

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

Sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F: Implicações para o Manejo da Resistência de Insetos

Rodrigo José Sorgatto

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

**Piracicaba
2013**

Rodrigo José Sorgatto
Engenheiro Agrônomo

**Sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens*
(Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F: Implicações
para o Manejo da Resistência de Insetos**

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Sorgatto, Rodrigo José

Sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F: Implicações para o Manejo da Resistência de Insetos / Rodrigo José Sorgatto. - - Piracicaba, 2013.
78 p: il.

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

1. Algodão 2. Lagartas - Resistência 3. Manejo integrado 4. Plantas transgênicas
5. Proteínas de plantas I. Título

CDD 633.51
S713s

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

*A minha família em nome dos meus pais,
Antonia e Rogério.*

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, aos meus pais, Antonia e Rogério, minhas irmãs, Michele e Simone, minhas tias, Maria Bernarda e Teresinha, e aos meus avós, *Albino, Judite, José e Herminia (in memoriam)*, pelo amor e presença latente na minha vida.

À Gabriela Frias Jordan, minha namorada, pelo apoio, ajuda, amor, carinho e companhia.

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela amizade, conhecimentos transmitidos, orientação e a oportunidade profissional oferecida.

Ao amigo Dr. Oderlei Bernardi pela amizade, ensinamentos e auxílio na condução deste trabalho.

Ao amigo Dr. Samuel Martinelli pelas ideias ao trabalho e dúvidas sanadas.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por ser berço do conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pela dedicação e manutenção do nosso ambiente de trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos estagiários, funcionários e colegas da pós-graduação que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Alex S. Poltronieri,

Alexander R. Onishi, Alexandre D. Barbosa, Antonio R. B. Nascimento, Bruna L. Merlin, Daniel Bernardi, Danielle Thomazoni, Dariane S. O. Souza, Eloisa Salmeron, Everaldo B. Alves, Felipe A. Domingues, Gislaine A. A. O. Campos, Guilherme L. Miraldo, Isabela M. Dal Pozzo, José B. Malaquias, Juliano R. Farias, Karina C. Albernaz, Luis R. Sesso, Nádia F. B. Casarin, Natália A. Leite, Oscar A. B. N. Silva, Pablo F. Coronel, Rebeca S. Ribeiro, Renato A. C. de Lacerda, Renato J. Horikoshi, Ricardo F. Silveira, Vinícius Durrer e Vitória G. Valério, pela amizade, convívio, conhecimentos transmitidos e auxílios prestados no presente trabalho.

Aos amigos de minha casa em Piracicaba, Bruno C. Lago, Felipe M. Favarin, Gustavo Portz, Luiz C. B. Gottardo, Luiz H. Marcandalli, Paulo R. C. Lazzarini, Rodrigo E. M. de Almeida, Tiago Tezotto e Victor I. Ikeda, pela amizade, apoio e convívio.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797).....	17
2.2 Aspectos bioecológicos de <i>Pseudoplusia includens</i> (Walker, 1857)	19
2.3 Algodão Cry1Ac/Cry2Ab2.....	21
2.4 Algodão Cry1Ac/Cry1F	23
2.5 Manejo da Resistência de Insetos ao algodão Bt.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Criação e manutenção das populações de <i>S. frugiperda</i> e <i>P. includens</i>	31
3.2 Bioensaios com discos de folha e brácteas.....	32
3.3 Simulações de alimentação larval de <i>S. frugiperda</i> e <i>P. includens</i> com algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F.....	34
3.4 Biologia de <i>S. frugiperda</i> no algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e isolinha não-Bt.....	35
4 RESULTADOS	39
4.1 Estudos com <i>S. frugiperda</i>	39
4.1.1. Bioensaios com discos de folha e brácteas.....	39
4.1.2 Simulações de alimentação larval.....	45
4.1.3 Biologia de <i>S. frugiperda</i> no algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e isolinha não-Bt.....	51
4.2 Estudos com <i>P. includens</i>	54
4.2.1 Bioensaios com discos de folha.....	54
4.2.2 Simulações de alimentação larval.....	56
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	65

REFERÊNCIAS.....67

RESUMO

Sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F: Implicações para o Manejo da Resistência de Insetos

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) e *Pseudoplusia includens* (Walker) são importantes insetos-praga no algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) devido às injúrias de desfolha e destruição de estruturas reprodutivas no caso de *S. frugiperda*. Os eventos de algodão Bt que expressam as proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 (Bollgard[®] II) e Cry1Ac/Cry1F (WideStrike[™]) de *Bacillus thuringiensis* Berliner são ferramentas disponíveis para o controle dessas espécies-praga. A fim de subsidiar o Manejo da Resistência de Insetos (MRI) foram conduzidos estudos em laboratório para avaliar a sobrevivência e desenvolvimento de *S. frugiperda* e *P. includens* nos eventos de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F. Em bioensaios com discos de folhas, a eficácia de controle de neonatas nos dois eventos de algodão Bt foi superior a 80% para *S. frugiperda* e de 100% para *P. includens*. Em bioensaios com brácteas com neonatas de *S. frugiperda*, a eficácia de controle de ambos os eventos de algodão Bt também foi superior a 80%. As lagartas de *S. frugiperda* sobreviventes em algodão Bt apresentaram severa inibição de desenvolvimento larval em folhas (> 75%) e brácteas (> 44%). Em bioensaios com simulações de alimentação larval, as quais consistiam em grupos de lagartas alimentadas com o algodão Bt aos 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após a inoculação (DAI), *S. frugiperda* e *P. includens* demonstraram que a suscetibilidade dessas espécies diminuiu com o avançar do desenvolvimento larval. Para *S. frugiperda*, em todas as simulações de alimentação com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 houve lagartas que atingiram as fases de pupa e adulto. Por outro lado, quando expostas ao algodão Cry1Ac/Cry1F, somente algumas das lagartas de 5º e 6º ínstar atingiram as fases de pupa e adulto. Para *P. includens*, somente lagartas no 6º ínstar atingiram as fases de pupa e adulto quando alimentadas com os dois eventos de algodão Bt. Os parâmetros biológicos de *S. frugiperda* sobreviventes em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 foram afetados negativamente com aumento da duração da fase larval (\approx 9 dias), baixa viabilidade larval (1,4%) e de insetos que completaram o ciclo biológico (0,9%), aumento no intervalo entre gerações (\approx 9 dias) e redução da taxa intrínseca de crescimento populacional (\approx 83%). Os eventos de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F são promissores no controle de *S. frugiperda* e *P. includens*. No entanto, a atividade inseticida dos dois eventos de algodão Bt em lagartas de *S. frugiperda* e *P. includens* diminuiu com o desenvolvimento larval e essa constatação deve ser considerada em programas de MRI, especialmente na disposição espacial do refúgio.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*; *Pseudoplusia includens*; Algodão transgênico; Manejo da Resistência de Insetos

ABSTRACT

Survival and development of *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton Cry1Ac/Cry2Ab2 and Cry1Ac/Cry1F: Implications for Insect Resistance Management

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) and *Pseudoplusia includens* (Walker) are important insect pests in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) due to damage on leaves and reproductive structures in the case of *S. frugiperda*. The events of Bt cotton expressing proteins Cry1Ac/Cry2Ab2 (Bollgard® II) and Cry1Ac/Cry1F (WideStrike™) from *Bacillus thuringiensis* Berliner are tools available to control these pest species. To develop an Insect Resistance Management (IRM), we performed laboratory studies to evaluate the survival and development of *S. frugiperda* and *P. includens*. In fresh leaf discs bioassays, the control efficacy of neonates in both Bt cotton events was greater than 80% mortality for *S. frugiperda* and 100% for *P. includens*. In fresh bracts bioassays to neonates of *S. frugiperda*, the control efficacy of both Bt cotton events was over 80%. The surviving larvae of *S. frugiperda* in Bt cotton showed severe growth inhibition (weight and instar) in leaves (> 75%) and bracts (> 44%). In simulations feed bioassays with larvae, which consisted of groups of larvae fed on Bt cotton at 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 days after inoculation (DAI), *S. frugiperda* and *P. includens* showed that the susceptibility of species decreases with advancing larval development. For *S. frugiperda*, in all feed simulations with cotton Cry1Ac/Cry2Ab2 had caterpillars that reached pupae and adult stages. Moreover, when exposed to cotton Cry1Ac/Cry1F, only some caterpillars of 5th and 6th instars reached pupae and adult stages. For *P. includens*, only some caterpillars of 6th instar reached pupae and adult stages when fed with two events of Bt cotton. The biological parameters of *S. frugiperda* fed on cotton Cry1Ac/Cry2Ab2 were negatively affected with increasing duration of the larval stage (\approx 9 days), reduced larval viability (1,4%) and insects that completed the life cycle (0,9%), increased the generation time (\approx 9 days) and decreased the intrinsic rate of increase (\approx 83%). The events of cotton Cry1Ac/Cry2Ab2 and Cry1Ac/Cry1F are promising for the control of *S. frugiperda* and *P. includens*. However, the insecticidal activity of both events of Bt cotton in larvae of *S. frugiperda* and *P. includens* decreases through larval development and this finding should be considered in programs of MRI, especially in the spatial arrangement of the refuge.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; *Pseudoplusia includes*; Transgenic cotton; Insect Resistance Management

1 INTRODUÇÃO

Na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) no Brasil, há uma importância crescente de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) que ocasionam desfolha, além da destruição de estruturas reprodutivas do algodoeiro no caso de *S. frugiperda* (SANTOS, 1997; SANTOS, 2011). O algodão Bt que expressa genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner é uma estratégia de controle desses insetos-praga, especialmente aqueles eventos que expressam mais de uma proteína inseticida (algodão piramidado), dentre os quais destacam-se Bollgard® II (Cry1Ac/Cry2Ab2) e WideStrike™ (Cry1Ac/Cry1F).

O algodão Bt piramidado tende a ser uma estratégia eficiente no controle de *S. frugiperda* e *P. includens* em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) do algodoeiro no Brasil. Alguns trabalhos nos EUA demonstraram boa eficácia desses eventos do algodão Bt para essas pragas-alvo (ADAMCZYK et al., 2008; SIEBERT et al., 2008; SIVASUPRAMANIAM et al., 2008; TINDALL et al., 2009; GREENBERG; LI; LIU, 2010; AKIN et al., 2011; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011). No entanto, para *S. frugiperda* tem sido relatada sobrevivência de lagartas em folhas e botões florais do algodão Bt que expressa Cry1Ac/Cry2Ab2 (STEWART et al., 2001; CHITKOWSKI et al., 2003; SIVASUPRAMANIAM et al., 2008; GREENBERG; LI; LIU, 2010; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011) e Cry1Ac/Cry1F (ADAMCZYK; GORE, 2004; ADAMCZYK et al., 2008; SIEBERT et al., 2008; TINDALL et al., 2009; GREENBERG; LI; LIU, 2010; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011). Por outro lado, *P. includens* apresentou baixa sobrevivência em plantas de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001; CHITKOWSKI et al., 2003; AKIN et al., 2011) e mortalidade total no algodão Cry1Ac/Cry1F (TINDALL et al., 2009).

O fato de *S. frugiperda* e *P. includens* sobreviverem em algodão Bt que expressa duas proteínas inseticidas aumenta os riscos de evolução da resistência dessas espécies a proteínas inseticidas de Bt. Para *S. frugiperda*, já há relato de resistência à proteína inseticida Cry1F em milho Bt em Porto Rico (STORER et al., 2010). Para *P. includens* foram verificadas diferenças significativas na suscetibilidade de populações a inseticidas à base de *B. thuringiensis* (MASCARENHAS; BOETHEL, 1997), sendo que a menor suscetibilidade a esses inseticidas foi encontrada em populações coletadas no algodão Cry1Ac (MASCARENHAS et al., 1998). Portanto, a implementação de estratégias de Manejo de

Resistência de Insetos (MRI) é de extrema importância para retardar a evolução da resistência dos insetos-alvo e prolongar a vida útil das proteínas inseticidas expressas no algodão Bt.

Estratégias de manejo da resistência, tais como refúgio, plantas de alta dose e pirâmide de genes, tem sido propostas para o manejo da resistência de insetos-pragas a plantas Bt (GOULD, 1988; McGAUGHEY; WHALON, 1992). O refúgio tem sido recomendado em associação à estratégia de alta dose ou pirâmide de genes pelo emprego de mais de uma proteína inseticida. O objetivo do refúgio é reduzir a pressão de seleção pelo acasalamento de possíveis indivíduos resistentes provenientes de plantas Bt com os indivíduos suscetíveis de plantas não-Bt, formando a progênie em heterozigose e funcionalmente recessiva à planta Bt (GOULD, 1998; BRAVO; SOBERÓN, 2008). A disposição espacial do refúgio no ambiente de cultivo pode ser adotada de duas formas: estruturada, onde o plantio de áreas com plantas Bt e não-Bt ocorre em proximidade (GOULD, 1998); e a mistura de sementes de plantas Bt e não-Bt para a semeadura, e consequentemente, a origem de plantios heterogêneos (GOULD, 1988; GOULD; ANDERSON, 1991). Entretanto, a dificuldade em adotar a mistura de sementes está na necessidade de assumir que a herança da resistência é recessiva e os insetos-alvo não podem mover-se entre plantas, pois, caso ocorra, poderá acelerar a evolução da resistência (MALLET; PORTER, 1992). Portanto, a existência de uma espécie-alvo com alta mobilidade (*S. frugiperda*, por exemplo), aliada à situação de mistura de sementes e/ou contaminação de cultivos Bt por plantas daninhas e voluntárias, comprometem a tecnologia Bt pelo aumento do potencial de evolução da resistência de pragas-alvo (MALLET; PORTER, 1992; TABASHNIK, 1994b; ANDOW, 2008; GLAUM; IVES; ANDOW, 2012).

Outro aspecto que pode favorecer a evolução da resistência é a variação dos níveis de expressão das proteínas inseticidas em algodão Bt. Essas variações ocorrem durante o desenvolvimento da planta e entre as diferentes estruturas da planta (folha, flor, botão floral, maçã, entre outras) (SIVASUPRAMANIAN et al., 2008; SIEBERT et al., 2009). Essa variação na concentração das proteínas expressas pode afetar a exposição das pragas-alvo e alterar as respostas biológicas (ADAMCZYK et al., 2001; KRANTHI et al., 2005), sabendo-se que os insetos-alvo diminuem sua suscetibilidade a proteínas Bt ao longo do desenvolvimento larval (BAI et al., 1993; ASHFAQ; YOUNG; McNEW, 2001; ALI; LUTTRELL, 2009; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011). Essa constatação somada à menor suscetibilidade natural das espécies *S. frugiperda* e *P. includens* a proteínas inseticidas de Bt quando comparadas com outras espécies-alvo, como *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) (LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; SIVASUPRAMANIAN et al., 2008),

pode permitir a sobrevivência diferencial de alguns indivíduos e, conseqüentemente, favorecer a evolução da resistência, uma vez que os indivíduos heterozigotos poderiam estar sobrevivendo nessa situação.

Para os eventos de algodão Bt que expressam a(s) proteína(s) Cry1Ac, Cry1Ac/Cry2Ab2 ou Cry1Ac/Cry1F, alguns estudos demonstraram que ocorrem oscilações nos níveis de expressão das proteínas inseticidas entre partes da planta, como variações em folhas inferiores e superiores e entre folhas e estruturas reprodutivas (GREENPLATE, 1999; SIVASUPRAMANIAM et al., 2008; SIEBERT et al., 2009). Há também as variações ao longo do ciclo de desenvolvimento, como o decréscimo dos níveis de proteínas após o botão floral (GREENPLATE, 1999; ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001) e a expressão das proteínas inseticidas pode ser diferente entre proteínas inseticidas distintas em uma mesma planta Bt (SIEBERT et al., 2009).

Adicionalmente, o comportamento larval pode possibilitar a sobrevivência de pragas-alvo pela exposição de sub-doses das proteínas inseticidas em partes da planta e/ou em fases de desenvolvimento da planta em que ocorre diminuição dos níveis dessas proteínas. No caso de *S. frugiperda*, os dois primeiros ínstaes predominam na porção inferior e interna da planta e alimentam-se de folhas, e a partir do 3º ínstar as lagartas passam a se alimentar de estruturas reprodutivas (ALI; LUTTRELL; PITRE, 1990; LUTTRELL; MINK, 1999). *P. includens* é um inseto-praga que na fase larval predomina na porção inferior da planta na face abaxial da folha (SANTOS, 2011). Essas características bioecológicas das pragas-alvo, associadas à variação de expressão das proteínas na planta podem permitir a sobrevivência dos insetos e acelerar o processo de evolução da resistência.

Nesse sentido, para subsidiar programas de MRI foram realizados diversos estudos para avaliar a atividade biológica das proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F expressas em algodão Bt contra *S. frugiperda* e *P. includens*, e efeitos sobre parâmetros de crescimento populacional de *S. frugiperda*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

S. frugiperda é uma praga migratória e endêmica no Hemisfério Ocidental nas regiões tropicais e subtropicais (LUGINBILL, 1928). As lagartas são polípagas e alimentam-se de uma grande variedade de hospedeiros, sendo o milho, amendoim, sorgo e grama-bermuda seus hospedeiros preferenciais (SPARKS, 1979), e o montante de hospedeiros soma mais de 60 espécies de plantas (LUGINBILL, 1928). Além disso, a ocorrência de *S. frugiperda* em plantas voluntárias e plantas daninhas no ambiente agrícola pode ser um nicho ecológico inicial para o crescimento populacional da espécie (SILVA, 2000).

No Brasil, *S. frugiperda* é um importante inseto-praga do algodão (SANTOS, 2011), milho (SILVA, 2000; VALICENTE, 2008), soja (MOSCARDI; KASTELIC, 1985; SILVA, 2000), arroz (BOTTON et al., 1998; MARTINS et al., 2000), amendoim (ISIDRO; ALMEIRA; PEREIRA, 1997), trigo (TAKAHASHI; NAKANO; OSI, 1980; SALVADORI, 2000) e sorgo (CORTEZ; WAQUIL, 1997), dentre outras culturas.

Na cultura do algodão, a introdução de cultivares favoráveis ao desenvolvimento de *S. frugiperda* acarretou no aumento da importância da espécie como inseto-praga (SARRO, 2006). No algodoeiro, ocasiona danos desde a emergência até a maturação das plantas (SANTOS, 2011). O hábito de atacar estruturas reprodutivas também insere *S. frugiperda* no complexo de lagartas que atacam as maçãs, e conseqüentemente, ocorrem danos diretos à produção de algodão (LUTTRELL; MINK, 1999).

Os adultos possuem elevada capacidade de dispersão, com relatos de captura em armadilhas luminosas localizadas em plataformas petrolíferas no Golfo do México distanciadas 32, 74, 106 e 160 Km da costa (SPARKS et al., 1986) e em altura de 84m em torres de TV na Geórgia (CALLAHAN et al., 1972). No Brasil, em função da alimentação diversificada e disponível durante o ano todo aliada às condições de clima favorável, a sua distribuição ocorre em todas as regiões do território nacional (CRUZ, 1999). O adulto possui hábito noturno e durante o início da noite move-se entre as plantas hospedeiras que são adequadas à alimentação, oviposição e acasalamento (SPARKS, 1979). As posturas são colocadas em grupos de 100 a 200 ovos, totalizando 1500 a 2000 ovos por fêmea (VALICENTE, 2008). Não demonstra preferência de oviposição entre soja, algodão, milho e milheto (BARROS; TORRES; BUENO, 2010). No algodoeiro, os ovos são colocados sob a superfície inferior das folhas nas porções média e inferior da planta (ALI et al., 1989).

As lagartas de *S. frugiperda* ao eclodir apresentam grande mobilidade na planta e entre plantas de algodão, sendo que nos primeiros dois ínstaes alimentam-se de folhas e a partir do 3º ínstar iniciam o ataque a estruturas reprodutivas (ALI; LUTTRELL; PITRE, 1990). Esse ataque é maior em botões florais em pleno florescimento, mas quando da formação das maçãs, ocorre redução de ataque em botões florais, com ataque preferencial às maçãs (BARROS et al., 2010). As lagartas neonatas apresentam pouco sucesso de colonização de maçãs do algodoeiro, no entanto, quando alimentadas inicialmente com folhas e, posteriormente, com maçãs do algodoeiro, as lagartas apresentam desenvolvimento e reprodução similar à alimentação em folhas de milho ou algodão (BARROS; TORRES; BUENO, 2010). As lagartas completam o ciclo larval entre 12 a 30 dias (PARRA; HADDAD, 1989) em cerca de seis ínstaes, e pupam no solo (SPARKS, 1979).

O crescimento populacional de *S. frugiperda* depende das viabilidades de ovos e lagartas. Sob condições de campo na cultura do algodão, as médias de viabilidade de ovos e de lagartas de 1º ínstar foram de 89 e 2,9%, respectivamente, e do 2º ao 6º ínstar houve uma viabilidade entre 30 a 60% (ALI; LUTTRELL, 1990). Somado a isso, os parâmetros de tabela de vida e fertilidade de *S. frugiperda* em estudos de laboratório com alimentação em folhas nos primeiros dias e em maçãs até a pupação demonstram um tempo médio de geração de 27,4 dias, taxa intrínseca de crescimento de 0,215 e fertilidade total de 1587,3 ovos por fêmea (BARROS; TORRES; BUENO, 2010). Isso demonstra a importância do número de ovos ovipositados pela fêmea e a capacidade de dispersão da espécie no ambiente de produção para o sucesso de crescimento populacional.

