUNGANA, P.; GOCKEN, T.; LI, Z.; MARIAPPAN, S.; PILCHER, C. D. Transgenic insect resistance traits increase corn yield and yield stability. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.493-496, jun. 2012. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2259.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 93, n. 11, p.5389-5394, 28 maio 1996. Proceedings of the National Academy of Sciences. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.11.5389.

FOSTER, S. P.; DENHOLM, I.; POPPY, G. M.; THOMPSON, R.; POWELL, W. Fitness trade-off in peach-potato aphids (*Myzus persicae*) between insecticide resistance and vulnerability to parasitoid attack at several spatial scales. **Bulletin Of Entomological Research**, [s.l.], v. 101, n. 6, p.659-666, 21 dez. 2010. Cambridge University Press (CUP). http://dx.doi.org/10.1017/s0007485310000623.

WU, K.; MU, Wei; LIANG, Gemei; GUO, Yuyuan. Regional reversion of insecticide resistance inHelicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.491-498, 2005. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.999.

FERRÉ, Juan; VAN RIE, Jeroen. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance toBacillus thuringiensis. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.501-533, jan. 2002. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145234.

FITT, G. P.; OMOTO, C.; MAIA, A. D. H. N.; WAQUIL, J. M.; CAPRIO, M.; OKECH, M. A.; Andow, D. A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Series** (Vol. 2, pp. 300-345). CABI Publishing, 2006.

FATORETTO, J. C.; MICHEL, A. P.; SILVA FILHO, M. C.; SILVA, N. Adaptive Potential of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Limits Bt Trait Durability in Brazil. **Journal Of Integrated Pest Management**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-10, jan. 2017. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jipm/pmx011.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, [s.l.], v. 64, p.150-158, out. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019.

FARIAS, J. R; ANDOW, A. David; HORIKOSHI, R. J; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R. S.; NASCIMENTO, A. S.; OMOTO, C.. Frequency of Cry1F resistance alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 72, n. 12, p.2295-2302, 15 abr. 2016. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.4274.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and Biological Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.319-323, 1 jun. 1977. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/70.3.319.

GOULD, F. Sustainability of Transgenic Insecticidal Cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.701-726, jan. 1998. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.701.

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

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.226-235, 29 jul. 2011. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022629.

GLARE, T. R; O` CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley**, 2000. 350 p.

GOUFFON, C.; VAN VLIET, A.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; JURAT-FUENTES, J. L. Binding Sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae Toxin on Heliothine Brush Border Membrane Vesicles Are Not Shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A Toxin. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 10, p.3182-3188, 25 mar. 2011. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/aem.02791-10.

GROETERS, F. R.; TABASHNIK, B. E.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W. Fitness Costs of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). **Evolution**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.197-200, fev. 1994. JSTOR. http://dx.doi.org/10.2307/2410015

GROETERS, F. R.; TABASHNIK, B. E.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Affects Mating Success of the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 86, n. 4, p.1035-1039, 1 ago. 1993. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/86.4.1035.

GAHAN, L. J.; MA, Y.; MACGREGOR COBLE, M. L.; GOULD, F.; MOAR, W.J.; HECKEL, D. G. 2005. Genetic basis of resistance to Cry1Ac and Cry2Aa in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, **98**:1357-1368.

GAHAN, L. J. Identification of a Gene Associated with Bt Resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, [s.l.], v. 293, n. 5531, p.857-860, 3 ago. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.1060949.

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

HARGROVE, T. Wrangling over refuge. **American Scientist**, v. 87, p. 24–25, 1999.

HOLT, J. S. Herbicide Resistance in Weeds and Crops – J. C. Caseley, G. W. Cussans, and R. K. Atkin, editors. 1991. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford. 513 p. illus., Hardcover, ISBN: 0-7506-1101-4. **Weed Technology**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.486-487, jun. 1992. Cambridge University Press (CUP). http://dx.doi.org/10.1017/s0890037x00035107.

HECKEL, D. G. Roles of ABC proteins in the mechanism and management of Bt resistance. **Bt Resistance**: characterization and strategies for GM crops producing Bacillus thuringiensis toxins, [s.l.], p.98-106, 2015. CABI. http://dx.doi.org/10.1079/9781780644370.0098.

HARDKE, J. T.; LEONARD, B. R.; HUANG, F.; JACKSON, R. Damage and survivorship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic field corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. **Crop Protection**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.168-172, fev. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.10.005.

HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D; BERNARDI, O; MALAQUIAS, J. B.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L.; AMARAL, F. S. A.; OMOTO, C. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.327-345, 10 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/srep34864.

HUTCHISON, W. D.; BURKNESS, E. C.; MITCHELL, P. D.; MOON, R. D.; LESLIE, T. W.; FLEISCHER, S. J.; ABRAHAMSON, M.; HAMILTON, K. L.; STEFFEY, K. L.; GRAY, M. E. Areawide Suppression of European Corn Borer with Bt Maize Reaps Savings to Non-Bt Maize Growers. **Science**, [s.l.], v. 330, n. 6001, p.222-225, 7 out. 2010. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.1190242.

HUANG, F.; ANDOW, D. A.; BUSCHMAN, L. L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, [s.l.], v. 140, n. 1, p.1-16, 10 jun. 2011. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01138.x.

HUANG, F.; CHEN, M.; GOWDA, A.; CLARK, T. L.; MCNULTY, B. C.; YANG, F.; NIU, Y. Identification, inheritance, and fitness costs of Cry2Ab2 resistance in a field-derived population of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 130, p.116-123, set. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.007

HALLIDAY, R. W.; BURNHAW, K. P. Choosing the Optimal Diagnostic Dose for Monitoring Insecticide Resistance. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 83, n. 4, p.1151-1159, 1 ago. 1990. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/83.4.1151.

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

HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; WANG, J.; DAVES, C.; LEVY, R.; COOK, D.; HEAD, G. P.; YANG, Y.; TEMPLE, J.; FERGUSON, R. F2 screening for resistance to pyramided *Bacillus thuringiensis* maize in Louisiana and Mississippi populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 10, p. 1269–1276, 2011.

IRAC Brasil & IRAC Internacional. **Recomendações de Manejo de Resistência a Inseticidas e Manejo de Pragas para Soja, Algodão e Milho no Brasil.** Disponível em: <http://www.irac-br.org/outros> Acesso: 27 ago.2017.

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

JUÁREZ, M. L.; MURðA, M. G.; GARCÍA, M. G; ONTIVERO, M.; VERA, M. T.; VILARDI, J. C.; GROOT, A. T.; CASTAGNARO, A. P.; GASTAMINZA, G.; WILLINK, E. Host Association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 105, n. 2, p.573-582, 1 abr. 2012. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1603/ec11184.

JANMAAT, A. F; MYERS, J. H. The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. **Proceedings Of The Royal Society B**: Biological Sciences, [s.l.], v. 272, n. 1567, p.1031-1038, 22 maio 2005. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2004.3040.

JAKKA, S. R. K.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 122, p.52-54, out. 2014. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.08.009.

JAKKA, S. R. K.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. Fitness Costs Associated With Field-Evolved Resistance to Bt Maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 107, n. 1, p.342-351, 1 fev. 2014. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1603/ec13326.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops, 2011. Ithaca, NY: **ISAAA**, 2011.

KRUGER, M.; VAN RENSBURG, J. B. J.; BERG, J. van Den. Transgenic Bt maize: farmers' perceptions, refuge compliance and reports of stem borer resistance in South Africa. **Journal Of Applied Entomology**, [s.l.], v. 136, n. 1-2, p.38-50, 1 mar. 2011. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01616.x.

KASTEN JUNIOR, P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Comparative biological data of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) in two artificial diets and natural substrate. **Revista Engenharia Agrícola**, v. 53, p. 68-78, 1978.

KLÜMPER, W.; QAIM, M. A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.111-629, 3 nov. 2014. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111629.

KATHAGE, J.; QAIM, M. Economic impacts and impact dynamics of Bt (*Bacillus thuringiensis*) cotton in India. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 29, p.11652-11656, 2 jul. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203647109.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab-Endotoxin. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 8, p.4648-4657, 1 ago. 2003. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.8.4648-4657.2003.

LIU, J.; SONG, F.; ZHANG, J.; LIU, R.; HE, K.; TAN, J.; HUANG, D. Identification of vip3A-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel vip3A-type gene. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p.432-438, out. 2007. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02217.x.

LIU, Y.; TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; PATIN, A. L.; BARTLETT, A. C. Development time and resistance to Bt crops. **Nature**, [s.l.], v. 400, n. 6744, p.519-519, ago. 1999. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/22919.

MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Manejo da resistência: na era das plantas transgênicas. **O ecologia Australis**, v. 15, p. 291-302, 2011.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 34, p. 67-77, jan./jun. 2005.

MAIA, A. H. N. Definindo estratégias de manejo da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: o papel dos modelos de simulação. **Tese de doutorado 2010**, 79p.