Quanto às estratégias de controle, devido à polifagia e a dispersão de mariposas provenientes de outras culturas (milho, milheto, gramíneas e soja), inseticidas são amplamente usados na América Latina para o controle de *S. frugiperda* (ANDREWS, 1988). O sistema de manejo de *S. frugiperda* pela aplicação de inseticidas de amplo espectro tem sido um procedimento inadequado no manejo de pragas (SPARKS, 1979). Nos EUA, conforme o verão avança, a severidade de danos de *S. frugiperda* aumenta e o uso de inseticidas tem sido recomendado a fim de controlar ou diminuir a densidade populacional do inseto (BASS, 1978). O uso indiscriminado de inseticidas e a adoção massal de milho Bt para o controle de *S. frugiperda* têm levado à diminuição da suscetibilidade e a caracterização da resistência para vários inseticidas e proteínas de Bt (YU, 1992; DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; AL-SARAR; HALL; DOWNER, 2006; STORER et al., 2010).

A existência de raças-hospedeiro de *S. frugiperda* é conhecida e influi nas medidas de controle e manejo de resistência deste inseto, citando-se as raças “milho” e “arroz” pelos

mecanismos de isolamento reprodutivo (PASHLEY; MARTIN, 1987; PASHLEY; HAMMOND; HARDY, 1992). Essas raças também foram encontradas entre populações coletadas em plantas de milho e arroz no Rio Grande do Sul (BUSATO et al., 2004). Tal processo de especiação é importante no detalhamento de qual a raça-hospedeiro ocorre na cultura de algodão e quais as culturas estão associadas à densidade populacional e estratégias de manejo. As populações que ocorrem em milho e algodão formam um único grupo e há troca de material genético entre elas em uma determinada região de cultivo (MARTINELLI et al., 2006), fato relevante na dinâmica populacional de *S. frugiperda* nas condições do ambiente agrícola brasileiro.

O manejo de *S. frugiperda* em nível de campo tem sido difícil devido à sobreposição e a sucessão de cultivos agrícolas ao longo do ano no Brasil. A tecnologia Bt figura como uma nova tática no controle de *S. frugiperda* e tem se mostrado eficaz em culturas agrícolas (milho e algodão). Entretanto, estratégias de MRI são necessárias para garantir maior vida útil da tecnologia, pois fatores da espécie-praga como a existência de raças-hospedeiro, a distribuição endêmica, os relatos de resistência e os aspectos bioecológicos de polifagia e amplo crescimento populacional em culturas agrícolas (milho, algodão, milho, aveia, trigo) favorecem a evolução da resistência a proteínas Bt no atual sistema agrícola brasileiro.

2.2 Aspectos bioecológicos de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857)

P. includens pertence à sub-família Plusiinae e a distribuição da espécie é endêmica no continente americano, estendendo-se desde a zona temperada da América do Norte até o restante da América (EICHLIN; CUNNINGHAM, 1978). Possui hábito alimentar polífago e sabe-se que aparentemente a espécie tem preferência por oviposição na soja, amendoim e tomate (MARTIN; LINGREN; GREENE, 1976); no entanto, vários hospedeiros são conhecidos, citando-se algodão, alface, feijão, crisântemo, fumo, alfafa e brássicas em geral (HENSLEY; NEWSOM; CHAPIN, 1964; CANERDAY; ARANT, 1966; MARTIN; LINGREN; GREENE, 1976; EICHLIN; CUNNINGHAM, 1978).

Em soja, *P. includens* é uma das espécies-praga que ocasiona grande desfolha (REID; GREENE, 1973). Na cultura do algodão, sua importância como lagarta desfolhadora é crescente, especialmente em áreas de cultivo próximas à cultura da soja, onde o inseto foi encontrado em altas densidades (BURLEIGH, 1972; BEACH; TODD, 1986; SANTOS, 2011). No estado da Louisiana, *P. includens* foi encontrada em altas populações em algodão e soja, e, devido ao cultivo em áreas próximas das duas culturas, pode haver dispersão de

adultos da soja para o algodão (BURLEIGH, 1972). Há uma hipótese de que o rápido incremento das populações de *P. includens* em algodão seja devido à dispersão de indivíduos adultos da cultura da soja, e pelo consumo de néctar de flores do algodão ocorre o aumento da oviposição desses insetos (BURLEIGH, 1972). Adicionalmente, adultos que receberam alimentação aumentaram significativamente a oviposição, longevidade e frequência de acasalamento em comparação a adultos privados da alimentação (JENSEN; NEWSOM; GIBBENS, 1974), o que reforça a possibilidade de dispersão entre soja e algodão. No Brasil, o algodoeiro geralmente é semeado após a soja e apresenta um ciclo vegetativo maior, determinando a permanência de *P. includens* no campo e a dispersão das mariposas da soja para o algodão (SANTOS, 2011).

Além da dispersão, a fase adulta garante um alto potencial reprodutivo do inseto no algodoeiro cultivado. A fêmea adulta vive cerca de 15 dias e pode ovipositar mais de 600 ovos, sendo que o acasalamento de adultos de *P. includens* ocorre à noite e os ovos são depositados individualmente (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Em algodão e soja, os ovos predominam na face abaxial da folha, e na distribuição vertical ocorre preferência de oviposição pelas fêmeas na fase vegetativa e em pré-floração pela porção superior da planta e na fase reprodutiva pela porção mediana do dossel (JOST; PITRE, 2002). A fase larval, sob dieta artificial e temperatura de 27° C, possui seis ínstaes, podendo variar de cinco a sete, e período médio entre a eclosão da lagarta e a fase pupa foi de 16,8 dias (SHOUR; SPARKS, 1981). As lagartas são caracterizadas pela movimentação característica de mede-palmo (SILVA, 2000) e a distribuição vertical das lagartas na planta de algodão foi maior no terço inferior das plantas (SANTOS, 2011). Na ocasião de pupação, o inseto tece uma teia sob as folhas de soja e permanece até a emergência do adulto (HOFFMANN-CAMPO, 2000).

O controle de *P. includens* no ambiente de produção tem sido realizado com o uso de mistura de inseticidas pela dificuldade de atingir as lagartas nas plantas de soja e algodão. A distribuição das lagartas na porção inferior da planta de algodão dificulta o contato das mesmas com os inseticidas, principalmente considerando que as grandes infestações ocorrem após o fechamento da cultura (SANTOS, 2011). Nesse sentido, a tecnologia Bt propiciou uma nova ferramenta para manejo da espécie-praga nas culturas da soja e algodão pela expressão de proteínas inseticidas em toda planta. No entanto, a eficácia dos eventos de Bt sob *P. includens* e as condições de sobreposição e sucessão de cultivos de soja e algodão no Brasil aumentam a pressão de seleção sob a espécie-praga e o potencial de evolução da resistência a proteínas Bt, e conseqüentemente, a implementação de estratégias de MRI é requerida.

2.3 Algodão Cry1Ac/Cry2Ab2

No Brasil, a cultura do algodão foi pioneira na tecnologia Bt resistente a insetos, sendo representada pela aprovação comercial em 2005 do evento MON 531 (Bollgard®) que expressa a proteína Cry1Ac. A inserção do gene *cry2ab2* que codifica a proteína inseticida Cry2Ab2 no algodão Bollgard® originou o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 fornecendo amplo espectro de controle sob pragas-alvo em geral (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001; MARCHOSKY et al., 2001; STEWART et al., 2001; CHITKOWSKI et al., 2003; UDIKERI et al., 2007; SIVASUPRAMANIAM et al., 2008; GREENBERG; LI; LIU, 2010; AKIN et al., 2011; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011).

O algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 atua no controle de insetos por ataque múltiplo devido à pirâmide de genes (McGAUGHEY; WHALON, 1992), pois as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 apresentaram interação independente e aditiva para as espécies *S. frugiperda*, *H. zea* e *H. virescens* (GREENPLANTE et al., 2003). Estudos com incorporação de tecido liofilizado de algodão Cry1Ac e Cry1Ac/Cry2Ab2 de diferentes estruturas vegetais (folha terminal, folha expandida, botão floral, bráctea, pétalas, cálice, pólen, óvulo e maçã pequena) em dieta artificial demonstrou alta atividade das proteínas Cry1Ac e Cry1Ac/Cry2Ab2 na redução de desenvolvimento de *H. zea*, apresentando efeitos significativos de forma isolada para Cry1Ac e de forma aditiva para Cry1Ac e Cry2Ab2 (SIVASUPRAMANIAN et al., 2008).

A atividade inseticida do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 para *S. frugiperda* é derivada de uma maior toxicidade da proteína Cry2Ab2 em comparação a Cry1Ac (GREENPLATE et al., 2003), sendo que existe baixa atividade da proteína Cry1Ac em relação a Cry2Ab2 para *S. frugiperda* (SIVASUPRAMANIAN et al., 2008). Isso foi confirmado em bioensaios com folhas do algodão Cry1Ac para *S. frugiperda*, evidenciando uma baixa atividade inseticida de Cry1Ac, uma vez que não houve diferenças de mortalidade em comparação à isolinha não-Bt (ADAMCZYK et al., 1998). Bioensaios em laboratório com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 para *S. frugiperda* demonstraram alta eficácia de controle em folhas (45 a 96% de mortalidade) (ADAMCZYK et al., 2008; GREENBERG; LI; LIU, 2010; AKIN et al., 2011; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011) e em estruturas reprodutivas como botões florais, flores e maçãs (31 a 97% de mortalidade) (STEWART et al., 2001; CHITKOWSKI et al., 2003; HARDKE, 2006). Entretanto, o método de bioensaio e o tempo de exposição são variáveis a serem consideradas nas respostas biológicas obtidas. Bioensaios com lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda* em estruturas reprodutivas (botão floral, flor e maçã) apresentaram diferenças significativas na mortalidade em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2

com plantas conduzidas em uma localidade (Stoneville) e sem diferenças significativas em outro local (Winnsboro) (HARDKE, 2006). Em outro estudo, lagartas em 2º ínstar alimentadas com flores de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 completaram o ciclo com efeitos negativos nos parâmetros biológicos (duração da fase larval), no entanto, não foram encontradas diferenças nas viabilidades larval e pupal (CHITKOWSKI et al., 2003). Efeitos de sub-doses mediante à utilização de diferentes concentrações de tecido liofilizado do algodão Cry1Ac/Cry2Ab afetaram negativamente o peso e duração da fase larval e a emergência do adulto dessa espécie (ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011).

A atividade biológica e aditividade das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 expressas no algodão Bt para *P. includens* não foram estudadas; no entanto, foram encontradas baixas sobrevivências e injúrias de plantas no campo (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001; CHITKOWSKI et al., 2003) e em bioensaios com folhas (AKIN et al., 2011). No algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, a proteína Cry2Ab2 parece ter maior atividade biológica na mortalidade de *P. includens* que a proteína Cry1Ac, tendo em vista que em condições de campo não ocorrem diferenças na ocorrência de *P. includens* em algodão convencional e algodão Cry1Ac (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001; AKIN et al., 2011) e a viabilidade larval não é afetada pela alimentação com o algodão Cry1Ac em comparação à isolinha não-Bt (FUNICHELLO et al., 2011). Para o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 houve baixos níveis de infestação de *P. includens* comparado aos tratamentos com algodão convencional e algodão Cry1Ac que não diferiram entre si (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001; AKIN et al., 2011). A baixa mortalidade de *P. includens* no algodão Cry1Ac deve estar ligada à concentração da proteína Cry1Ac expressa nas folhas, visto que a soja Bt que expressa a proteína Cry1Ac apresentou mortalidade total de lagartas em discos de folhas e quando da infestação artificial das plantas (BERNARDI et al., 2012).

Outro aspecto que afeta a eficiência de controle de eventos de algodão Bt é a alteração nos níveis de expressão das proteínas ao longo do desenvolvimento e entre estruturas da planta. No algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, a expressão das proteínas inseticidas Cry1Ac e Cry2Ab2 demonstrou que a expressão das proteínas é distinta e varia entre diferentes estruturas da planta para cada proteína (SIVASUPRAMANIAM et al., 2008) e pode estar associada à transformação genética da planta, visto que os genes *cry1Ac* e *cry2Ab2* foram inseridos isoladamente por métodos de transformação distintos (CERA, 2008; CERA, 2010). Um fato importante é que não há diferença na expressão das proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 pelas isolinhas do algodão Cry1Ac e algodão Cry2Ab2 em comparação aos níveis do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001; GREENPLATE et al., 2003).

Adicionalmente, há relatos de oscilações na expressão das proteínas ao longo do desenvolvimento do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, como o declínio das proteínas na fase reprodutiva e na senescência da planta (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001).

Mesmo com as variações na expressão de Cry1Ac/Cry2Ab2 não houve diferenças na mortalidade de *S. frugiperda* em bioensaios com folhas em diferentes estádios de desenvolvimento da planta, a qual variou de 75 a 90% (GREENBERG; LI; LIU, 2010). No entanto, alterações na expressão de proteínas ao longo do ciclo podem causar decréscimo da atividade inseticida, conforme constatado para *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac (KRANTHI et al., 2005; OLSEN et al., 2005) e em algodão Cry1Ab (FITT; MARES; LLEWELLYN, 1994). Para respostas biológicas obtidas de diferentes partes da planta, foram encontradas diferenças na sobrevivência de *H. zea* entre os componentes florais (brácteas, pétalas, anteras, entre outros) do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (GORE; LEONARD; ADAMCZYK, 2001).

Os estudos apresentados evidenciam a eficácia e características gerais do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2; no entanto, a essa planta Bt faltam informações sobre a eficácia quando sob surtos de insetos-alvo (*S. frugiperda* e *P. includens*, como exemplos), controle em ínstares avançados de desenvolvimento e movimentação das plantas Bt para plantas não-Bt adjacentes (cultivada ou daninha) no cultivo.

2.4 Algodão Cry1Ac/Cry1F

O algodão Cry1Ac/Cry1F possui um amplo espectro de controle de lepidópteros-praga, entre os quais incluem as espécies *S. frugiperda* e *P. includens* (ADAMCZYK; GORE, 2004; ADAMCZYK et al., 2008; SIEBERT et al., 2008; TINDALL et al., 2009; GREENBERG; LI; LIU, 2010; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011).

Para *S. frugiperda*, o algodão Cry1Ac/Cry1F atua com eficácia de controle de 75 a 100% de mortalidade em folhas (ADAMCZYK; GORE, 2004; ADAMCZYK et al., 2008; SIEBERT et al., 2008; TINDALL et al., 2009; GREENBERG; LI; LIU, 2010; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011) e 60 a 92% de mortalidade em estruturas reprodutivas (ADAMCZYK; GORE, 2004; HARDKE, 2006). O algodão Cry1Ac/Cry1F, avaliado ao longo do período reprodutivo da planta, demonstrou elevada eficácia (>80%), mas teve queda com a conseqüente senescência da planta (ADAMCZYK et al., 2008). Em infestações artificiais de *S. frugiperda* em algodão Cry1Ac/Cry1F no campo, o inseto teve dificuldade de sobrevivência e colonização, ocasionando menos danos em brácteas

e maçãs em comparação ao algodão não-Bt (TINDALL et al., 2009). Lagartas de 3º ínstar de *S. frugiperda* alimentadas com estruturas reprodutivas (botão floral, flor e maçã) apresentaram diferenças significativas na mortalidade em algodão Cry1Ac/Cry1F, sendo que houve mortalidade larval completa dos indivíduos alimentados com botões florais e poucos indivíduos sobreviventes quando alimentados com flores e maçãs (HARDKE, 2006). Em ensaios de campo, a ocorrência natural e sobrevivência de *S. frugiperda* em estruturas reprodutivas em algodão Cry1Ac/Cry1F apresentaram baixas frequências em flores, enquanto que, no algodão não-Bt houve ocorrência em botões florais, flores e maçãs (SIEBERT et al., 2008). A incorporação de tecido liofilizado do algodão Cry1Ac/Cry1F em dieta artificial demonstrou que as concentrações maiores do tecido apresentaram efeitos negativos em parâmetros biológicos (peso larval, duração de fases de larva e pupa), evidenciando os efeitos de sub-doses das proteínas expressas pela planta (ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011).

A atividade inseticida da proteína Cry1F para *S. frugiperda* é maior em comparação à proteína Cry1Ac no algodão Cry1Ac/Cry1F (ADAMCZYK; GORE, 2004; ADAMCZYK et al., 2008; SIEBERT et al., 2008; GREENBERG; LI; LIU, 2010). Para *S. frugiperda*, bioensaios com plantas que expressavam Cry1Ac ou Cry1F isoladamente, ou ambas na mesma planta demonstraram alta eficácia daquelas que expressavam somente Cry1F e Cry1Ac/Cry1F, confirmando a baixa atividade inseticida da planta que expressa somente Cry1Ac (ADAMCZYK; GORE, 2004). O fator responsável por esse efeito diferenciado das proteínas é a maior suscetibilidade de *S. frugiperda* à proteína Cry1F frente a Cry1Ac e a tolerância natural da espécie a Cry1Ac (LUO; BANKS; ADANG, 1999; SIVASUPRAMANIAN et al., 2008). Somado a isso, bioensaios com algodão Cry1Ac e algodão Cry1Ac/Cry1F para *S. frugiperda* confirmaram a alta eficácia do algodão Cry1Ac/Cry1F e a baixa atividade inseticida do algodão Cry1Ac (ADAMCZYK et al., 2008; SIEBERT et al., 2008; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011).

P. includens é totalmente controlada e causa baixa desfolha no algodão Cry1Ac/Cry1F (TINDALL et al., 2009). A ação inseticida das proteínas Cry1Ac e Cry1F para *P. includens* é menos conhecida e parece que a atividade da proteína Cry1F é maior que a proteína Cry1Ac. Na atividade das proteínas na planta, o algodão Cry1F (“Algodão 281”) apresenta maior atividade inseticida sob *P. includens* que o algodão Cry1Ac (“Algodão 3006”) (J-BCH, 2006; CERA, 2009). Dados adicionais que contribuem para essa hipótese são a alta eficácia do algodão Cry1Ac/Cry1F no controle de *P. includens* (TINDALL et al., 2009), a baixa atividade do algodão Cry1Ac em bioensaios laboratoriais com folhas (AKIN et al., 2010) e a ocorrência

em campo da espécie-alvo não diferiu entre o algodão Cry1Ac e o algodão convencional (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001; CHITKOWSKI et al., 2003). Por outro lado, o algodão Cry1Ac afetou parâmetros biológicos (viabilidade e duração da fase larval) de *P. includens*, sugerindo que o algodão Cry1Ac cause uma redução do crescimento populacional da espécie-praga (ASHFAQ; YOUNG; McNEW, 2001).

Com relação à toxicologia, as proteínas Cry1Ac e Cry1F parecem compartilhar o mesmo sítio de ação em espécies de lepidópteros da família Noctuidae. Estudos envolvendo sítios de ação das proteínas inseticidas Cry1Ac e Cry1F em *H. virescens* e *H. zea* indicaram que ambas as proteínas compartilham o mesmo sítio de ligação na membrana do mesêntero (EPA, 2005). Indiretamente, mediante à seleção de indivíduos resistentes a proteínas inseticidas de Bt podem-se conhecer possíveis competições em sítios de ação. Assim, uma população de *H. virescens* foi selecionada em condições de laboratório para a proteína Cry1Ac (razão de resistência em torno de 10.000 vezes) e apresentou resistência cruzada às proteínas Cry1F e Cry1Ab (GOULD et al., 1995), e adicionalmente, foi reconhecido um gene autossômico recessivo em *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) com altas taxas de resistência para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1F (TABASHNIK et al., 1997). Portanto, o compartilhamento de sítio de ligação e a existência de resistência cruzada entre as proteínas Cry1Ac e Cry1F são fatores importantes para o MRI do algodão Cry1Ac/Cry1F, pois a planta pode não apresentar o manejo por ataque múltiplo (pirâmide de genes) através da expressão das duas proteínas inseticidas para *S. frugiperda* e *P. includens*.

Quanto à expressão das proteínas inseticidas no algodão Cry1Ac/Cry1F, os níveis da proteína Cry1Ac foram aproximadamente de 3 a 20 vezes menores que Cry1F nas folhas, botões florais, flores, maçãs e sementes, exceto para o pólen que foi o único tecido vegetal com maior expressão da proteína Cry1Ac que a proteína Cry1F (EPA, 2004). Adicionalmente, sabe-se que os níveis de expressão do algodão Cry1Ac/Cry1F são similares às plantas que expressam as proteínas isoladamente e que os promotores utilizados nos cassetes de expressão dos genes *cry1Ac* e *cry1F* são distintos (CERA, 2009). Nas fases de desenvolvimento, a expressão de ambas as proteínas é extremamente dinâmica entre os tecidos vegetais. A expressão da proteína Cry1F no algodão Cry1Ac/Cry1F geralmente aumenta nas folhas expandidas e terminais ao longo do desenvolvimento da planta, enquanto ocorre um decréscimo nos níveis da proteína Cry1Ac nas folhas terminais e nas maçãs (SIEBERT et al., 2009). O promotor (4ocs)DeltaMas2', utilizado no cassete de expressão do gene *cry1F*, é regulado pelos hormônios de crescimento da planta e o meristema apical inibe a expressão deste promotor, e conseqüentemente, diminui a expressão da proteína Cry1F nos tecidos em

desenvolvimento (LANGRIDE et al., 1989). A ocorrência de maiores danos no algodão Cry1Ac/Cry1F por *S. frugiperda* no dossel superior em comparação aos dosséis mediano e inferior (ADAMCZYK et al., 2008) é devido ao fato de que folhas completamente expandidas possuem maiores níveis da proteína Cry1F em comparação com outras partes da planta (folhas terminais em expansão, botões florais, flores e maçãs) (SIEBERT et al., 2008).

Os dados apresentaram fatores da eficácia do algodão Cry1Ac/Cry1F e da planta Bt (proteínas inseticidas, níveis de expressão etc); no entanto, é preciso conhecer a eficácia do algodão sob surtos populacionais de espécies-alvo (*S. frugiperda* e *P. includens*, como exemplos) e as respostas biológicas de insetos-alvo em diferentes ínstares e que possuem mobilidade entre plantas Bt para plantas adjacentes não-Bt (cultivada ou daninha) para definir estratégias de MRI. Além disso, o relato de resistência de *S. frugiperda* ao milho Cry1F (STORER et al., 2010) aliado à baixa atividade da proteína Cry1Ac ao inseto-praga e à resistência cruzada entre Cry1Ac e Cry1F (GOULD et al., 1995; TABASHNIK et al., 1997) devem ser considerados no manejo da resistência desse inseto-praga ao algodão Cry1Ac/Cry1F.

2.5 Manejo da Resistência de Insetos ao algodão Bt

Os eventos de plantas Bt necessitam de um programa de Manejo de Resistência de Insetos (MRI) para preservar sua vida útil (GOULD, 1998). A fim de retardar a evolução da resistência, primeiramente é necessário compreendê-la como processo biológico de seleção direcional para alelos pré-existentes em uma população e que conferem a característica fenotípica da resistência (HARTLEY et al., 2006; FFRENCH-CONSTANT, 2007).

Em plantas Bt, a resistência é dada por mudanças evolutivas em uma população de insetos em resposta a uma proteína inseticida expressa na planta Bt para controlar um inseto-praga (PITTENDRIGH et al., 2008), sendo considerado indivíduo resistente à planta Bt aquele que sobrevive, desenvolve, acasala e gera descendentes nesta esta planta (ANDOW, 2008). A capacidade genética de evolução da resistência a proteínas Bt está presente provavelmente em todos os insetos, sendo que a herança da resistência, estabilidade da resistência e custo adaptativo têm sido relatados para várias espécies (GILL; COWLES; PIETRANTONIO, 1992; BAUER, 1995).

A evolução da resistência no campo de pragas-alvo de eventos Bt foi relatada em diversos estudos, dentre os quais: *Busseola fusca* (Füller) (Lepidoptera: Noctuidae) ao milho Cry1Ab na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007); *S. frugiperda* ao milho Cry1F em Porto

Rico (STORER et al., 2010); *H. zea* ao algodão Cry1Ac (LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006) e ao algodão Cry1Ac/Cry2Ab no sudoeste dos EUA (ALI; LUTTRELL, 2007); *H. punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry2Ab2 na Austrália (DOWNES; PARKER; MAHON, 2010); *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) ao milho Cry3Bb1 nos EUA (GASSMANN et al., 2011); e *P. gossypiella* ao algodão Cry1Ac na Índia (DHURUA; GUJAR, 2011).

Para a espécie *S. frugiperda*, a resistência ao milho Cry1F em Porto Rico foi caracterizada como herança autossômica, recessiva, sem efeito maternal e com razão de resistência da ordem de 450 vezes (STORER et al., 2010). A herança da resistência autossômica e recessiva somada à razão de resistência encontrada sugere que a alteração dos receptores de proteínas de Bt no mesêntero pode ser responsável pela resistência dos insetos (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Em *P. includens* foram encontradas diferenças significativas para inseticidas Bt (MASCARENHAS; BOETHEL, 1997) e diminuição da suscetibilidade a inseticidas biológicos de Bt quando os insetos foram coletados no algodão Cry1Ac (MASCARENHAS et al., 1998).

Na Austrália, a frequência de alelos de resistência à proteína Cry2Ab2 em *H. punctigera* coletada em vários hospedeiros foi estimada durante cinco safras e verificou-se uma evolução da frequência de alelos da ordem de 0,002 na safra 2004/05 para 0,012 na safra 2008/09, a qual representa um aumento em torno de 6 vezes na frequência alélica (DOWNES; PARKER; MAHON, 2010). Nesse país, a proteína Cry2Ab2 somente está presente no algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (CERA, 2010), portanto, a pressão de seleção da espécie somente deve-se ao emprego do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2.

Nessa ótica, o cenário no Brasil é pior que o exemplo da Austrália, pois espécies-alvo polípagas, como *S. frugiperda* e *P. includens*, sofrem pressão de seleção sucessiva e contínua com a sucessão e sobreposição em cultivos Bt (soja, milho e algodão) por proteínas de Bt que podem apresentar resistência cruzada (HERRERO et al., 2001; HERNÁNDEZ; FERRÉ, 2005; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2008; CACCIA et al., 2010).

Sendo assim, o Manejo de Resistência de Insetos (MRI) ao algodão Bt é de extrema importância no Brasil a fim de retardar a evolução da resistência dos insetos-alvo e prolongar a vida útil das proteínas inseticidas. Desse modo, estratégias para retardar a seleção de indivíduos resistentes a plantas Bt têm sido propostas, tais como refúgio, plantas de alta dose e pirâmide de genes (GOULD, 1988; McGAUGHEY; WHALON, 1992). O refúgio consiste na estratégia por moderação e sua implementação é associada à estratégia de alta dose da

proteína inseticida na planta ou de pirâmide de genes pelo emprego de mais de uma proteína inseticida que atua sobre as pragas-alvo da tecnologia Bt.

Atualmente, a nova geração de plantas Bt busca a expressão de mais de um gene de *B. thuringiensis*, sendo a prática conhecida como pirâmide de genes quando ambas as proteínas possuem alta atividade biológica (IVES et al., 2011) e assume-se que a resistência a estas proteínas seja governada por *loci* distintos (McGAUGHEY; WHALON, 1992; TABASHNIK, 1994a). A vantagem da pirâmide de genes, como o caso do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, está na provável evolução da resistência de forma mais lenta em comparação ao uso de uma única proteína inseticida na planta (ROUSH, 1998).

O refúgio objetiva reduzir a pressão de seleção pelo acasalamento de indivíduos homozigotos resistentes de plantas Bt e homozigotos suscetíveis de plantas não-Bt, formando a progênie em heterozigose e funcionalmente recessiva a planta Bt (GOULD, 1998; BRAVO; SOBERÓN, 2008). A adoção do refúgio apresenta variáveis de dimensão e disposição espacial, consistindo a primeira na área de refúgio em relação à área total (cultivo com planta Bt + refúgio) e a segunda na forma de implantação do refúgio no ambiente de cultivo Bt.

Tecnicamente, o refúgio é determinado por cálculos de modelagem que visam um suprimento de indivíduos suscetíveis à área de Bt que garantam alta probabilidade de acasalamentos dos indivíduos oriundos das plantas Bt. No Brasil, as empresas detentoras da tecnologia Bt recomendam geralmente a área de refúgio entre 10 a 20% da área cultivada para plantas Bt com somente uma proteína inseticida em comparação ao refúgio de 5% para plantas Bt com mais de uma proteína inseticida, sendo que o complexo de lepidópteros-alvo controlados por plantas Bt com uma ou mais proteínas Bt pouco se alterou. Entretanto, nas condições da cultura do algodão, a qual possui um amplo complexo de lepidópteros-alvo, os eventos de algodão Bt com mais de uma proteína inseticida (Cry1Ac/Cry2Ab2, Cry1Ac/Cry1F e Cry1Ab/Cry2Ae) liberados no país aumentaram o espectro de pragas-alvo (inclusão de *S. frugiperda* e *P. includens*, por exemplo) frente ao algodão com somente uma proteína inseticida (Cry1Ac) e as recomendações de refúgio tendem a diminuir como o caso do milho Bt. Essa tomada de decisão desafia os princípios do manejo da resistência do complexo de insetos-alvo quanto aos manejos por moderação (refúgio) e por ataque múltiplo (pirâmide de genes) no algodão piramidado.

A disposição espacial do refúgio no ambiente de cultivo pode ser de duas formas: estruturada, onde o plantio de áreas com plantas Bt e não-Bt ocorre em proximidade e assegura o acasalamento aleatório com indivíduos oriundos do cultivo Bt (GOULD, 1998) e a mistura de sementes de plantas Bt e não-Bt para a semeadura, e consequentemente, a origem

de plantios heterogêneos (GOULD, 1988; GOULD; ANDERSON, 1991). Entretanto, a dificuldade em adotar a mistura de sementes está na necessidade de assumir que a herança da resistência seja recessiva e os insetos-alvo não podem mover-se entre plantas, o que caso ocorra, contribui para a evolução da resistência (MALLET; PORTER, 1992; TABASHNIK, 1994b; ANDOW, 2008). A mistura de plantas Bt (Cry1Ac) e não-Bt em cultivo de brócoli acelerou o processo de evolução da resistência de *P. xylostella* à proteína Cry1Ac durante 5 gerações em comparação ao refúgio estruturado (TANG et al., 2001). Essas constatações demonstraram que indivíduos heterozigotos passam a ter vantagens adaptativas em condições de mistura de sementes e a dominância funcional da resistência pode ser alterada.

A mobilidade e alimentação entre plantas Bt e não-Bt, seja em condições de mistura de sementes ou presença de plantas daninhas e/ou voluntárias hospedeiras dos insetos-alvo, podem acelerar o processo de evolução da resistência (GLAUM; IVES; ANDOW, 2012). Além disso, é conhecida a habilidade de lepidópteros-alvo em evitar as proteínas de Bt expressas em algodão, tais como *H. armigera* (ZHANG et al., 2004), *H. zea* (BENEDICT et al., 1993; HALCOMB et al., 2000; GORE; LEONARD; ADAMCZYK, 2001; GORE et al., 2002; ABEL; ADAMCZYK, 2004; GORE; ADAMCZYK; BLANCO, 2005; LU et al., 2011), *H. virescens* (GOULD; ANDERSON, 1991; BENEDICT et al., 1992; BENEDICT et al., 1993; PARKER; LUTTRELL, 1999; HALCOMB et al., 2000), *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (BERDEGUÉ; TRUMBLE; MOAR, 1996) e *T. ni* (LI; GREENBERG; LIU, 2006; LI; GREENBERG; LIU, 2007). Dessa forma, no Brasil, com a presença de espécies-alvo polífagas e endêmicas no algodoeiro, como o caso de *S. frugiperda* e *P. includens*, a mobilidade e alimentação larval entre plantas Bt e não-Bt no ambiente de cultivo podem expor esses insetos a sub-doses de proteínas inseticidas e acelerar o processo de evolução da resistência (MALLET; PORTER, 1992; TABASHNIK, 1994b; ANDOW, 2008). Sob condições de mistura de sementes, *H. virescens* demonstrou mobilidade do algodão Cry1Ac para o algodão não-Bt (PARKER; LUTTRELL, 1999) e sabe-se que essa espécie altera o comportamento no algodão Cry1Ac (BENEDICT et al., 1993) e evita proteínas inseticidas de Bt em dieta artificial (GORE; ADAMCZYK; BLANCO, 2005).

O comportamento larval de *S. frugiperda* e *P. includens* em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F e em condições de mistura de sementes é desconhecido. Portanto, possíveis alterações comportamentais na alimentação e mobilidade nos eventos de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F são fatores biológicos importantes no manejo da resistência desses insetos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação e manutenção das populações de *S. frugiperda* e *P. includens*

A população de *S. frugiperda* foi coletada em área de milho não-Bt no município de Rio Verde-GO no ano 2011, e de *P. includens*, em área de soja no município de Paulínia-SP e mantida em laboratório por mais de 10 anos. Desde a coleta, essas populações foram mantidas livres de pressão de seleção com inseticidas ou proteínas de Bt. As lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* e *P. includens* foram mantidas em dieta artificial até a fase de pupação em copos plásticos com volume de 50 mL, vedados com uma placa acrílica circular. A dieta artificial provida às lagartas foi à base de feijão branco (Adaptado de GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) (Tabela 1). Em cada copo plástico, foram inoculadas 2 lagartas e na ocasião da pupação, as pupas foram retiradas e acondicionadas em placas de Petri (12 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) forradas com papel filtro e colocadas em gaiolas para emergência. Após a emergência, os adultos foram repassados para gaiolas cilíndricas de PVC (24 cm altura × 14,5 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco e fechadas na parte superior com tecido tipo “voil”. O alimento para os adultos foi constituído de algodão saturado com solução aquosa de mel a 10%. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. A cada 2 dias, os ovos foram coletados e acondicionados em recipientes plásticos (250 mL) contendo papel filtro umedecido com água destilada e incubados em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h. Após a eclosão, as lagartas foram inoculadas em dieta artificial retornando a criação de manutenção, sendo o restante utilizado para realização dos bioensaios.

Tabela 1 - Composição da dieta artificial utilizada para a criação de *S. frugiperda* e *P. includens* (Adaptação de GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976)

Ingrediente	Quantidade
Feijão branco (g)	75,00
Germe de trigo (g)	60,00
Proteína de soja (g)	30,00
Caseína (g)	30,00
Levedura de cerveja (g)	37,50
Ágar (g)	22,50
Ácido ascórbico (g)	3,96
Ácido sórbico (g)	1,98
Metilparahidroxibenzoato (nipagin) (g)	3,30
Cloridrato de tetraciclina 50% (mg)	124,00
Formaldeído 10% (mL)	15,90
Complexo vitamínico (mL)	9,90
Água (mL)	1200,00
Composição do complexo vitamínico	
Niacinamida (g)	1,00
Pantotenato de cálcio (g)	1,00
Riboflavina (g)	0,50
Tiamina (g)	0,25
Piridoxina (g)	0,25
Ácido fólico (g)	0,10
Biotina (mg)	0,02
Vitamina B12 (1.000 mg.mL ⁻¹) (mL)	2,00
Água (mL)	1000,00

3.2 Bioensaios com discos de folha e brácteas

Para realização dos bioensaios, foram utilizadas plantas de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (Bollgard® II – evento MON 15985, Monsanto do Brasil Ltda) e a isolinha convencional não-Bt (DeltaOpal®), e do algodão Cry1Ac/Cry1F (PhytoGen PSC 355 - WideStrike™ - evento 281-24-236/3006-210-23, Dow AgroSciences Industrial Ltda) e a isolinha convencional não-Bt (PhytoGen PSC 355), os quais foram cultivados em casa de vegetação. A semeadura foi realizada em vasos plásticos de 12 L (4 plantas por vaso) contendo terra e substrato vegetal na proporção 2:1 entre os meses de outubro de 2011 a fevereiro de 2012. Os bioensaios com discos de folha foram iniciados na emissão do botão floral, 14 dias após a emissão do botão floral, florescimento, 14 dias após o florescimento e 28 dias após o florescimento. Os

bioensaios com brácteas foram realizados com plantas em florescimento, 14 dias após o florescimento e 28 dias após o florescimento. Para os bioensaios com discos de folha retiraram-se folhas completamente expandidas do terço superior das plantas. Em laboratório, com auxílio de um vazador foram retirados discos de folha (2,4 cm de diâmetro) e acondicionados sobre uma mistura não geleificada de ágar-água a 2,5% e disco de papel filtro em placas de acrílico com 6 e 12 células para *S. frugiperda* e *P. includens*, respectivamente. Nos bioensaios com brácteas para *S. frugiperda*, essas foram retiradas do 6º, 7º e 8º nó da planta independente da estrutura reprodutiva (botão floral, flor ou maçã). As brácteas foram acondicionadas em placas de acrílico de 6 células, conforme metodologia descrita anteriormente. Para ambos os bioensaios (folha e bráctea), em cada célula foi inoculada uma neonata de *S. frugiperda* ou *P. includens* (até 24 h de idade) com auxílio de um pincel fino, e para vedação foram usados um filme plástico e a tampa da placa. Nos bioensaios com *S. frugiperda*, aos três e seis dias após a inoculação procedeu-se a substituição dos discos de folha ou brácteas e aos nove dias foi realizada a avaliação final, quando se contabilizou a mortalidade, peso e ínstar das lagartas sobreviventes. Nos bioensaios com *P. includens*, aos cinco dias após a inoculação avaliou-se a mortalidade, peso e ínstar das lagartas sobreviventes. Para as duas espécies-praga foram consideradas mortas as lagartas sem movimento aparente após leve toque com estilete e as lagartas com tamanho $\leq 2,0$ mm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento/espécie, sendo cada repetição constituída de 12 e 6 neonatas nos bioensaios com discos de folha e brácteas, respectivamente. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada na temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Os dados de mortalidade dos tratamentos com algodão Bt foram corrigidos a partir dos respectivos tratamentos com algodão não-Bt (ABBOTT, 1925). Para avaliação do peso, as lagartas sobreviventes em cada repetição foram pesadas em balança analítica, e a redução do desenvolvimento larval calculada e corrigida a partir do tratamento com a isolinha não-Bt. Os dados de porcentagem de mortalidade, redução de desenvolvimento e enfezamento larval foram submetidos à análise de normalidade de distribuição (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade de variâncias (HARTLEY, 1950). Posteriormente, os dados foram comparados pelo teste de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$) (PROC NPAR1WAY) (SAS INSTITUTE, 2000). A análise da atividade biológica entre o algodão Bt e a isolinha não-Bt foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$), e entre os períodos avaliados do algodão-Bt pelo teste de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$) (dois períodos avaliados) ou pelo teste de *Kruskal-*

Wallis ($P \leq 0,05$) (mais de dois períodos avaliados) (PROC NPAR1WAY) (SAS INSTITUTE, 2000).

3.3 Simulações de alimentação larval de *S. frugiperda* e *P. includens* com algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F

Para os bioensaios de simulação de alimentação larval com *S. frugiperda* e *P. includens*, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação conforme descrito anteriormente. Os bioensaios iniciaram-se quando as plantas atingiram o florescimento ($> 50\%$ das plantas com flores). A partir desse momento, foram retiradas folhas completamente expandidas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (Bollgard[®] II) e algodão Cry1Ac/Cry1F (WideStrike[™]), e as respectivas isolinhas não-Bt. As folhas utilizadas nos bioensaios foram coletadas a partir do 7º nó do caule principal (orto-trópico) da planta. As simulações de alimentação larval (S-0, S-3, S-6, S-9, S-12, S-15, S-18 e S-C), por toda a fase larval, corresponderam ao fornecimento de algodão Bt e não-Bt (Tabela 2). As simulações S-0, S-3, S-6, S-9, S-12, S-15 e S-18 consistiram em grupos de lagartas que foram alimentadas com o algodão Bt a partir do dia 0 (inoculação), 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após a inoculação (DAI) em recipientes individuais, e por todo o período larval, sendo que anteriormente à alimentação com o algodão Bt, foi fornecido algodão não-Bt como alimento. Na simulação S-C as lagartas somente foram alimentadas com o algodão não-Bt durante todo o desenvolvimento larval. Os bioensaios foram realizados em copos plásticos (100 mL) contendo uma camada ágar-água (2,5%) de 10 mL e papel-filtro. O alimento foi substituído a cada 3 dias, quando avaliou-se a sobrevivência larval, e, para 10 lagartas previamente identificadas o tamanho da cápsula cefálica e peso. Este procedimento foi realizado até a pupação ou mortalidade completa nas simulações. Após a pupação, as pupas foram acondicionadas em tubos de vidro (8,5 cm de comprimento \times 2,5 cm de diâmetro) contendo em seu interior um papel-filtro (2 cm²), o qual foi umedecido a cada 2 dias, até a emergência. O experimento foi conduzido em câmaras climatizadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por simulação de alimentação, sendo cada repetição representadas por 5 lagartas, totalizando 50 lagartas por simulação. As variáveis avaliadas foram sobrevivência larval, viabilidade dos estágios de larva e pupa, duração da fase larval, de pupa e larva-adulto, biomassa de pupas com 24 h de idade, e taxa de emergência. As variáveis avaliadas foram submetidas às análises de normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade de variâncias (HARTLEY, 1950). A viabilidade de larvas e pupas e a taxa de

emergência foram submetidas à comparação entre duas simulações pelo teste de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$), e mais de duas simulações pelo teste de *Kruskal-Wallis* ($P \leq 0,05$) (PROC NPAR1WAY) (SAS INSTITUTE, 2000). A sobrevivência ao longo do desenvolvimento larval, por tratar-se de medida repetida no tempo, foi submetida à análise de *Qui-quadrado* ($P \leq 0,05$), e os tratamentos discriminados pelas diferenças dos quadrados mínimos (LSMEANS) (PROC GENMOD, SAS INSTITUTE, 2000). Os dados de duração das fases de larva, pupa e larva-adulto e biomassa de pupas nas simulações de alimentação larval de *S. frugiperda* com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 foram submetidos ao teste de *Kruskal-Wallis* ($P \leq 0,05$) (PROC NPAR1WAY) (SAS INSTITUTE, 2000). Os dados de duração das fases de larva, pupa e larva-adulto e biomassa de pupas nas simulações de alimentação larval de *S. frugiperda* com o algodão Cry1Ac/Cry1F e de *P. includens* com ambos os eventos de algodão Bt (Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F) foram submetidos à comparação de médias pelo teste *t* de *Student* ($P \leq 0,05$) (PROC TTEST) quando apresentaram normalidade de distribuição e homogeneidade de variâncias, e submetidos à análise pelo teste de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$) na ausência de tais pressupostos estatísticos (PROC NPAR1WAY) (SAS INSTITUTE, 2000).