MARTINELLI, S.; CLARK, P. L.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; FOSTER, J. E.; OMOTO, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin Of Entomological Research**, [s.l.], v. 97, n. 3, p.225-231, 24 maio 2007. Cambridge University Press (CUP). http://dx.doi.org/10.1017/s0007485307004944.

MARTINELLI, S.; BARATA, R. M.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; OMOTO, C. Molecular Variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations Associated to Maize and Cotton Crops in Brazil. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 99, n. 2, p.519-526, 1 abr. 2006. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1603/0022-0493-99.2.519

MORILLO, F.; NOTZ, A. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metomil. **Entomotropica**, Maracay, v. 16, p. 79-87, 2001.

NAGOSHI, R. N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R. L.; LOPEZ, J.; MACHADO, V. Identification and Comparison of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains in Brazil, Texas, and Florida. **Annals Of The Entomological Society Of America**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.394-402, 1 maio 2007. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746(2007)100[394:iacofa]2.0.co;2.

NAGOSHI, R. N.; ROSAS-GARCIA, N. M.; MEAGHER, R. L.; FLEISCHER, S. J.; WESTBROOK, J. K.; SAPPINGTON, T. W.; HAY-ROE, M.; THOMAS, J. M. G.; MURUA, G. M. Haplotype Profile Comparisons Between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations From Mexico With Those From Puerto Rico, South America, and the United States and Their Implications to Migratory Behavior. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 108, n. 1, p.135-144, 19 jan. 2015. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/tou044

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Genetic Complexity and Migration. **Florida Entomologist**, [s.l.], p.546-554, 2008. Florida Entomological Society. http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040-91.4.546.

OAKESHOTT, J. G; A FARNSWORTH, C.; EAST, P. D; SCOTT, C.; HAN, Y.; WU, Y.; RUSSELL, R. J. How many genetic options for evolving insecticide resistance in heliothine and spodopteran pests? **Pest Management Science**, [s.l.], v. 69, n. 8, p.889-896, 20 jun. 2013. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.3542.

ONSTAD, D.W. Insect Resistance Management: Biology, Economics, and Prediction. Second Edition. Edited by David W. Onstad. Academic Press. Amsterdam (The Netherlands) and Boston (Massachusetts). **The Quarterly Review Of Biology**, [s.l.], v. 90, n. 3, p.328-328, set. 2015. University of Chicago Press. http://dx.doi.org/10.1086/682608.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J; DOURADO, P. M; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperdain* Brazil. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 72, n. 9, p.1727-1736, 4 jan. 2016. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.4201.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.311-316, jun. 2001. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1590/s1519-566x2001000200016.

PITRE, H. N.; HOGG, D. B. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. **Journal of the Georgia Entomological Society**, Athens, v. 18, p. 182-186, 1983.

PASHLEY, D. P. Current Status of Fall Armyworm Host Strains. **The Florida Entomologist**, [s.l.], v. 71, n. 3, p.227-234, set. 1988. JSTOR. http://dx.doi.org/10.2307/3495425.

PROWELL, D. P.; MCMICHAEL, M.; SILVAIN, J.. Multilocus Genetic Analysis of Host Use, Introgression, and Speciation in Host Strains of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals Of The Entomological Society Of America**, [s.l.], v. 97, n. 5, p.1034-1044, 1 set. 2004. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[1034:mgaohu]2.0.co;2

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/

RANSON, H.; CLAUDIANOS, C.; ORTELLI, F.; ABGRALL, C.; HEMINGWAY, J.; SHARAKHOVA, M. V.; UNGER, M. F.; COLLINS, F. H.; FEYEREISEN, R. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. **Science**, [s.l.], v. 298, n. 5591, p.179-181, 4 out. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.1076781.

ROUSH, R. T. Two–toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? **Philosophical Transactions of The Royal Society Of London. Series B**: Biological Sciences, [s.l.], v. 353, n. 1376, p.1777-1786, 29 out. 1998. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1998.0330

ROUSH, R. T. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? **Pesticide Science**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.328-334, nov. 1997. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9063(199711)51:33.0.co;2-b

RAYMOND, B.; SAYYED, A. H.; WRIGHT, D. J. Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings Of The Royal Society B**: Biological Sciences, [s.l.], v. 272, n. 1571, p.1519-1524, 21 jun. 2005. The Royal Society. http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2005.3103

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 10, p.6276-6281, 1 out. 2005. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.10.6276-6281.2005.