Tabela 2 - Simulações de alimentação larval de *S. frugiperda* e *P. includens* com folhas de algodão Bt e não-Bt

Simulações de alimentação larval	Dias após a inoculação (DAI)						
	0	3	6	9	12	15	18
S-0	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
S-3	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
S-6	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
S-9	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt	Bt
S-12	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt	Bt
S-15	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt	Bt
S-18	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Bt
S-C (Controle)	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt	Não-Bt

3.4 Biologia de *S. frugiperda* no algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e isolinha não-Bt

Para o estudo de biologia de *S. frugiperda* em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, esse foi cultivado em casa de vegetação conforme descrito anteriormente. Os bioensaios foram iniciados quando as plantas atingiram o florescimento (> 50% das plantas com flores). Os tratamentos consistiram de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (Bollgard® II) e a isolinha não-Bt (DeltaOpal®). Nos bioensaios utilizaram-se folhas completamente expandidas e coletadas a partir do 7º nó do caule principal (orto-trópico) da planta. Para tanto, neonatas de *S.*

frugiperda (até 24 h após eclosão) foram inoculadas em grupos de 20 indivíduos em copos plásticos (100 mL) contendo um pedaço de folha de algodão Bt ou não-Bt (10 cm²), a qual foi acondicionada sobre uma camada de 10 mL de ágar-água (2,5%), sendo a folha de algodão separada da camada de ágar-água geleificada por um papel-filtro. Aos 6 dias após a inoculação, as lagartas sobreviventes foram individualizadas em tubos de vidro (8,5 cm de comprimento × 2,5 cm de diâmetro) previamente esterilizados, contendo um pedaço de folha de algodão e uma secção de papel-filtro (2 cm²) umedecido, e tamponados com algodão hidrófobo. O alimento foi substituído a cada 2 dias até a pupação. As pupas foram acondicionadas em recipientes de vidro similares e a umidade foi fornecida por meio de papel-filtro, o qual foi umedecido a cada 2 dias até a emergência. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: duração e viabilidade dos estágios de ovo, larva e pupa, e do período ovo-adulto, biomassa larval aos 18 dias após a inoculação, biomassa de pupas com 24 h de idade, razão sexual, e longevidade, períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, fecundidade e fertilidade de adultos. A razão sexual foi calculada pela fórmula: $rs = \text{fêmea}/(\text{macho} + \text{fêmea})$. A duração e viabilidade dos estágios de ovo, larva, pupa e período ovo-adulto foram determinadas em observações diárias. A longevidade, fecundidade e fertilidade dos adultos foram avaliadas a partir da formação de 15 casais/tratamento em gaiolas de PVC (23 cm de altura × 10 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel-jornal (substrato de oviposição) e fechadas na parte superior com tecido “voil”. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10% fornecida em algodão saturado. Diariamente realizou-se a contagem dos ovos, e revisou-se a mortalidade de adultos. Para determinação do período embrionário e viabilidade foram incubados cerca de 100 ovos da segunda postura de cada casal. Os ovos foram acondicionados em tubos de vidro (8,5 cm de comprimento × 2,5 cm de diâmetro), contendo em seu interior um papel-filtro (2 cm²), que foi umedecido diariamente com água destilada, sendo vedados na parte superior com filme plástico. As posturas foram observadas diariamente contando-se o número de lagartas eclodidas. O experimento foi conduzido em condições a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60\% \pm 10\%$ e fotofase de 14h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 100 repetições para o tratamento algodão Bt (Cry1Ac/Cry2Ab2) e 10 repetições para o tratamento algodão não-Bt, sendo cada repetição constituída de 20 lagartas.

Os dados de duração e viabilidade dos estágios de desenvolvimento, biomassa larval e de pupas e parâmetros biológicos de adultos (longevidade de adultos, período de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, e fertilidades diária e total) foram submetidos a análise de normalidade de dados (SHAPIRO; WILK, 1965) e homogeneidade de variâncias

(HARTLEY, 1950). Os dados de duração e viabilidade dos estágios de desenvolvimento, biomassa larval, biomassa de pupas, e períodos de pré-oviposição e pós-oviposição foram submetidos à comparação de médias pelo teste de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$) (PROC NPAR1WAY) (SAS INSTITUTE, 2000). Os dados de longevidade de adultos (machos e fêmeas), período de oviposição, fertilidades diária e total foram submetidos à comparação de médias pelo teste *t* de *Student* ($P \leq 0,05$) (PROC TTEST) (SAS INSTITUTE, 2000). O possível desvio na proporção dos sexos foi comparado utilizando o teste de *Qui-quadrado* (χ^2) ($P \leq 0,05$) (PROC FREQ) (SAS INSTITUTE, 2000). Para obtenção da tabela de vida de fertilidade calculou-se o intervalo médio entre gerações (T), taxa líquida de reprodução (R₀), taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a razão finita de crescimento (λ). Os parâmetros de tabela de vida de fertilidade foram obtidos e comparados por meio da programação “Lifetable.sas” (MAIA; LUIZ; CAMPANHOLA, 2000) e comparados pelo teste *t* *bilateral* ($P \leq 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2000).

4 RESULTADOS

4.1 Estudos com *S. frugiperda*

4.1.1. Bioensaios com discos de folha e brácteas

As proteínas Cry1Ac/Cry2Ab e Cry1Ac/Cry1F expressas na folha do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F ocasionaram alta mortalidade de *S. frugiperda*, variando entre 80 a 100% (Figuras 1 e 2). Nos bioensaios com discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, a mortalidade de *S. frugiperda* foi significativamente superior à isolinha não-Bt na emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 3,91$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após a emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 3,79$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P = 0,0002$), florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,02$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 3,81$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$) e 28 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 3,93$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) (Figura 1). Ao longo do ciclo do algodoeiro houve diferenças significativas na mortalidade de *S. frugiperda*, sendo que aos 14 dias após a emissão do botão floral, a atividade inseticida do algodão Bt Cry1Ac/Cry2Ab2 foi a menor (aproximadamente 80% de mortalidade) dentre todos os períodos avaliados, mas não diferiu da avaliação aos 14 dias após o florescimento ($\chi^2 = 18,95$, g.l. = 4, $P = 0,0008$) (Figura 1).

Mesmo havendo sobrevivência de algumas lagartas de *S. frugiperda* no algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, essas tiveram uma significativa inibição de desenvolvimento quando comparadas à isolinha não-Bt, na emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 4,15$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após a emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 4,00$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,06$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e 28 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,15$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) (Tabela 3). O enfezamento, representado pelas lagartas que não atingiram o 3º ínstar aos 9 dias após a inoculação foi significativamente maior no algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 na emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 4,02$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após a emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 3,77$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,01$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e 28 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,07$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), em relação à isolinha-Bt (Tabela 3).

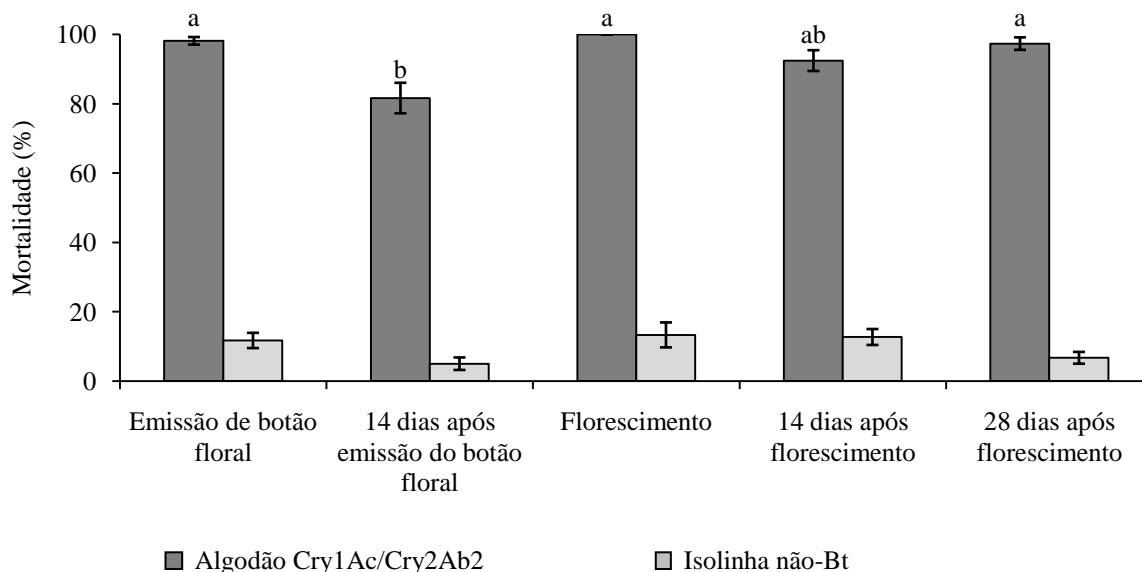


Figura 1 - Mortalidade larval (\pm EP) de *S. frugiperda* em discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt em todos os períodos avaliados. Médias seguidas de mesma letra nas barras do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 não diferem entre si (*Kruskal-Wallis* a $P \leq 0,05$)

Tabela 3 - Inibição do desenvolvimento e enfezamento larval de *S. frugiperda* em discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 na fase reprodutiva do algodoeiro

Tratamentos	Fenologia do algodoeiro ¹				
	Emissão do botão floral	14 dias após emissão do botão floral	Florescimento	14 dias após florescimento	28 dias após florescimento
Inibição do desenvolvimento (%)					
Cry1Ac/Cry2Ab2	85,6 \pm 0,2	91,8 \pm 0,3	100,0 \pm 0,0	82,3 \pm 0,8	93,0 \pm 0,1
Isolinha não-Bt	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	-	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Enfezamento (%)					
Cry1Ac/Cry2Ab2	100,0 \pm 0,0	93,2 \pm 2,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
Isolinha não-Bt	23,4 \pm 3,2	11,7 \pm 3,6	-	31,2 \pm 4,1	6,7 \pm 1,7

⁽¹⁾Valores representam médias \pm EP. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt para os parâmetros biológicos em todos os períodos avaliados.

O algodão Cry1Ac/Cry1F também ocasionou elevada mortalidade ($> 95\%$) de *S. frugiperda* (Figura 2). Diferenças significativas na mortalidade entre o algodão Cry1Ac/Cry1F e a isolinha não-Bt foram observadas em todas as fases de desenvolvimento avaliadas, na emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 3,89$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$), 14 dias após a emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 4,02$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), florescimento ($U = 45,0$, $z = -3,85$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$), 14 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 3,88$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$) e 28 dias após o florescimento ($U = 28,0$, z

= -3,80, $n_1 = 7$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$) (Figura 2). O algodão Cry1Ac/Cry1F não apresentou diferenças na mortalidade de *S. frugiperda* ao longo do desenvolvimento da planta para as fases avaliadas ($\chi^2 = 9,27$, g.l. = 4, $P = 0,0546$) (Figura 2).

Os indivíduos sobreviventes do algodão Cry1Ac/Cry1F apresentaram inibição de desenvolvimento significativamente superior aos sobreviventes da isolinha não-Bt na emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 4,15$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), florescimento ($U = 45,0$, $z = -4,09$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e 14 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,06$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$). Resultados semelhantes foram verificados para o enfezamento larval, em que as lagartas sobreviventes da alimentação com o algodão Cry1Ac/Cry1F apresentaram enfezamento completo e significativamente superior a isolinha não-Bt aos 14 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,07$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e altos valores de enfezamento na emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 3,94$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e florescimento ($U = 45,0$, $z = -3,85$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$) (Tabela 4).

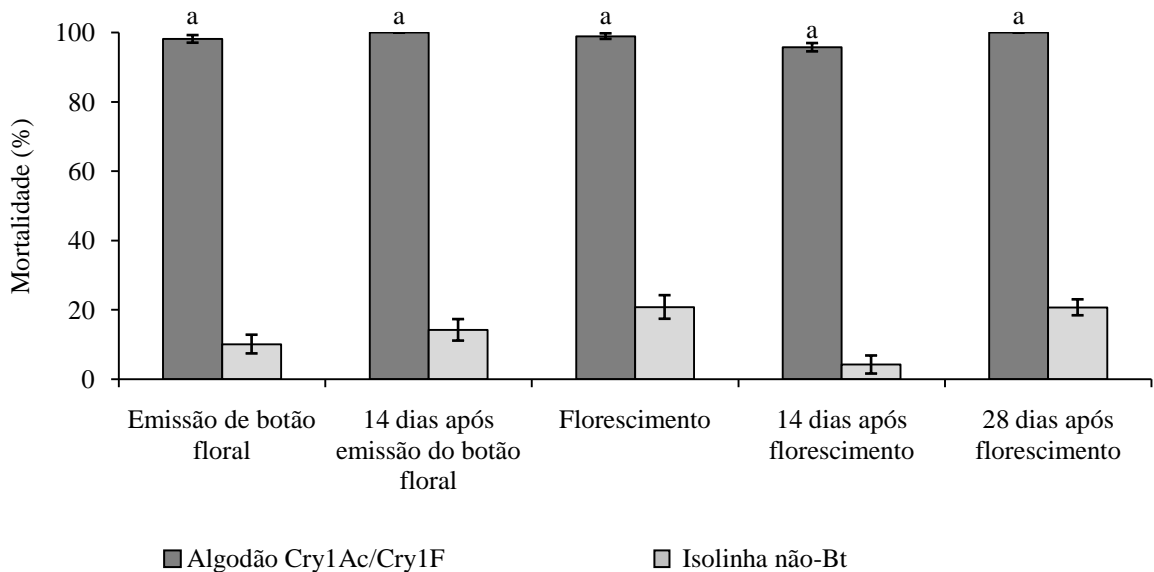


Figura 2 - Mortalidade larval (\pm EP) de *S. frugiperda* em discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry1F. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry1F e a isolinha não-Bt em todos os períodos avaliados. Médias seguidas de mesma letra nas barras do algodão Cry1Ac/Cry1F não diferem entre si (*Kruskal-Wallis* a $P \leq 0,05$)

Tabela 4 - Inibição do desenvolvimento e enfezamento larval de *S. frugiperda* em discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry1F na fase reprodutiva do algodoeiro

Tratamentos	Fenologia do algodoeiro ¹				
	Emissão de botão floral	14 dias após emissão do botão floral	Florescimento	14 dias após florescimento	28 dias após florescimento
Inibição do desenvolvimento (%)					
Cry1Ac/Cry1F	76,5 ± 0,2	100,0 ± 0,0	90,9 ± 0,1	96,8 ± 0,1	100,0 ± 0,0*
Isolinha não-Bt	0,0 ± 0,0	-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
Enfezamento (%)					
Cry1Ac/Cry1F	99,2 ± 0,8	100,0 ± 0,0	99,2 ± 0,8	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0*
Isolinha não-Bt	12,5 ± 3,8	-	30,2 ± 3,8	5,0 ± 2,5	-

⁽¹⁾Valores representam médias ± EP. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry1F e a isolinha não-Bt para os parâmetros biológicos em todos os períodos avaliados.

Nos bioensaios com brácteas houve alta toxicidade das proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 ocasionando mais de 80% de mortalidade, sendo significativamente diferente da isolinha não-Bt ($\pm 40\%$ de mortalidade) no florescimento ($U = 37,0$, $z = -3,55$, $n_1 = 8$, $n_2 = 10$, $P = 0,0004$) e 28 dias após o florescimento ($U = 36,0$, $z = -3,65$, $n_1 = 8$, $n_2 = 10$, $P = 0,0003$) (Figura 3). A eficácia do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 entre os dois períodos avaliados não diferiu estatisticamente ($U = 107,5$, $z = 0,19$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P = 0,8513$) (Figura 3). Adicionalmente, as lagartas sobreviventes apresentaram elevada inibição de desenvolvimento e enfezamento. A inibição de desenvolvimento foi superior a 90% em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 em comparação à isolinha não-Bt no florescimento ($U = 116,0$, $z = 3,90$, $n_1 = 8$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e 28 dias após o florescimento ($U = 116,0$, $z = 3,90$, $n_1 = 8$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$). De modo semelhante, o enfezamento das lagartas alimentadas com brácteas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 foi superior a 95% no florescimento ($U = 36,0$, $z = -3,77$, $n_1 = 8$, $n_2 = 10$, $P = 0,0002$) e 28 dias após o florescimento ($U = 36,0$, $z = -3,89$, $n_1 = 8$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$) à isolinha não-Bt ($< 48\%$) (Tabela 5).

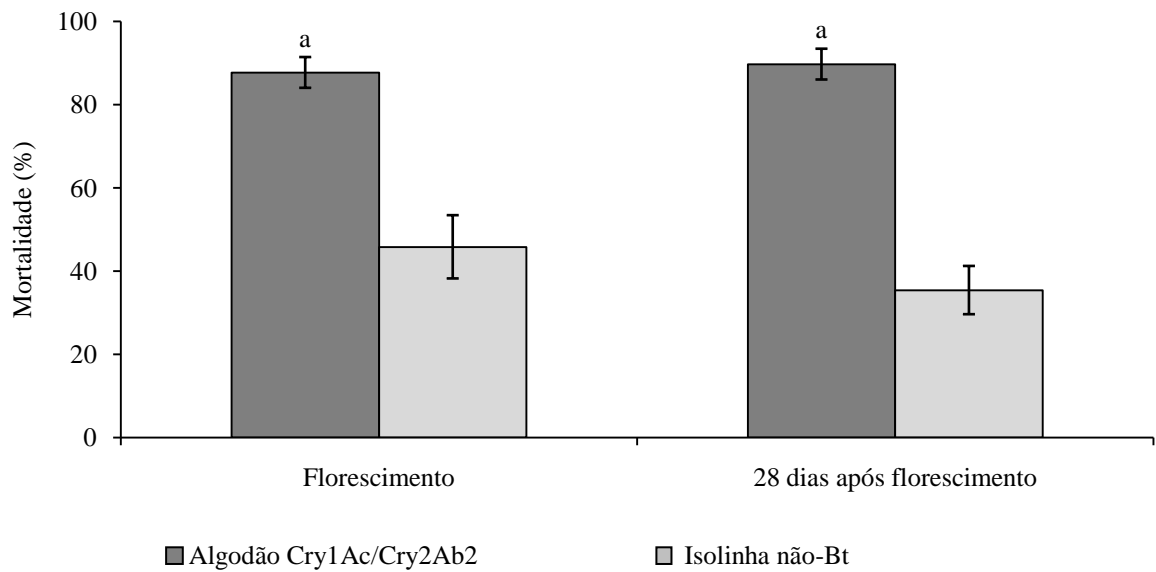


Figura 3 - Mortalidade larval de *S. frugiperdas* em brácteas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt em todos os períodos avaliados. Médias seguidas de mesma letra nas barras do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 não diferem entre si (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$)

Tabela 5 - Inibição do desenvolvimento e enfezamento larval de *S. frugiperda* em brácteas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 na fase reprodutiva do algodoeiro

Tratamentos	Fenologia do algodoeiro ¹	
	Florescimento	28 dias após florescimento
Inibição do desenvolvimento (%)		
Cry1Ac/Cry2Ab2	92,1 ± 0,7	96,7 ± 0,3
Isolinha não-Bt	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Enfezamento (%)		
Cry1Ac/Cry2Ab2	98,0 ± 2,0	100,0 ± 0,0
Isolinha não-Bt	47,9 ± 3,1	35,4 ± 5,8

¹Valores representam médias ± EP. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt para os parâmetros biológicos em todos os períodos avaliados.

Quando neonatas de *S. frugiperda* foram expostas à alimentação em brácteas do algodão Cry1Ac/Cry1F, houve elevada mortalidade (> 80%) (Figura 4). A mortalidade algodão Cry1Ac/Cry1F foi significativamente superior à verificada na isolinha não-Bt nos bioensaios em plantas na fase de florescimento ($U = 45,5$, $z = -3,65$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0003$), 14 dias após florescimento ($U = 45,0$, $z = -3,68$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0002$) e 28 dias após florescimento ($U = 45,0$, $z = -3,82$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$). Ao longo do período reprodutivo do algodão Cry1Ac/Cry1F não houve diferenças significativas em termos de mortalidade de *S. frugiperda* quando exposta à alimentação em brácteas ($\chi^2 = 3,07$, g.l. = 2, $P = 0,2155$) (Figura 4). A inibição do desenvolvimento das lagartas sobreviventes de *S.*

frugiperda foi significativamente afetada pelo algodão Cry1Ac/Cry1F (> 44%) nos períodos do florescimento ($U = 135,0$, $z = 3,95$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após florescimento ($U = 135,0$, $z = 3,94$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e 28 dias após florescimento ($U = 135,0$, $z = 4,05$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) (Tabela 6). Conseqüentemente, o enfezamento causado pela alimentação em brácteas do algodão Cry1Ac/Cry1F (> 87%) foi significativamente superior às brácteas do algodão não-Bt (< 43%) nos períodos de florescimento ($U = 47,5$, $z = -3,57$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0004$), 14 dias após florescimento ($U = 45,0$, $z = -3,68$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0002$) e 28 dias após florescimento ($U = 45,0$, $z = -3,87$, $n_1 = 9$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$) (Tabela 6).

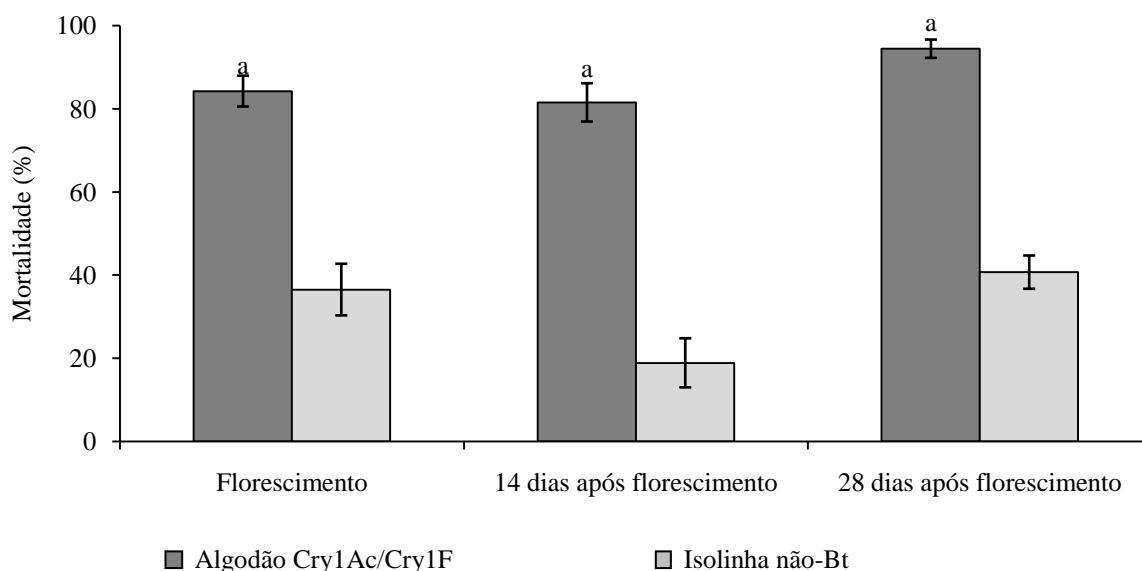


Figura 4 - Mortalidade larval (\pm EP) de *S. frugiperda* em brácteas do algodão Cry1Ac/Cry1F. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry1F e a isolinha não-Bt em todos os períodos avaliados. Médias seguidas de mesma letra nas barras do algodão Cry1Ac/Cry1F não diferem entre si (*Kruskal-Wallis* a $P \leq 0,05$)

Tabela 6 - Inibição do desenvolvimento e enfezamento larval de *S. frugiperda* em brácteas do algodão Cry1Ac/Cry1F na fase reprodutiva do algodoeiro

Tratamentos	Fenologia do algodoeiro ¹		
	Florescimento	14 dias após florescimento	28 dias após florescimento
Inibição do desenvolvimento (%)			
Cry1Ac/Cry1F	89,3 \pm 2,1	44,3 \pm 4,5	93,3 \pm 0,3
Isolinha não-Bt	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Enfezamento (%)			
Cry1Ac/Cry1F	93,0 \pm 4,9	87,7 \pm 4,1	97,5 \pm 2,50
Isolinha não-Bt	36,5 \pm 6,2	18,9 \pm 5,9	42,6 \pm 4,9

⁽¹⁾Valores representam médias \pm EP. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry1F e a isolinha não-Bt para os parâmetros biológicos em todos os períodos avaliados.

4.1.2 Simulações de alimentação larval

Houve diferenças significativas na sobrevivência de *S. frugiperda* entre as simulações com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 ($\chi^2 = 38,59$, g.l. = 7, $P < 0,0001$), e ao longo do tempo de desenvolvimento das lagartas ($\chi^2 = 60,32$, g.l. = 9, $P < 0,0001$) (Figura 5). Na sobrevivência ao longo do desenvolvimento larval, S-C, S-12, S-15 e S-18 não diferiram entre si e diferiram das demais simulações; S-9 diferiu de S-0, S-3 e S-18; S-6 diferiu de S-0 e S-3; e ambas S-0 e S-3 diferiram entre si e das demais simulações (Figura 5).

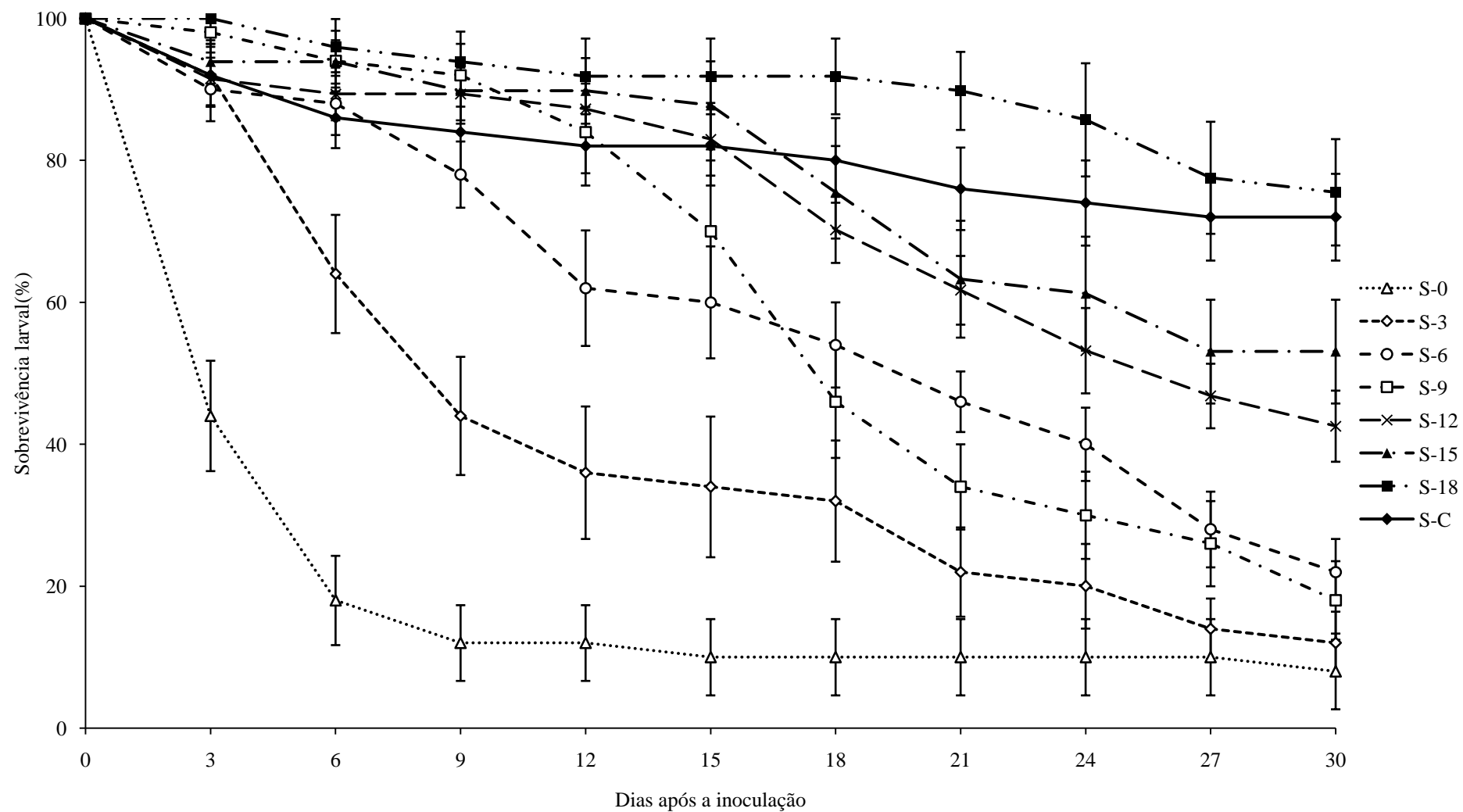


Figura 5 - Sobrevivência larval (\pm EP) de *S. frugiperda* em simulações de alimentação com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2

Conseqüentemente houve efeitos diretos da alimentação de *S. frugiperda* com algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 na viabilidade larval ($\chi^2 = 58,75$, g.l. = 7, $P < 0,0001$) e na taxa de emergência de adultos ($\chi^2 = 58,33$, g.l. = 7, $P < 0,0001$) entre as simulações (Figura 6). Entre as simulações de alimentação S-6, S-12, S-15, S-18 e S-C, houve diferenças na duração da fase larval ($\chi^2 = 18,59$, g.l. = 4, $P = 0,0009$) e larva-adulto ($\chi^2 = 18,16$, g.l. = 4, $P = 0,0011$) e na biomassa de pupas ($\chi^2 = 24,77$, g.l. = 4, $P < 0,0001$) (Tabela 7). Nesses mesmos tratamentos, não houve influência significativa da alimentação larval em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 sob pupas nos parâmetros de viabilidade ($\chi^2 = 4,96$, g.l. = 4, $P = 0,2917$) e duração da fase ($\chi^2 = 6,94$, g.l. = 4, $P = 0,1390$) (Tabela 7). Antes da exposição à alimentação com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, a medição da largura de cápsula cefálica larval de *S. frugiperda* demonstrou predominância do 1º ínstar nas simulações S-0 e S-3, 2º ínstar na S-6, 3º e 4º ínstars na S-9, 5º ínstar nas S-12 e S-15, e 6º ínstar na S-18.

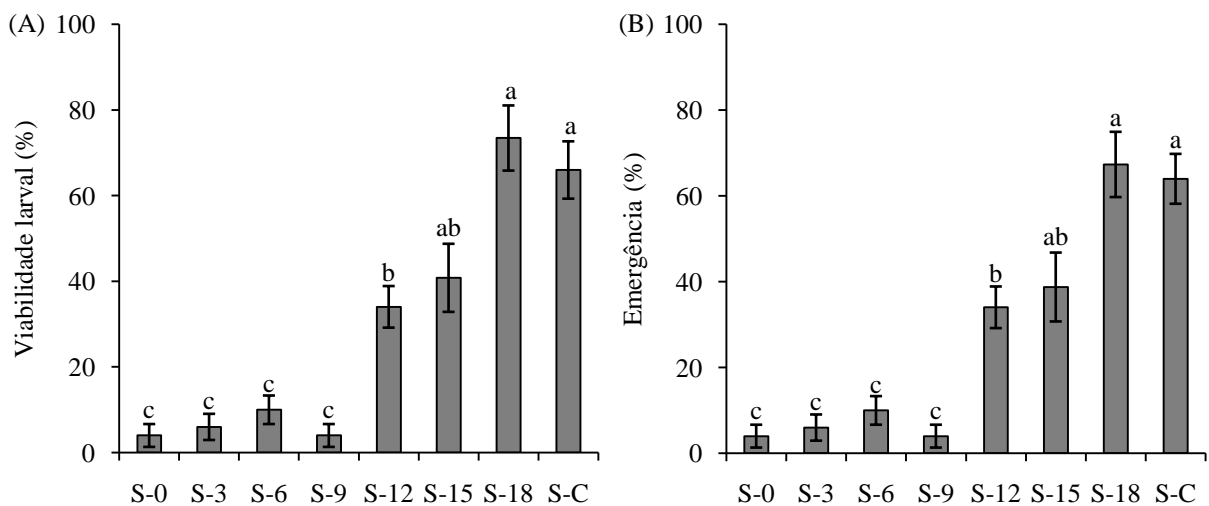


Figura 6 - Viabilidade larval (A) e emergência de adultos (B) de *S. frugiperda* em simulações de alimentação larval com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2. Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra na barras não diferem entre si (Kruskal-Wallis a $P \leq 0,05$)

Tabela 7 - Duração das fases de larva, pupa e larva-adulto e biomassa de pupas de *S. frugiperda* alimentada com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 em simulações de alimentação larval

Tratamentos	Duração das fases (dias) ¹			Biomassa de pupas (mg)
	Larva	Pupa	Larva-adulto	
S-0	35,50 ± 3,50*	9,50 ± 0,50*	45,00 ± 4,00*	157,85 ± 17,95*
S-3	30,33 ± 2,03*	9,67 ± 0,33*	40,00 ± 2,08*	165,53 ± 20,43*
S-6	31,80 ± 2,03a	9,80 ± 0,20a	41,60 ± 2,16a	132,20 ± 5,41bc
S-9	32,50 ± 0,50*	10,50 ± 0,50*	43,00 ± 0,00*	182,00 ± 16,20*
S-12	32,75 ± 1,08a	9,63 ± 0,15a	42,93 ± 0,90a	111,71 ± 4,48c
S-15	29,35 ± 1,38ab	9,89 ± 0,19a	39,47 ± 1,46ab	145,92 ± 6,89b
S-18	26,24 ± 0,74b	9,45 ± 0,16a	35,35 ± 0,82b	142,51 ± 6,20b
S-C (Controle)	25,86 ± 1,07b	10,09 ± 0,19a	35,93 ± 1,13b	175,71 ± 6,65a

¹Médias (± EP) seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (*Kruskal-Wallis* a $P \leq 0,05$).

*Tratamento não incluído na análise estatística pelo reduzido tamanho amostral.

A sobrevivência larval de *S. frugiperda* nas simulações de alimentação larval com folhas do algodão Cry1Ac/Cry1F apresentou diferenças significativas entre as simulações ($\chi^2 = 56,00$, g.l. = 7, $P < 0,0001$) e ao longo do tempo ($\chi^2 = 61,93$, g.l. = 9, $P < 0,0001$). A sobrevivência larval de S-C foi significativamente superior às demais simulações; S-0, S-3 e S-18 diferiram entre si e das demais simulações; S-6 e S-9 não diferiram entre si e diferiram das demais simulações; e S-12 e S-15 não diferiram entre si e diferiram das demais simulações (Figura 7).

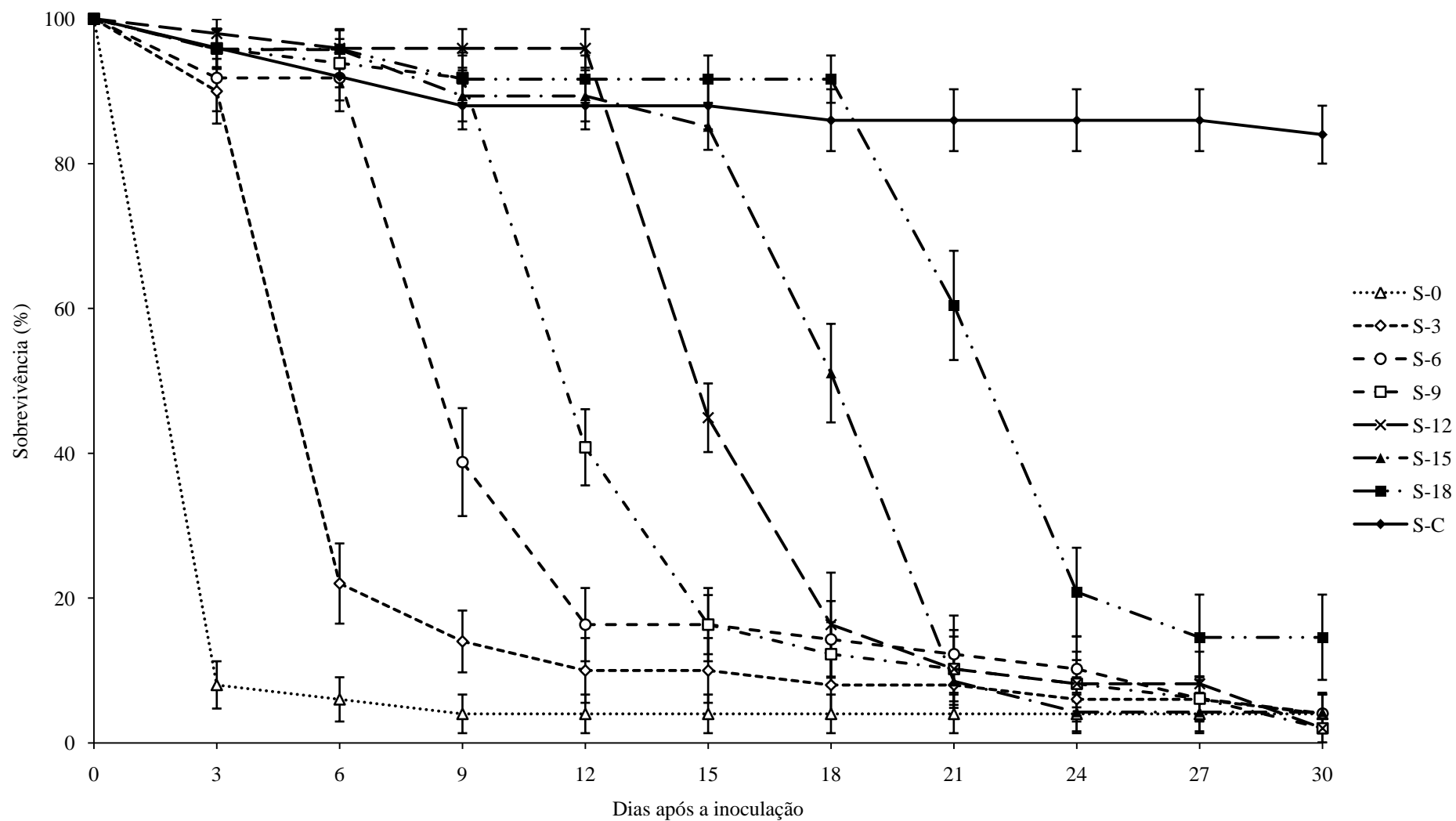


Figura 7 - Sobrevivência larval (\pm EP) de *S. frugiperda* em simulações de alimentação com folhas do algodão Cry1Ac/Cry1F

Conseqüentemente, as simulações de alimentação larval com o algodão Cry1Ac/Cry1F afetaram drasticamente a viabilidade larval de *S. frugiperda* ($\chi^2 = 60,42$, g.l. = 7, $P < 0,0001$) entre todas as simulações e a taxa de emergência de adultos ($\chi^2 = 22,69$, g.l. = 2, $P < 0,0001$) somente entre as simulações S-15, S-18 e S-C (Figura 8). A viabilidade de pupas não sofreu influência entre as simulações S-18 e S-C ($U = 39,0$, $z = -0,09$, $n_1 = 5$, $n_2 = 10$, $P = 0,9301$). Somado a isto, entre essas duas simulações, a duração das fases de larva ($t = 22,96$, g.l. = 1, 13, $P < 0,0001$) e do período larva-adulto ($t = 36,72$, g.l. = 1, 13, $P < 0,0001$) foram significativamente diferentes; contudo, o período de desenvolvimento de pupas ($U = 39,5$, $z = 0,00$, $n_1 = 5$, $n_2 = 10$, $P = 1,0000$) e a biomassa de pupas ($t = 35,71$, g.l. = 1, 13, $P = 0,4885$) não apresentaram diferenças significativas (Tabela 8). De acordo com a medição da cápsula cefálica de *S. frugiperda*, houve predominância do 1º ínstar nas simulações S-0 e S-3, 2º ínstar na S-6, 3º e 4º ínstars na S-9, 4º ínstar na S-12, 5º e 6º ínstars na S-15, e 6º ínstar na S-18.

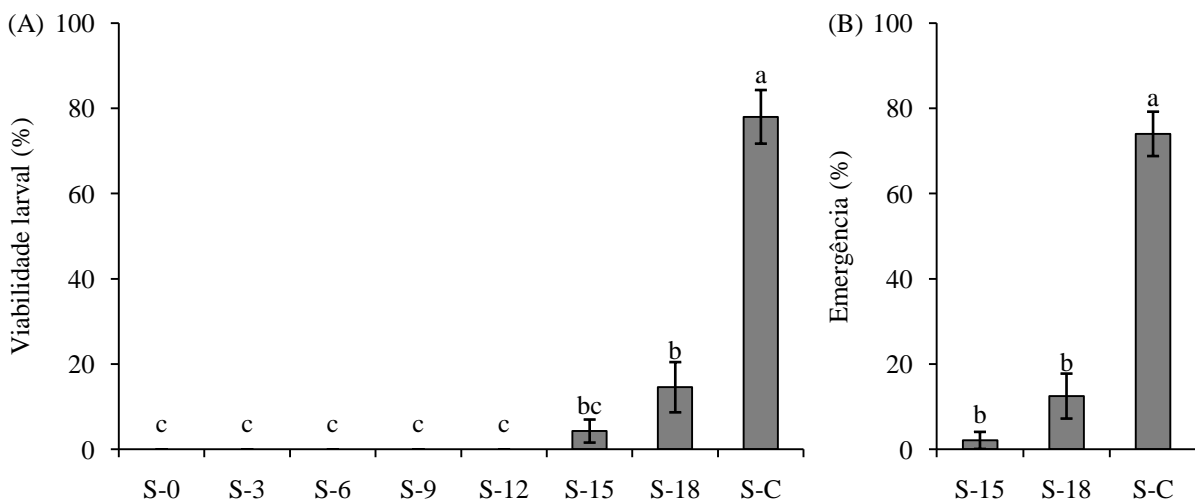


Figura 8 - Viabilidade larval (A) e emergência de adultos (B) de *S. frugiperda* em simulações de alimentação larval com folhas do algodão Cry1Ac/Cry1F. Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra nas barras não diferem entre si (*Kruskal-Wallis* a $P \leq 0,05$)

Tabela 8 - Duração das fases de larva, pupa e larva-adulto e biomassa de pupas de *S. frugiperda* alimentada com folhas do algodão Cry1Ac/Cry1F em simulações de alimentação larval

Tratamentos	Duração das fases (dias) ¹			Biomassa de pupas (mg)
	Larva	Pupa	Larva-adulto	
S-0	-	-	-	-
S-3	-	-	-	-
S-6	-	-	-	-
S-9	-	-	-	-
S-12	-	-	-	-
S-15	41,50 ± 6,50*	9,00 ± *	57,00 ± *	145,75 ± 45,85*
S-18	21,57 ± 0,37b	10,00 ± 0,40a	31,33 ± 0,51b	177,17 ± 8,80a
S-C (Controle)	29,49 ± 1,06a	10,16 ± 0,11a	38,42 ± 0,78a	181,18 ± 6,40a

¹Médias (± EP) seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelos testes *t* de Student ($P \leq 0,05$) (duração da fase larval e larva-adulto e biomassa de pupas) e de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$) (duração da fase de pupa). *Tratamento não incluído na análise estatística pelo reduzido tamanho amostral.

4.1.3 Biologia de *S. frugiperda* no algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e isolinha não-Bt

O tempo de desenvolvimento das fases de ovo ($U = 73,0$, $z = -1,32$, $n_1 = 8$, $n_2 = 13$, $P = 0,1871$) e pupa ($U = 182,00$, $z = 1,57$, $n_1 = 10$, $n_2 = 19$, $P = 0,1166$) de *S. frugiperda* não foi afetado pelo consumo de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (Figura 9A). Por outro lado, a duração da fase larval ($U = 86,0$, $z = -3,01$, $n_1 = 10$, $n_2 = 20$, $P = 0,0026$) e do período ovo-adulto ($U = 82,0$, $z = -3,10$, $n_1 = 10$, $n_2 = 19$, $P = 0,0018$) apresentaram diferença significativa entre as lagartas alimentadas em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt (Figura 9A). Não houve diferenças na viabilidade das fases de ovo ($U = 146,5$, $z = -0,08$, $n_1 = 8$, $n_2 = 13$, $P = 0,9359$) e pupa ($U = 138,0$, $z = -0,90$, $n_1 = 10$, $n_2 = 20$, $P = 0,3704$), e foram encontradas diferenças significativas na fase de larva ($U = 1.055,0$, $z = 6,64$, $n_1 = 10$, $n_2 = 100$, $P < 0,0001$) e no período ovo-adulto ($U = 1.055,0$, $z = 6,72$, $n_1 = 10$, $n_2 = 100$, $P < 0,0001$) entre o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt (Figura 9B). De acordo com os resultados de viabilidade e duração das fases de desenvolvimento evidenciou-se que a fase larval foi diretamente afetada pela alimentação larval com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 (viabilidade de 1,4% e aumento de ≈ 9 dias na duração da fase), e, conseqüentemente, responsável indiretamente pelas diferenças encontradas no período ovo-adulto (Figura 9).