ROUSH, R T; MCKENZIE, J. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.361-380, jan. 1987. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.002045.

SAS Institute In. JMP 15 Fitting Linear Models. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2019

SANTOS-AMAYA, O. F.; RODRIGUES, J. V. C.; SOUZA, T. C.; TAVARES, C. S.; CAMPOS, S. O.; GUEDES, R. N. C.; PEREIRA, E. J. G. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.243-265, 17 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/srep18243.

STORER, N. P.; KUBISZAK, M. E.; KING, J. E.; THOMPSON, G. D.; SANTOS, A. C.. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 110, n. 3, p.294-300, jul. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.007.

SORGATTO, R. J.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Survival and Development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt Cotton and Implications for Resistance Management Strategies in Brazil. **Environmental Entomology**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.186-192, 21 jan. 2015. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/ee/nvu018

SIEGFRIED, B. D.; SPENCER, T.; CRESPO, A. L.; STORER, N. P.; HEAD, G. P.; OWENS, E. D.; GUYER, D. Ten Years of Bt Resistance Monitoring in the European Corn Borer: What We Know, What We Don't Know, and What We Can Do Better. **American Entomologist**, [s.l.], v. 53, n. 4, p.208-214, 2007. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/ae/53.4.208.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 103, n. 4, p.1031-1038, 1 ago. 2010. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1603/ec10040.

SCHULER, T. H.; POTTING, R. P. J.; DENHOLM, I.; POPPY, G. M. Parasitoid behaviour and Bt plants. **Nature**, [s.l.], v. 400, n. 6747, p.825-826, ago. 1999. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/23605.

TABASHNIK, B. E. Evolution of Resistance to *Bacillus Thuringiensis*. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.47-79, jan. 1994. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.000403.

TABASHNIK, B. E.; CROFT, B. A. Managing Pesticide Resistance in Crop-Arthropod Complexes: Interactions Between Biological and Operational Factors1. **Environmental Entomology**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.1137-1144, 1 dez. 1982. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/ee/11.6.1137.

TABASHNIK, B. E. Determining the Mode of Inheritance of Pesticide Resistance with Backcross Experiments. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 84, n. 3, p.703-712, 1 jun. 1991. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/jee/84.3.703

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.510-521, jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2597.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L. J; HECKEL, D. G. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 12, p.1128-1131, 9 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1988.

TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIÈRE, Y. Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops: Definition, Theory, and Data. **Journal Of Economic Entomology**, [s.l.], v. 102, n. 6, p.2011-2025, 1 dez. 2009. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1603/029.102.0601.

TABASHNIK, B. E.; GOULD, F.; CARRIÈRE, Y. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. **Journal Of Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.904-912, jul. 2004. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00695.x.

TABASHNIK, B. E; GASSMANN, A. J; CROWDER, D. W; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.199-202, fev. 2008. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt1382.

WAQUIL, J. M. Manejo fitossanitário e ambiental: milho transgênico Bt e resistência das plantas ao ataque da lagarta-do-cartucho. **EMBRAPA Milho e Sorgo**, 2007.

WANG, P.; ZHAO, J.-z.; RODRIGO-SIMON, A.; KAIN, W.; JANMAAT, A. F.; SHELTON, A. M.; FERRE, J.; MYERS, J. Mechanism of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in a Greenhouse Population of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 4, p.1199-1207, 22 dez. 2006. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/aem.01834-06

WEISER, J. (1986) Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: Krieg, A. and Huger, A.M. (eds) Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft BerlinDahlem Heft 233. Paul Parey, Berlin, p. 37–50

YANG, F.; MORSELLO, S.; HEAD, G. P; SANSONE, C.; HUANG, F.; GILREATH, R. T; KERNS, D. L. F2 screen, inheritance and cross-resistance of field-derived Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected from Louisiana, USA. **Pest Management Science**, [s.l.], v. 74, n. 8, p.1769-1778, 11 maio 2018. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/ps.4805.

YU, X.; ZHENG, A.; ZHU, J.; WANG, S.; WANG, L.; DENG, Q.; LI, S.; LIU, H.; LI, P. Characterization of Vegetative Insecticidal Protein vip Genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 3, p.752-757, 21 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9782-3.

ZHAO, J.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H. L; ROUSH, R. T; EARLE, E. D; SHELTON, A. M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.1493-1497, 9 nov. 2003. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nbt907.

ZHAO, J.; CAO, J.; COLLINS, H. L.; BATES, S. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 102, n. 24, p.8426-8430, 6 jun. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409324102.