A biomassa larval ($U = 495,0$, $z = 4,89$, $n_1 = 10$, $n_2 = 44$, $P < 0,0001$) e a biomassa de pupas ($U = 231,0$, $z = 3,32$, $n_1 = 10$, $n_2 = 20$, $P = 0,0009$) de *S. frugiperda* foram significativamente menores em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, comparativamente à isolinha não-Bt (Tabela 9). Numericamente, as respectivas biomassa larval aos 18 DAI e biomassa de pupas foram cerca de 10 e 1,2 vezes menores nas lagartas alimentadas com o algodão

Cry1Ac/Cry2Ab2 em relação à isolinha não-Bt e comprovaram que há uma compensação das lagartas alimentadas com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 ao longo da fase larval para compensar o menor ganho de biomassa (Tabela 9). Não houve diferença significativa na razão sexual entre os tratamentos ($\chi^2 = 0,20$, g.l. = 1, $P = 0,6539$) (Tabela 9).

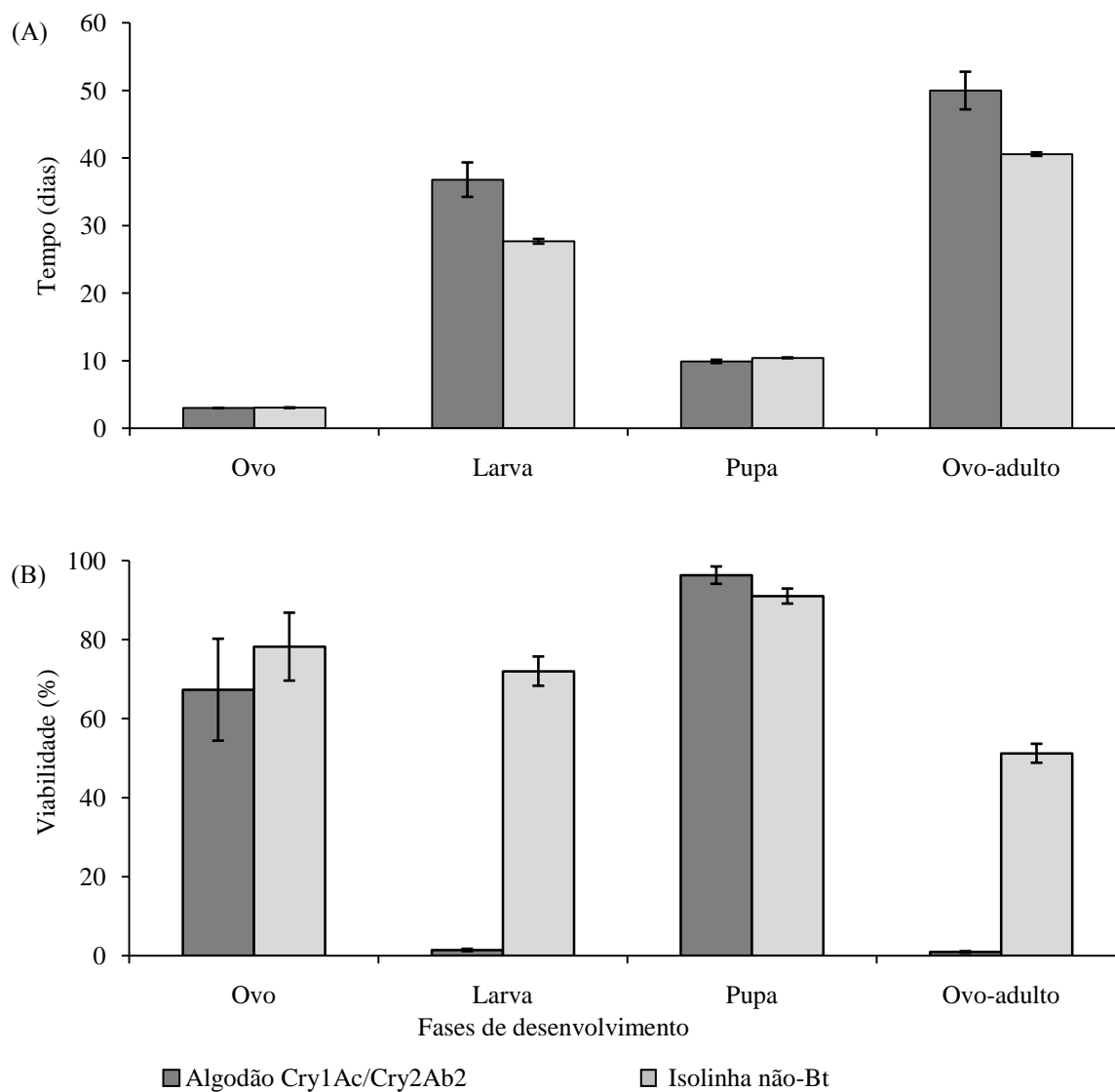


Figura 9 - Duração (A) e viabilidade (B) (\pm EP) das fases de ovo, larva, pupa e ovo-adulto de *S. frugiperda* alimentada com folhas de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt

Tabela 9 - Biomassa larval aos 18 dias após a inoculação (DAI), biomassa de pupas e razão sexual de *S. frugiperda* alimentada com folhas de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt

Parâmetro biológico ⁽¹⁾	Algodão Cry1Ac/Cry2Ab2	Isolinha não-Bt	Valor P
Biomassa larval 18 DAI (mg)	15,9 \pm 1,89	159,34 \pm 7,40	< 0,0001
Biomassa de pupas (mg)	152,9 \pm 6,26	182,51 \pm 2,52	0,0009
Razão sexual [$\frac{\text{♀}}{\text{♂}+\text{♀}}$]	0,46	0,48	0,6539

⁽¹⁾Valores representam médias \pm EP.

Na fase adulta, não houve diferenças significativas nos parâmetros biológicos de longevidade de machos ($t = 13,99$, g.l. = 1, 23, $P = 0,6616$) e fêmeas ($t = 18,57$, g.l. = 1, 24, $P = 0,5422$), períodos de pré-oviposição ($U = 108,5$, $z = -0,21$, $n_1 = 9$, $n_2 = 15$, $P = 0,8306$) e oviposição ($t = 13,17$, g.l. = 1, 22, $P = 0,0842$), e fertilidade diária ($t = 9,78$, g.l. = 1, 24, $P = 0,1958$) entre os tratamentos algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e isolinha não-Bt (Tabela 10). Contrariamente, o período de pós-oviposição ($U = 154,5$, $z = 2,60$, $n_1 = 9$, $n_2 = 15$, $P = 0,0092$) foi significativamente superior e a fertilidade total ($t = 8,81$, g.l. = 1, 24, $P = 0,0055$) significativamente inferior no tratamento com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, no qual fêmeas originadas de lagartas alimentadas com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 ovipositaram 48% menos que fêmeas obtidas de lagartas alimentadas com folhas da isolinha não-Bt (Tabela 10).

Tabela 10 - Longevidade de adultos, períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição, e fertilidades diária e total de *S. frugiperda* alimentada com folhas de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt

Parâmetro biológico ⁽¹⁾	Algodão Cry1Ac/Cry2Ab2	Isolinha não-Bt	Valor <i>P</i>
Longevidade de machos	14,60 ± 1,67	15,60 ± 1,47	0,6616
Longevidade de fêmeas	13,82 ± 1,45	14,80 ± 0,85	0,5422
Pré-oviposição (dias)	4,89 ± 0,75	5,07 ± 0,59	0,8306
Oviposição (dias)	6,89 ± 1,07	9,13 ± 0,72	0,0842
Pós-oviposição (dias)	3,00 ± 1,32	0,60 ± 0,21	0,0092
Fertilidade diária (ovos/fêmea/dia)	131,8 ± 30,4	174,1 ± 15,3	0,1958
Fertilidade total (ovos/fêmea)	806,5 ± 198,4	1560,0 ± 154,0	0,0055

⁽¹⁾Valores representam médias ± EP.

Os parâmetros de crescimento populacional (T , R_o , r_m , λ) de *S. frugiperda* foram afetados negativamente devido à alimentação das lagartas com algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 comparativamente à isolinha não-Bt (Tabela 11). Lagartas alimentadas com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 apresentaram aumento significativo no intervalo médio entre gerações (T), em relação àquelas alimentadas com a isolinha não-Bt (Tabela 11). A taxa líquida de reprodução (R_o) reduziu drasticamente para as lagartas alimentadas com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2, sendo que as fêmeas diminuíram em 99% a capacidade de aumentar a população em relação àquelas alimentadas com a isolinha não-Bt (Tabela 11). Assim, lagartas alimentadas com o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 necessitaram ≈ 57 dias para cada ciclo (T) e geraram ≈ 3 fêmeas/fêmea (R_o), enquanto, lagartas alimentadas com o algodão não-Bt dispenderam ≈ 48 dias para cada ciclo (T) e geraram ≈ 435 fêmeas/fêmeas (R_o) (Tabela 11). A taxa intrínseca de crescimento (r_m) foi significativamente menor no tratamento com algodão

Cry1Ac/Cry2Ab2 e demonstrou que o crescimento exponencial da população de *S. frugiperda* alimentada com essa planta Bt diminuiu em $\approx 83\%$ em comparação com a isolinha não-Bt (Tabela 11). Quanto à razão finita de crescimento (λ), representado pelo número de fêmeas adicionadas diariamente à população por fêmea, a população de *S. frugiperda* cresce quando exposta ao algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt (ambos os valores acima de 1,0), no entanto, o incremento diário de fêmeas na população com alimentação larval de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 foi ≈ 6 vezes menor à alimentação larval com a isolinha não-Bt (Tabela 11).

Tabela 11 – Parâmetros de tabela de vida de fertilidade (\pm EP) de *S. frugiperda* alimentada com folhas de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt estimados pelo método “jackknife”

Parâmetro biológico ⁽¹⁾	Algodão Cry1Ac/Cry2Ab2	Isolinha não-Bt	Valor P
T	56,64 \pm 0,37	47,81 \pm 0,19	< 0,0001
Ro	3,25 \pm 0,80	383,72 \pm 37,89	< 0,0001
r _m	0,021 \pm 0,004	0,125 \pm 0,002	< 0,0001
λ	1,022 \pm 0,004	1,133 \pm 0,002	< 0,0001

⁽¹⁾T = intervalo médio entre gerações; Ro = taxa líquida de reprodução; r_m = taxa intrínseca de crescimento; e λ = razão finita de crescimento.

4.2 Estudos com *P. includens*

4.2.1 Bioensaios com discos de folha

As proteínas Cry1Ac/Cry2Ab e Cry1Ac/Cry1F expressas em folhas do algodão ocasionaram alta mortalidade de *P. includens* (Figura 10 e 11). Nos bioensaios com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 houve 100% de mortalidade de *P. includens* em todos os períodos avaliados, a qual foi significativamente superior à verificada na isolinha não-Bt (< 21%), na emissão do botão floral (U = 155,0, z = 4,01, n₁ = 10, n₂ = 10, P < 0,0001), 14 dias após a emissão do botão floral (U = 155,0, z = 4,02, n₁ = 10, n₂ = 10, P < 0,0001), florescimento (U = 155,0, z = 4,07, n₁ = 10, n₂ = 10, P < 0,0001), 14 dias após o florescimento (U = 155,0, z = 4,03, n₁ = 10, n₂ = 10, P < 0,0001) e 28 dias após o florescimento (U = 155,0, z = 4,02, n₁ = 10, n₂ = 10, P < 0,0001) (Figura 10).

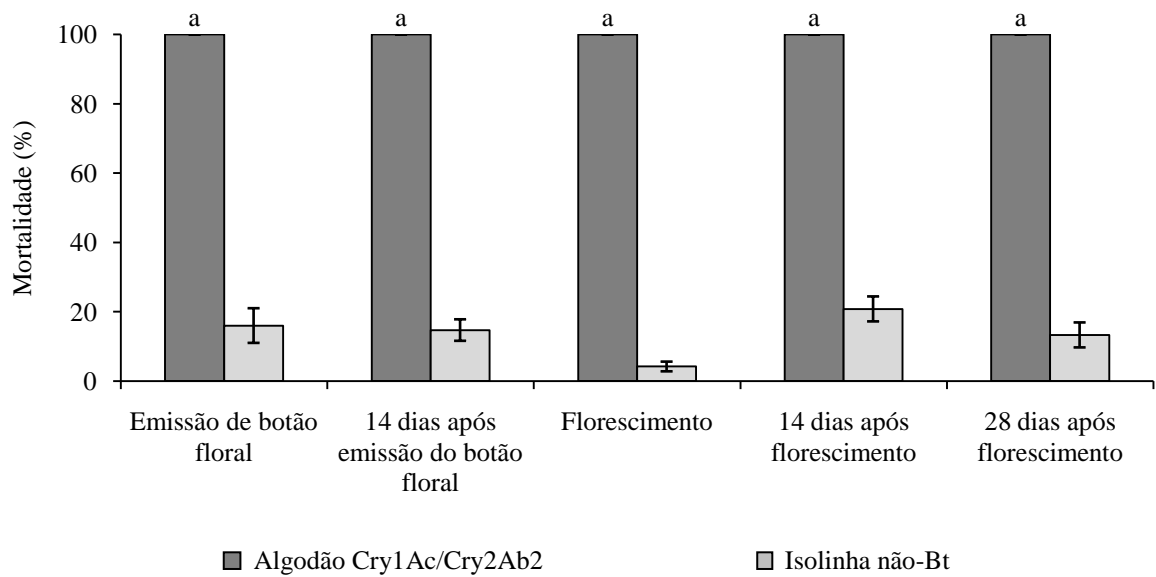


Figura 10 – Mortalidade (\pm EP) de *P. includens* em discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e a isolinha não-Bt em todos os períodos avaliados. Médias seguidas de mesma letra nas barras do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 não diferem entre si (mortalidade completa em todos os períodos avaliados)

De modo semelhante, o algodão Cry1Ac/Cry1F também ocasionou 100% de mortalidade de *P. includens*, sendo essa significativamente superior à mortalidade verificada na isolinha não-Bt ($< 20\%$ de mortalidade) em todas as fases de desenvolvimento avaliadas, na emissão do botão floral ($U = 155,0$, $z = 4,06$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após a emissão do botão floral ($U = 28,0$, $z = -3,78$, $n_1 = 7$, $n_2 = 10$, $P = 0,0002$), florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,05$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$), 14 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,07$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) e 28 dias após o florescimento ($U = 155,0$, $z = 4,02$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P < 0,0001$) (Figura 11).

Devido à mortalidade de *P. includens* nos bioensaios com os dois eventos de algodão Bt ter sido completa em todos os períodos de avaliação, não houve diferenças na eficácia de controle para a espécie ao longo do ciclo de desenvolvimento do algodoeiro (Figuras 10 e 11).

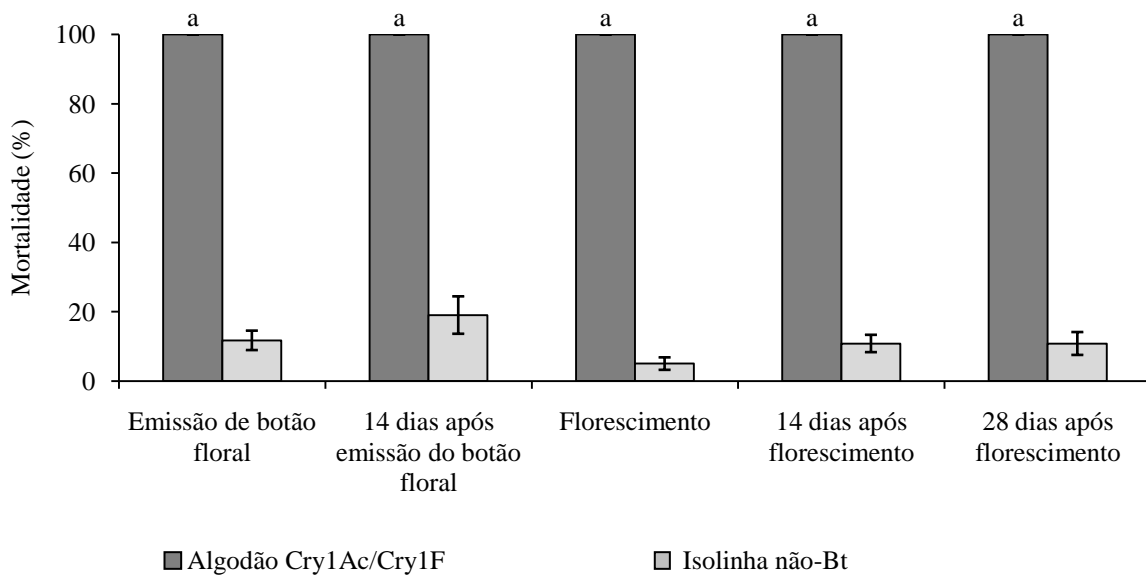


Figura 11 – Mortalidade (\pm EP) de *P. includens* em discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry1F. Houve diferença estatística significativa (*Mann-Whitney* a $P \leq 0,05$) entre o algodão Cry1Ac/Cry1F e a isolinha não-Bt em todos os períodos avaliados. Médias seguidas de mesma letra nas barras do algodão Cry1Ac/Cry1F não diferem entre si (mortalidade completa em todos os períodos avaliados)

4.2.2 Simulações de alimentação larval

Houve diferenças significativas na sobrevivência larval de *P. includens* entre as simulações de alimentação larval com folhas de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 ($\chi^2 = 51,98$, g.l. = 5, $P < 0,0001$), sendo que todas as simulações diferiram entre si (Figura 12). Também foram verificadas diferenças significativas ao longo do tempo ($\chi^2 = 40,71$, g.l. = 5, $P < 0,0001$) (Figura 12).

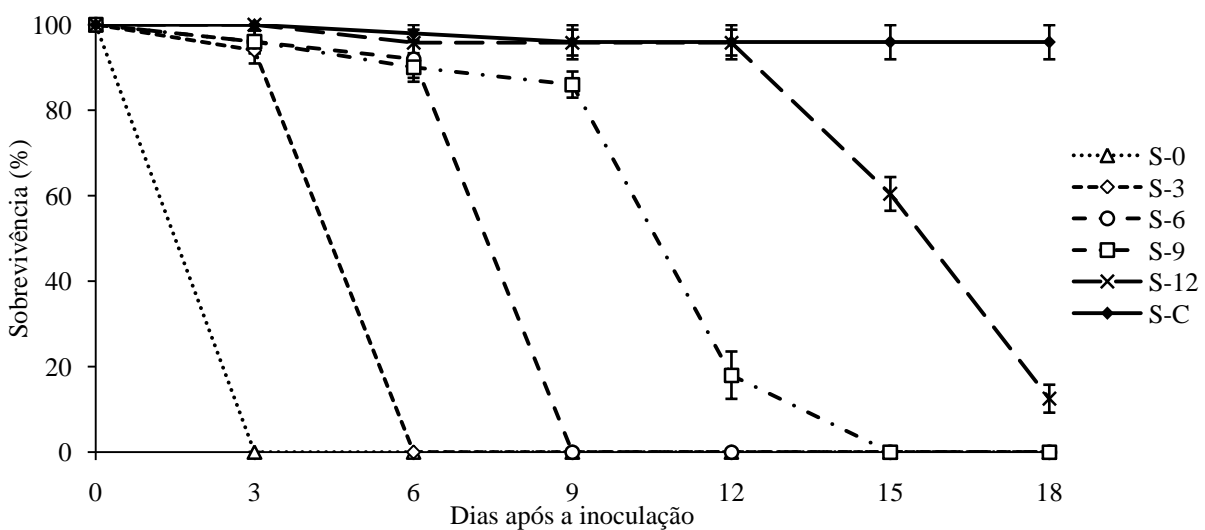


Figura 12 – Sobrevivência larval (\pm EP) de *P. includens* em simulações de alimentação com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2

A viabilidade larval indicou diferenças significativas entre as simulações de alimentação larval com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 ($\chi^2 = 49,61$, g.l. = 5, $P < 0,0001$), nas quais houve mortalidade de 100% das lagartas nas simulações S-0, S-3, S-6 e S-9 e sobrevivência de indivíduos na fase larval somente nas simulações S-12 (8%) e S-C (88%) (Figura 13). Dessa forma, a taxa de emergência de adultos entre S-12 (8%) e S-C (78%) foi significativamente inferior para as lagartas alimentadas com o algodão Bt aos 12 DAI ($U = 55,0$, $z = -3,84$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P = 0,0001$). Entre S-12 e S-C, a viabilidade da fase de pupa não foi afetada ($U = 40,0$, $z = 1,58$, $n_1 = 4$, $n_2 = 10$, $P = 0,1152$). Para a duração da fase larval ($t = 54,95$, g.l. = 1, 12, $P = 0,0724$), de pupas ($t = 55,98$, g.l. = 1, 12, $P = 0,6897$) e de larva-adulto ($U = 17,0$, $z = -1,81$, $n_1 = 4$, $n_2 = 10$, $P = 0,0700$) não foram encontradas diferenças entre S-12 e S-C. Entretanto, a biomassa de pupas de *P. includens* foi menor para as lagartas alimentadas com algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 na simulação S-12 em comparação ao controle S-C ($U = 11,0$, $z = -2,62$, $n_1 = 4$, $n_2 = 10$, $P = 0,0089$) (Tabela 12). Antes do fornecimento do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 nas simulações de alimentação larval, a medição da largura de cápsula cefálica de *P. includens* demonstrou predominância do 1º ínstar na simulação S-0, 2º ínstar na S-3, 3º ínstar na S-6, 4º e 5º ínstars na S-9, e 6º ínstar na S-12.

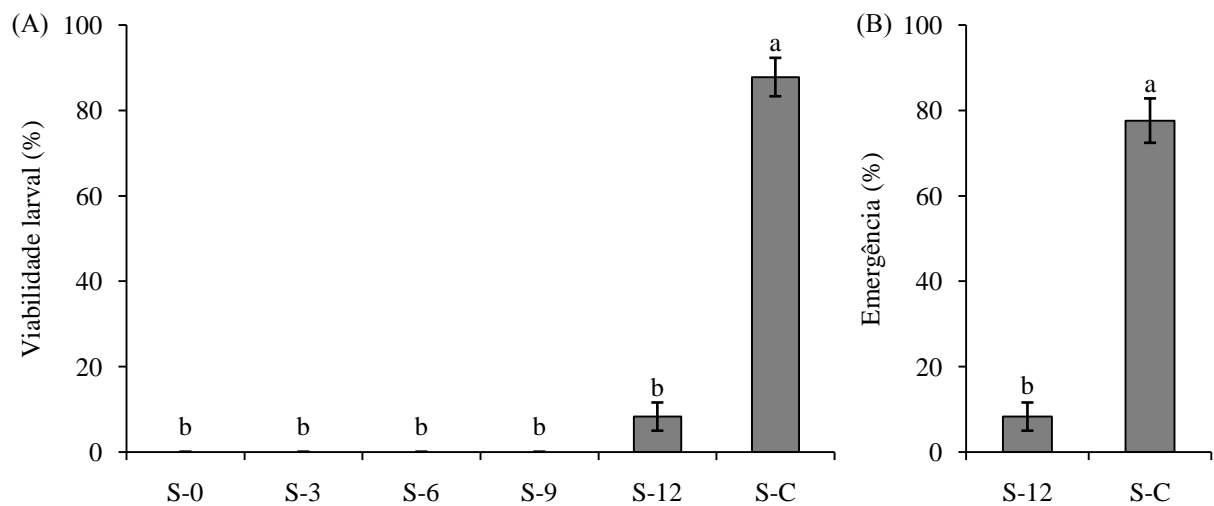


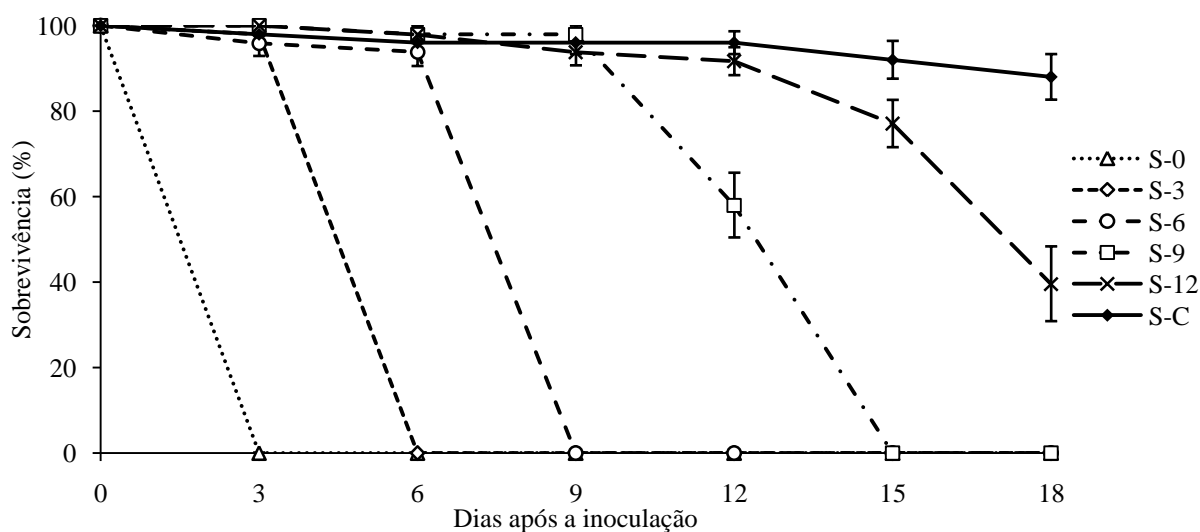
Figura 13 – Viabilidade larval (A) e emergência de adultos (B) de *P. includens* em simulações de alimentação larval com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2. Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra nas barras não diferem entre si (*Kruskal-Wallis* a $P \leq 0,05$)

Tabela 12 – Período de desenvolvimento de larva, pupa e larva-adulto e biomassa de pupas de *P. includens* alimentada com folhas do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 em simulações de alimentação larval

Tratamentos	Período de desenvolvimento (dias) ¹			Biomassa de pupas (mg)
	Larva	Pupa	Larva-Adulto	
S-0	-	-	-	-
S-3	-	-	-	-
S-6	-	-	-	-
S-9	-	-	-	-
S-12	15,00 ± 0,41a	6,50 ± 0,29a	21,50 ± 0,29a	118,39 ± 14,33b
S-C (Controle)	16,16 ± 0,32a	6,58 ± 0,13a	22,58 ± 0,37a	169,81 ± 2,82a

¹Médias (± EP) seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelos testes *t* de Student ($P \leq 0,05$) (duração da fase de larvas e pupas) e de *Mann-Whitney* ($P \leq 0,05$) (duração do período larva-adulto e biomassa de pupas).

Nas simulações de alimentação larval com algodão Cry1Ac/Cry1F também houve diferenças significativas entre as simulações ($\chi^2 = 57,23$, g.l. = 5, $P < 0,0001$), sendo que todas as simulações diferiram entre si, e ao longo do tempo ($\chi^2 = 40,46$, g.l. = 5, $P < 0,0001$) (Figura 14).

Figura 14 – Sobrevivência larval (± EP) de *P. includens* em simulações de alimentação com folhas do algodão Cry1Ac/Cry1F

Conseqüentemente, a viabilidade larval de *P. includens* nas simulações apresentou diferenças significativas, com valores de 0% (S-0, S-3, S-6 e S-9), 27% (S-12) e 88% (S-C) ($\chi^2 = 51,08$, g.l. = 5, $P < 0,0001$) (Figura 15). Somente nas simulações S-12 e S-C indivíduos de *P. includens* atingiram as fases de pupa e adulto, sendo que a viabilidade de pupas não apresentou diferenças ($U = 53,0$, $z = -1,66$, $n_1 = 7$, $n_2 = 10$, $P = 0,0979$) e a emergência de adultos diferiu entre S-C (88%) e S-12 (21%) ($U = 56,0$, $z = -3,74$, $n_1 = 10$, $n_2 = 10$, $P =$

0,0002) (Figura 15). Somado a isso, entre S-12 e S-C, a biomassa de pupas ($t = 22,39$, g.l. = 1, 15, $P = 0,0017$) e a duração da fase larval ($t = 59,94$, g.l. = 1, 15, $P = 0,0273$) e de larva-adulto ($U = 39,5$, $z = -2,28$, $n_1 = 7$, $n_2 = 10$, $P = 0,0229$) foram menores na simulação S-12 em relação ao controle S-C. A duração da fase de pupa entre S-12 e S-C não apresentou diferenças significativas ($U = 78,0$, $z = 1,47$, $n_1 = 7$, $n_2 = 10$, $P = 0,1413$) (Tabela 13). Quando do fornecimento do algodão Cry1Ac/Cry1F, a largura de cápsula cefálica de *P. includens* demonstrou predominância do 1º ínstar na simulação S-0, 2º ínstar na S-3, 3º ínstar na S-6, 4º e 5º ínstars na S-9, e 6º ínstar na S-12.

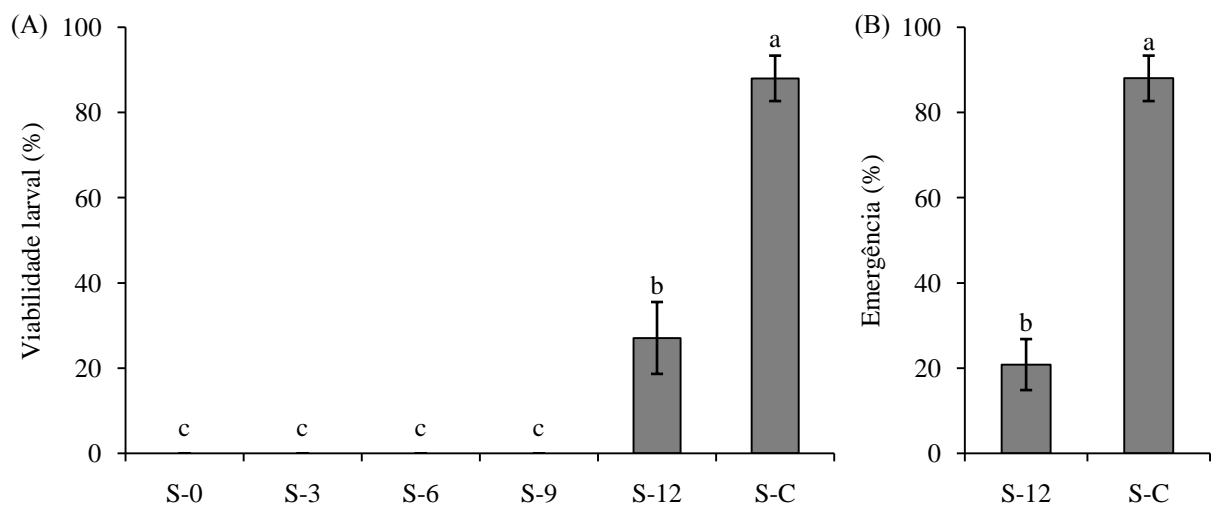


Figura 15 – Viabilidade larval (A) e emergência de adultos (B) de *P. includens* em simulações de alimentação larval com folhas do algodão Cry1Ac/Cry1F. Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra nas barras não diferem entre si (*Kruskal-Wallis* a $P \leq 0,05$)

Tabela 13 – Período de desenvolvimento de larva, pupa e larva-adulto e biomassa de pupas de *P. includens* alimentada com folhas do algodão Cry1Ac/Cry1F em simulações de alimentação larval

Tratamentos	Período de desenvolvimento (dias) ¹			Biomassa de pupas (mg)
	Larva	Pupa	Larva-Adulto	
S-0	-	-	-	-
S-3	-	-	-	-
S-6	-	-	-	-
S-9	-	-	-	-
S-12	14,58 \pm 0,28b	7,00 \pm 0,22a	21,40 \pm 0,42b	132,36 \pm 9,67b
S-C (Controle)	15,72 \pm 0,32a	6,82 \pm 0,07a	22,56 \pm 0,33a	169,94 \pm 5,55a

¹Médias (\pm EP) seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelos testes *t* de *Student* ($P \leq 0,05$) (duração da fase larval e biomassa de pupas) e de *Mann-Whitney* a ($P \leq 0,05$) (duração da fase de pupa e do período larva-adulto).

5 DISCUSSÃO

Os eventos de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F foram eficientes no controle de *S. frugiperda* e *P. includens*. Os resultados de eficácia deste estudo são semelhantes àqueles encontrados na literatura no parâmetro de mortalidade em folhas para os mesmos eventos de algodão Bt para *S. frugiperda* (76 a 96%) (ADAMCZYK et al., 2008; GREENBERG; LI; LIU, 2010; ARMSTRONG; ADAMCZYK; GREENBERG, 2011) e *P. includens* (98 a 100%) (TINDALL et al., 2009; AKIN et al., 2011). No entanto, existem diferenças na suscetibilidade às proteínas expressas nesses eventos para essas espécies-praga. Em geral, *S. frugiperda* foi mais tolerante que *P. includens*, com sobrevivência em bioensaios com discos de folha do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F. A sobrevivência relativamente elevada de *S. frugiperda* nos eventos de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F indica que o potencial de evolução da resistência é maior para essa espécie, pois entre os indivíduos sobreviventes, possivelmente estão os indivíduos heterozigotos, principais responsáveis pela evolução inicial da resistência (GOULD, 1998).

A diferença na suscetibilidade de *S. frugiperda* ao algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 na fase reprodutiva pode estar relacionada à oscilação dos níveis de expressão da proteína Cry2Ab2 que ocorrem no pré-florescimento (ADAMCZYK; ADAMS; HARDEE, 2001), e não devido à proteína Cry1Ac, pois essa possui baixa atividade inseticida sob esse inseto-praga (SIVASUPRAMANIAN et al., 2008). Soma-se a isso o fato do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 apresentar fases de desenvolvimento de menor atividade inseticida para *S. frugiperda* (ADAMCZYK et al., 2008).

As proteínas Cry2Ab2 e Cry1F, expressas nos eventos de algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F, são as principais responsáveis pela mortalidade de *S. frugiperda* e *P. includens*. Isso porque os parentais de algodão Cry1Ac utilizados na obtenção dos eventos de algodão Bt Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F apresentam baixa ou moderada atividade inseticida na mortalidade de *S. frugiperda* e *P. includens* (ADAMCZYK; GORE, 2004; ARMSTRONG et al., 2011; AKIN et al., 2011). A baixa atividade da proteína Cry1Ac no algodão Bt para *P. includens* está provavelmente relacionada à concentração da proteína expressa nas folhas, visto que essa proteína purificada e a soja Cry1Ac possuem alta atividade biológica para a espécie-praga (BERNARDI et al., 2012). Dessa forma, ambos os eventos de algodão Bt não atendem a estratégia de ataque múltiplo para esses insetos-praga pela atividade limitada da proteína Cry1Ac. No contexto de MRI, isso é preocupante, uma vez que não é atendida uma das premissas básicas da pirâmide de genes, que assume que ambas as

proteínas inseticidas isoladamente devem fornecer elevada mortalidade das pragas-alvo (McGAUGHEY; WHALON, 1992; IVES et al., 2011). Adicionalmente, no caso do algodão Cry1Ac/Cry1F, as espécies *H. virescens* e *P. xylostella* apresentaram resistência cruzada às proteínas Cry1Ac e Cry1F (GOULD et al., 1995; TABASHNIK et al., 1997), indicando possivelmente que essas proteínas atuam no mesmo sítio de ação do intestino médio nesses insetos e demais lepidópteros-praga, fato que favorece a evolução da resistência.

Outros aspectos a serem destacados são a sobrevivência e o crescimento populacional de *S. frugiperda* em algodão Cry1Ac/Cry2Ab2. Essa constatação em associação com o sistema de produção de cultivos do Brasil, onde algodão, milho e soja apresentam sucessão e sobreposição de cultivos e essas proteínas são expressas em milho e algodão e futuramente em soja, expõe *S. frugiperda* à elevada pressão de seleção, uma vez que esse inseto possui elevada polifagia e sobreposição de gerações, podendo completar até oito gerações por ano, sendo duas delas em algodão (FITT et al., 2006). Essa situação, em suma, se estende a *S. frugiperda* e *P. includens* ao algodão Bt (Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F), pois o sistema de produção favorece a evolução da resistência de insetos-alvo polípagos pela pressão de seleção contínua e sucessiva ao longo do e a existência de resistência cruzada entre as proteínas inseticidas Bt (GOULD et al., 1995; TABASHNIK et al., 1997).

Nesse cenário, a implementação de estratégias de MRI torna-se mais exigente e a adoção do refúgio estruturado parece ser a melhor ferramenta para o manejo da resistência de *S. frugiperda* e *P. includens* ao algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F. Atualmente, tem sido discutida a possibilidade do “refúgio no saco”, o qual consiste na mistura de sementes de plantas Bt e não-Bt. Para os casos do algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F, essa estratégia de MRI parece não ser adequada, uma vez que, nos estudos de simulações de alimentação larval de *S. frugiperda* e *P. includens* com folhas de algodão (Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F) demonstraram que a suscetibilidade desses insetos-praga decresce com o avançar do desenvolvimento larval, principalmente para *S. frugiperda*, e isso pode permitir maior sobrevivência de indivíduos heterozigotos e acelerar o processo de evolução da resistência. Para *P. includens* existe sobrevivência de lagartas próximas à pupação quando alimentadas com algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F. Assim sendo, devido à mobilidade larval considerável, mesmo que exista mortalidade completa de lagartas de 1º ao 5º ínstar quando alimentadas com algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F, há a possibilidade de lagartas ingerirem algodão Bt e a quantidade de proteína não ser suficiente para ocasionar mortalidade em instares avançados, e isso em termos de MRI inviabilizaria a mistura de sementes. Resultados semelhantes para *T. ni* submetida à alimentação com o

algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 em diferentes ínstares (1º, 3º e 5º) indicaram que a suscetibilidade desse inseto à planta Bt é maior nos primeiros ínstares e as lagartas de 1º, 3º e 5º ínstares evitam a planta Bt e movem-se para a planta não-Bt em 1, 8 e 24 horas, respectivamente (LI; GREENBERG; LIU, 2007). A maior sobrevivência larval em ínstares avançados em associação com a mobilidade e alimentação larval de *S. frugiperda* e *P. includens* entre plantas no cultivo limita a estratégia de mistura de sementes para o MRI. A mobilidade larval é um aspecto-chave para a estratégia de mistura de sementes. Um exemplo disso foi a constatação que *H. virescens* apresentou mobilidade larval em condições de mistura de sementes do algodão Bt (Cry1Ac) para o algodão não-Bt e essa mobilidade aumenta com o avanço do desenvolvimento larval (PARKER; LUTTRELL, 1999). O número de lagartas de *P. xylostella* alimentando-se em cultivo de brócoli Bt (Cry1Ac) com refúgio de 20% após 5 gerações foi significativamente maior na mistura de plantas Bt e não-Bt em comparação ao refúgio estruturado, e o abandono e movimentação entre plantas foi maior nas lagartas que iniciaram a alimentação na planta Bt (TANG et al., 2001). Esses autores concluíram que o refúgio estruturado retarda melhor que a mistura entre plantas Bt e não-Bt porque conserva mais alelos suscetíveis em relação a alelos da resistência e não aumenta a dominância funcional da resistência (PARKER; LUTTRELL, 1999; TANG et al., 2001).

Além da movimentação e alimentação larval de insetos-alvo entre plantas Bt e não-Bt, existe a habilidade do inseto-alvo em evitar as proteínas inseticidas de Bt. As brácteas do algodão não representam o sítio primário de alimentação larval de *S. frugiperda*, no entanto, podem servir como sítio inicial de alimentação e sobrevivência para neonatas dessa espécie no algodão Bt pela menor exposição às proteínas inseticidas, visto que há ocorrência de neonatas em estruturas reprodutivas no algodoeiro (ALI; LUTTRELL; PITRE, 1990) e as brácteas possuem baixos níveis de proteínas inseticidas no algodão Bt (GREENPLANTE, 1999; SIVASUPRAMANIAN et al., 2008). As brácteas do algodão Bt (Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F) demonstraram uma alta eficácia para neonatas de *S. frugiperda* e que pode ser atribuída também à alta concentração de metabólitos secundários em brácteas (CHENZU; LIWEN; QIHUA, 1997), visto que a mortalidade do inseto foi relativamente alta na isolinha não-Bt. A atividade inseticida do tecido liofilizado de brácteas de algodão Cry1Ac, Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry2Ab2 foi baixa para *H. zea* dentre vários tecidos vegetais (folha terminal, folha expandida, botão floral, bráctea, pétalas, cálice, pólen, óvulo e maçã pequena) do algodoeiro (SIVASUPRAMANIAN et al., 2008).

Nesse sentido, as estratégias de MRI ao algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e Cry1Ac/Cry1F devem ser efetivamente implementadas, especialmente na adoção e disposição espacial do

refúgio, onde o refúgio estruturado parece ser o mais adequado quando há mobilidade larval de espécies-alvo. No cenário agrícola brasileiro, caracterizado pela sucessão e sobreposição de cultivos de soja, milho e algodão, as diferentes condições de seleção de *S. frugiperda* e *P. includens* a proteínas Bt expressas nessas culturas devem ser consideradas em programas de MRI a fim de preservar a suscetibilidade desses insetos-alvo.

6 CONCLUSÕES

- O algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e o algodão Cry1Ac/Cry1F apresentam alta eficácia de controle de neonatas de *S. frugiperda* em folhas e brácteas e de *P. includens* em folhas.
- O potencial de sobrevivência e desenvolvimento de *S. frugiperda* e *P. includens* ao algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 e ao algodão Cry1Ac/Cry1F aumenta com o passar dos instares larvais.
- O algodão Cry1Ac/Cry2Ab2 afeta negativamente o crescimento populacional de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.18, n.1, p.265-266, 1925.

ABEL, C.A.; ADAMCZYK, J.J., JR. Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.97, n.5, p.1737-1744, 2004.

ADAMCZYK, J.J., JR.; GORE, J. Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1F, and both Cry1Ac and Cry1F (WideStrike®) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.87, n.4, p.427-432, 2004.

ADAMCZYK, J.J., JR.; ADAMS, L.C.; HARDEE, D.D. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.6, p.1589-1593, 2001.

ADAMCZYK, J.J., JR.; HARDEE, D.D.; ADAMS, L.C.; SUMERFORD, D.V. Correlating differences in larval survival and development of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to differential expression of Cry1A(c) δ -endotoxin in various plant parts among commercial cultivars of transgenic *Bacillus thuringiensis* Cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.1, p.284-290, 2001.

ADAMCZYK, J.J., JR.; HOLLOWAY, J.W.; CHURCH, G.E.; LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B. Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.91, n.2, p.539-545. 1998.

ADAMCZYK, J.J., JR.; GREENBERG, S.; ARMSTRONG, J.S.; MULLINS, W.J.; BRAXTON, L.B.; LASSITER, R.B.; SIEBERT, M.W. Evaluations of Bollgard®, Bollgard II®, and WideStrike® technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.91, n.4, p.531-536, 2008.

AKIN, D.S.; STEWART, S.D.; LAYTON, M.B.; MILLS, J.A. Efficacy of cotton expressing pyramided *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins against lepidopteran pests. **Midsouth Entomologist**, Starkville, v.4, p.1-13, 2010.

AL-SARAR, A.; HALL F.R.; DOWNER, R.A. Impact of spray application methodology on the development of resistance to cypermethrin and spinosad by fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Pest Management Science**, Sussex, v.62, n.11, p.1023-1031, 2006.

ALI, A.; LUTTRELL, R.G. Survival of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) immatures on cotton. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.73, n.3, p.459-465, 1990.

ALI, A.; LUTTRELL, R.G.; PITRE, H.N. Feeding sites and distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v.19, n.4, p.1060-1067, 1990.

- ALI, A.; LUTTRELL, R.G.; PITRE, H.N.; DAVIS, F.M. Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v.18, n.5, p.881-885, 1989.
- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Susceptibility of bollworm and tobacco budworm (Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, n.3, p.921-931, 2007.
- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Response estimates for assessing Heliothine susceptibility to *Bt* toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 5, p. 935-1947, 2009.
- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G.; YOUNG, S.Y. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.99, n.1, p.164-175, 2006.
- ANDOW, D.A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v.4, p.142-199, 2008.
- ANDREWS, K.L. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Florida Entomologist**, Gainesville, v.71, n.4, p.630-653, 1988.
- ARMSTRONG, J.S.; ADAMCZYK, J.J., JR.; GREENBERG, S.M. Efficacy of single and dual gene cotton *Gossypium hirsutum* events on neonate and third instar fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* development based on tissue and meridic diet assays. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.94, n.2, p.262-271, 2011.
- ASHFAQ, M.; YOUNG, S.Y.; McNEW, A.W. Larval Mortality and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on a transgenic *Bacillus thuringiensis*-cotton cultivar expressing CryIac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.5, p.1053-1058, 2001.
- BAI, C.; DEGHEELE, D.; JANSSENS, S.; LAMBERT, B. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, n. 3, p. 211-215, 1993.
- BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.39, n.6, p.996-1001, 2010.
- BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R.; OLIVEIRA, M.D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.137, p.237-245, 2010.
- BASS, M.H. **Fall armyworm**: evaluation of insecticides for control. Auburn, Auburn University, 1978. 8p. (Leaflet, 93).
- BAUER, L.S. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.78, n.3, p.414-443, 1995.

BEACH, R.M.; TODD, J.W. Comparison of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) populations in soybean and cotton/soybean agroecosystems. **Journal of Entomological Science**, Tifton, v.21, n.1, p.21-25, 1986.

BENEDICT, J.H.; ALTMAN, D.W.; UMBECK, P.F.; RING, D.R. Behavior, growth, survival, and plant injury by *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic Bt cottons. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.85, n.2, p.589-593, 1992.

BENEDICT, J.H.; SACHS, E.S.; ALTMAN, D.W.; RING, D.R.; STONE, T.B.; SIMS, S.R. Impact of δ -endotoxin-producing transgenic cotton on insect-plant interactions with *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, College Park, v.22, n.1, p.1-9, 1993.

BERDEGUÉ, M.; TRUMBLE, J.T.; MOAR, W.J. Effect of Cry1C toxin from *Bacillus thuringiensis* on larval feeding behaviour of *Spodoptera exigua*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.80, n.2, p.389-401, 1996.

BERNARDI, O.; MALVESTITI, G.S.; DOURADO, P.M.; OLIVEIRA, W.S.; MARTINELLI, S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 \times MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v.68, n.7, p.1083-1091, 2012.

BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; GARCIA, M.S.; MARTINS, J.F. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.27, p.207-212, 1998.

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

BURLEIGH, J.G. Population dynamics and biotic controls of the soybean looper in Louisiana. **Environmental Entomology**, College Park, v.1, n.3, p.290-294, 1972.

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.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**, Londrina, v.33, n.6, p.709-716, 2004.

CACCIA, S.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; MAHON, R.J.; DOWNES, S.; JAMES, W.; BAUTSOENS, N.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. **PLoS ONE**, Berkeley, v.5, n.4, p.1-7, 2010.

CALLAHAN, P. S.; SPARKS, A.N.; SNOW, J.W.; COPELAND, W.W. Corn earworm moth: Vertical distribution in nocturnal flight. **Environmental Entomology**, College Park, v.1, v.4, p.497-503, 1972.

CANERDAY, T.D.; ARANT, F.S. The looper complex in Alabama (Lepidoptera: Plusiinae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.59, n.3, p.742-743, 1966.

CERA, Center for Environmental Risk Assessment. **MON-00531-6, MON-00757-7 (MON531/757/1076)**. In: Database Product Description. 2008. Disponível em: <http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=ShowProd&data=MON531%2F757%2F1076>. Acesso em: 13 ago. 2012.

CERA, Center for Environmental Risk Assessment. **DAS-21023-5 x DAS-24236-5**. In: Database Product Description. 2009. Disponível em: <http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=ShowProd&data=DAS-21023-5+x+DAS-24236-5>. Acesso em: 13 ago. 2012.

CERA, Center for Environmental Risk Assessment. **MON-15985-7 (MON 15985)**. In: Database Product Description. 2010. Disponível em: <http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database&mode=ShowProd&data=MON+15985>. Acesso em: 13 ago. 2012.

CHENZHU, W.; LIWEN, Z.; QIHUA, Y. On the relationship between larval feeding behavior of cotton bollworm and distribution of harmful allelochemicals in cotton. **Acta Entomologica Sinica**, Beijing, v.40, n.1, p.55-60, 1997.

CHITKOWSKI, R.L.; TURNIPSEED, S.G.; SULLIVAN, M.J.; BRIDGES, W.C., JR. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of Noctuid (Lepidoptera) pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.96, n.3, p.755-762, 2003.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Jaboticabal, v.26, p.407-410, 1997.

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

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

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.2, p.311-316, 2001.

DOWNES, S.; PARKER, T.; MAHON, R. Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II[®] cotton. **PLoS ONE**, Berkeley, v.5, n.9, p.1-5, 2010.

EICHLIN, T.D.; CUNNINGHAM, H.B. **The Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) of America North of Mexico, emphasizing genitalic and larval morphology**. Washington: Agricultural Research Service/USDA, 1978. 125p. (Technical Bulletin, 1567).

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Review of additional product characterization and human health data in support of the section 3 application for the mycogen brand Cry1F (synpro)/Cry1Ac (synpro) construct 281/3006 cotton, submitted by Dow AgroSciences.** United States Environmental Protection Agency, 2004. 20p. (Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances Memorandum). Disponível em: <<http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2004/june/sect3ra.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2012.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. **Bt Cry1F/Cry1Ac WideStrike cotton registration action document (*Bacillus thuringiensis* Cry1F (synpro) and Cry1Ac (synpro) construct 281/3006 insecticidal crystal proteins as expressed in cotton).** United States Environmental Protection Agency, Washington, 2005. 94p. (Biopesticide Registration Action Document). Disponível em: <http://www.epa.gov/opp00001/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_006512.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2012.

ESTADA, U.; FERRÉ, J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and the selection for resistance to one of the crystal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.10, p.3840-3846, 1994.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.47, p.501-543, 2002.

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

FITT, G.P.; MARES, C.L.; LLEWELLYN, D.J. Field evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.4, p.535-548, 1994.

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

FUNICHELLO, M.; SOUZA, B.H.S.; GRIGOLLI, J.F.J.; RIBEIRO, A.A.; BUSOLI, A.C.; BOIÇA, A.L., JR. Parâmetros biológicos de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares convencionais e na cultivar NuOPAL (Bollgard I®) de Algodoeiro. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 8., 2011, São Paulo. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA ALGODÃO, 2011. p.221-227.

GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; KEWESHAN, R.S.; DUNBAR, M.W. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. **PLoS ONE**, Berkeley, v.6, n.7, p.1-7, 2011.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.37, p.615-636, 1992.

GLAUM, P. R.; IVES, A. R.; ANDOW, D. Contamination and management of resistance evolution to high-dose transgenic insecticidal crops. **Theoretical Ecology**, v.5, n.2, p.195-209, 2012.

GORE, J.; LEONARD, B.R.; ADAMCZYK, J.J., JR. Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) survival on 'Bollgard' and 'Bollgard II' cotton flower bud and flower components. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.6, p.1445-1451, 2001.

GORE, J.; LEONARD, B.R.; CHURCH, G.E.; COOK, D.R. Behavior of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on genetically engineered cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.95, n.4, p.763-769, 2002.

GORE, J.; ADAMCZYK, J.J., JR.; BLANCO, C.A. selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, n.1, p.88-94, 2005.

GOULD, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **BioScience**, Washington, v.38, n.1, p.26-33, 1988.

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

GOULD, F.; ANDERSON, A. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxin adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, College Park, v.20, n.1, p.30-33, 1991.

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

GREENBERG, S.M.; LI, Y.X.; LIU, T.X. Effect of age of transgenic cotton on mortality of lepidopteran larvae. **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v.35, n.3, p.261-268, 2010.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.69, n.4, p.488-497, 1976.

GREENPLANTE, J.T. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in bollgard cotton fruit and terminals. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.92, n.6, p.1377-1383, 1999.

GREENPLATE, J.T.; MULLINS, J.W.; PENN, S.R.; DAHM, A.; REICH, B.J.; OSBORN, J.A.; RAHN, P.R.; RUSCHKE, L.; SHAPPLEY, Z.W. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.127, n.6, p.340-347, 2003.

HALCOMB, J.L.; BENEDICT, J.H.; COOK, B.; RING, D.R.; CORREA, J.C. Feeding behavior of bollworm and tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in mixed stands on nontransgenic and transgenic cotton expressing an insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.93, n.4, p.1300-1307, 2000.

HARDKE, J.T. **Contribution of *Bacillus thuringiensis* cotton cultivars and insecticides to a fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), (Lepidoptera: Noctuidae) management strategy**. 2006. 131p. Dissertation - Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, 2006.

HARTLEY, C.J.; NEWCOMB, R.D.; RUSSELL, R.J.; YONG, C.G.; STEVENS, J.R.; YEATES, D.K.; LA SALLE, J.; OAKESHOTT, J.G. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v.103, n.23, p.8757-8762, 2006.

HARTLEY, H.O. The use of range in analysis of variance. **Biometrika**, London, v.37, n.3/4, p.271-280, 1950.

HENSLEY, S.D.; NEWSOM, L.D.; CHAPIN, J. Observations on the looper complex of the noctuid subfamily Plusiinae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.57, n.6, p.1006-1007, 1964.

HERNÁNDEZ, C.S.; FERRÉ, J. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.9, p.5627-5629, 2005.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; VLIET, A.V.; BAUTSOENS, N.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.74, n. 24, p.7654-7659, 2008.

HERRERO, S.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; TABASHNIK, B.E.; FERRÉ, J. Shared Binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.12, p.5729-5734, 2001.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CATTELAN, A.J.; NEPOMUCENO, A.L.; MOSCARDI, F.; LIBERATTI, I.A.; FERREIRA, L.P.; KASTER, M.; NEUMAIER, N.; SARAIVA, O.F. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 2000. 70p. (EMBRAPA/CNPSo, Circular Técnica, 30).

ISIDRO, R.; ALMEIRA, R.P.; PEREIRA, J.O.V. Consumo foliar de *Spodoptera frugiperda* em amendoim cultivares Tatu e CNPA BR-1. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.1, p.37-42, 1997.

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.

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

J-BCH, Japan Biosafety Clearing House. **Cotton resistant to Lepidoptera and tolerant to glufosinate herbicide (*cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI: DAS-24236-5×DAS-21023-5)**. In: Risk Assessment 2006-04-10. 2006. Disponível em: <http://www.bch.biodic.go.jp/download/en_lmo/281_3006enRi.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2012.

JENSEN, R.L.; NEWSOM, L.D.; GIBBENS, J. The soybean looper: effects of adult Nutrition on oviposition, mating frequency, and longevity. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.67, n.4, p.467-470, 1974.

JOST, D.J.; PITRE, H.N. Soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition on cotton and soybean of different growth stages: influence of olfactory stimuli. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.95, n.2, p.286-293, 2002.

KRANTHI, K.R.; NAIDU, S.; DHAWAD, C.S.; TATWAWADI, A.; MATE, K.; PATIL, E.; BHAROSE, A.A.; BEHERE, G.T.; WADASKAR, R.M.; KRANTHI, S. Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in *Bt*-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Noctuidae: Lepidoptera). **Current Science**, Bangalore, v.89, n.2, p.291-298, 2005.

LANGRIDE, W.H.R.; FITZGERALD, K.J.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; SZALAY, A.A. Dual promoter of *Agrobacterium tumefaciens* mannopine synthase genes is regulated by plant growth hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, n.9, p.3219-3223, 1989.

LI, Y.X. ; GREENBERG, S.M.; LIU, T.X. Effects of Bt cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab and non-Bt cotton on behavior, survival and development of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, Guildford, v.25, n.9, p.940-948, 2006.

LI, Y.X.; GREENBERG, S.M.; LIU, T.X. Orientation behavior, development and survival of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab and conventional cotton. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 20, p.473–488, 2007.

LU, B.; DOWNES, S.; WILSON, L.; GREGG, P.; KNIGHT, K.; KAUTER, G.; McCORKELL, B. Preferences of field bollworm larvae for cotton plant structures: impact of Bt and history of survival on Bt crops. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.140, n.1, p.17–27, 2011.

LUGINBILL, P. **The fall armyworm**. Washington: USDA, 1928. 91p. (Technical Bulletin, 34).

LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M.J. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.2, p.457-464, 1999.

- LUTTRELL, R.G.; MINK, J.S. Damage to cotton fruiting structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Cotton Science**, Cordova, v.3, n.2, p.35-44, 1999.
- LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.92, n.1, p.21-32, 1999.
- MAIA, A.N.; LUIZ, A.J.B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife Technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.93, n.2, p.511-518, 2000.
- MALLET, J.; PORTER, P. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? **Proceedings of the Royal Society of London B - Biological Sciences**, London, v.250, n.1328, p.165-169, 1992.
- MARCHOSKY, R.; ELLSWORTH, P.C.; MOSER, H.; HENNEBERRY, T.J. **Bollgard® and Bollgard II® efficacy in near isogenic lines of 'DP50' upland cotton in Arizona**. Tucson: Cotton: A College of Agriculture Report, 2001. 16p. (2001 Arizona Cotton Report).
- MARTIN, P.B.; LINGREN, P.D.; GREENE, G.L. Relative abundance and host preferences of cabbage looper, soybean looper, tobacco budworm, and corn earworm on crops grown in north Florida. **Environmental Entomology**, College Park, v.5, n.5, p.878-882, 1976.
- MARTINELLI, S.; MONTRAZI, R.B.; ZUCHI, 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**, Lanham, v. 99, n.2, p. 519-526, 2006.
- MARTINS, J.F.S.; CUNHA, U.S.; OLIVEIRA, J.V.; PRANDO, H.F. Controle de insetos na cultura do arroz irrigado. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. 248p. p.137-154.
- MASCARENHAS, R.N.; BOETHEL, D.J. Responses of Field-collected strains of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to selected insecticides using an artificial diet overlay bioassay. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.90, n.5, p.1117-1124, 1997.
- MASCARENHAS, R.N.; BOETHEL, D.J.; LEONARD, B.R.; BOYD, M.L.; CLEMENS, C.G. Resistance monitoring to *Bacillus thuringiensis* insecticides for soybean loopers (Lepidoptera: Noctuidae) collected from soybean and transgenic Bt-cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.91, n.5, p.1044-1050, 1998.
- McGAUGHEY; W.H.; WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science**, Washington, v.258, p.1451-1455, 1992.
- MOSCARDI, F.; KASTELIC, J.G. **Ocorrência de vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região de Sertaneja/PR**. In: EMBRAPA-CNPSO. Resultados de pesquisa de soja 1984/85. Londrina: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 1985. 128p. (EMBRAPA/CNPSO, Documentos, 15).

OLSEN, K.M.; DALY, J.C.; HOLT, H.E.; FINNEGAN, E.J. Season-long variation in expression of Cry1Ac gene and efficacy of *Bacillus thuringiensis* toxin in transgenic cotton against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, n.3, p.1007-1017, 2005.

PARKER, C.D.; LUTTERELL, R.G. Interplant movement of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in pure and mixed plantings of cotton with and without expression of the Cry1Ac delta-endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.92, n.4, p.837-845, 1999.

PARRA, J.R.P.; HADDAD, M.L. **Determinação do número de ínstares de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 49p.

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

PASHLEY, D.P.; HAMMOND, A.M.; HARDY, T.N. Reproductive isolating mechanisms in Fall Armyworm Host Strains (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v.85, n.4, p.400-405, 1992.

PITTENDRIGH, B.R.; MARGAM, V.M.; SUN, L.; HUESING, J.E. Resistance in the post-genomics age. In: ONSTAD, D.W. **Insect Resistance Management: Biology, Economics and Predictions**. San Diego: Academic, 2008. p.36-68.

REID, J.C.; GREENE, G.L. The soybean looper; pupal weight, development time and consumption of soybean foliage. **The Florida Entomologist**, Gainesville, v.56, n.3, p.203-206, 1973.

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 B: Biological Sciences**, London, v.353, n.1376, p.1777-1786, 1998.

SALVADORI, J.R. Pragas do trigo no Brasil. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. 248p. p.155-168.

SANTOS, W.J. Manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: FUNDAÇÃO MT. **Mato Grosso Autoeficiência – O algodão a caminho do sucesso**. Rondonópolis: Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária do Mato Grosso, 1997. 107p. p.48-71.

SANTOS, W.J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. **Algodão - No Cerrado do Brasil**. 2 ed. Aparecida de Goiânia: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2011. 1082p. p.495-566.

SARRO, F.B. **Biologia comparada de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho e em cultivares de algodoeiro**. 2006. 109p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006.

SAS INSTITUTE INC. 2000. SAS/STAT: **Statistical Analysis System: getting started with the SAS learning**. Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute, 2000.

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

SHOUR, M.H.; SPARKS, T.C. Biology of the soybean looper, *Pseudoplusia includens*: characterization of last-stage larvae. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v.74, n.6, p.531-535, 1981.

SIEBERT, M.W.; PATTERSON, T.G.; GILLES, G.J.; NOLTING, S.P.; BRAXTON, L.P.; LEONARD, B.R.; VAN DUYN, J.W.; LASSITER, R.B. Quantification of Cry1Ac and Cry1F *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in selected transgenic cotton plant tissue types. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.102, n.3, p.1301-1308, 2009.

SIEBERT, M.W.; BABOCK, J.M.; NOLTING, S.; SANTOS, A.C.; ADAMCZYK, J.J., JR.; NEESE, P.A.; KING, J.E.; JENKINS, J.N.; McCARTY, J.; LORENZ, G.M.; FROMME, D.D.; LASSITER, R.B. Efficacy of Cry1F insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.91, n.4, p.555-565, 2008.

SILVA, M.T.B. Manejo de insetos nas culturas de milho e soja. In: GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. 248p. p.169-200.

SIVASUPRAMANIAM, S.; MOAR, W.J.; RUSCHKE, L.G.; OSBORN, J.A.; JIANG, C.; SEBAUGH, J.L.; BROWN, G.R.; SHAPPLEY, Z.W.; OPPENHUIZEN, M.E.; MULLINS, J.W.; GREENPLATE, J.T. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.101, n.2, p.546-554, 2008.

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

SPARKS, A.N.; JACKSON, R.D.; CARPENTER, J.E.; MULLER, R.A. Insects captured in light traps in the Gulf of Mexico. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v.79, n.1, p.132-139, 1986.

STEWART, S.D.; ADAMCZYK, J.J., JR.; KNIGHTEN, K.S.; DAVIS, F. M. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of Noctuid (Lepidoptera) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.3, p.752-760, 2001.

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

TABASHNIK, B.E. Delaying Insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. **Proceedings of the Royal Society of London B - Biological Sciences**, London, v.255, n.1342, p.7-12, 1994b.

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

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y.B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D.G. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.94, n.5, p.1640-1644, 1997.

TAKAHASHI, M.K.; NAKANO, O.; OSI, J.R. Avaliação de danos causados por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de trigo. **O Solo**, Piracicaba, v.72, p.43-44, 1980.

TANG, J.D.; COLLINS, H.L.; METZ, T.D.; EARLE, E.D.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M. Greenhouse tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.94, n.1, p.240-247, 2001.

TINDALL, K.V.; SIEBERT, M.W.; LEONARD, B.R.; ALL, J.; HAILE, F.J. Efficacy of Cry1Ac:Cry1F proteins in cotton leaf tissue against fall armyworm, beet armyworm, and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.102, n.4, p.1497-1505, 2009.

VALICENTE, F.H. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 2008. 9p. (EMBRAPA/CNPMS, Circular Técnica, 105).

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

UDIKERI, S.S.; PATIL B.V.; KHADI, B.M.; VAMADEVAIAH, H.M.; BASAVANGOUD, K.; KULKARNI, K.A. **Performance of new generation Bt cotton hybrids in Indian rainfed eco-system**. Lubbock: Proceedings of the World Cotton Research Conference, 2007. 11p.

WAN, P.; ZHANG, Y.; WU, K.; HUANG, M. Seasonal expression profiles of insecticidal protein and control efficacy against *Helicoverpa armigera* for Bt cotton in the Yangtze River Valley of China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, n.1, p.195-201, 2005.

YU, S.J. Detection and Biochemical Characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.85, n.3, p.675-682, 1992.

ZHANG, J.H.; WANG, C.Z.; QIN, J.D.; GUO, S.D. Feeding behaviour of *Helicoverpa armigera* larvae on insect-resistant transgenic cotton and non-transgenic cotton. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.128, n.3, p.218-225, 2004.