

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

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

**Daniel Bernardi**

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

**Piracicaba  
2015**

**Daniel Bernardi**  
**Engenheiro Agrônomo**

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

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

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

**Piracicaba**  
**2015**

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

### **AGRADEÇO**

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

### **DEDICO E AGRADEÇO**



## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito Obrigado.

## RESUMO

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

A estratégia de pirâmide de genes tem sido explorada para retardar a evolução da resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). No Brasil, às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ (VT PRO) e PowerCore™ (PW) que expressam as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F, respectivamente, foram liberadas para uso comercial em 2009. Para subsidiar programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) foram conduzidos trabalhos para avaliar o risco de evolução da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) ao milho VT PRO e PW. Inicialmente foram realizados estudos para avaliar a atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta de milho VT PRO e PW sobre *S. frugiperda* e monitorar a suscetibilidade a Cry1A.105 e Cry2Ab2 em populações da praga coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil durante as safras de 2011 a 2014. Houve 100% de mortalidade de neonatas de *S. frugiperda* quando expostas ao tecido foliar de milho VT PRO e PW. No entanto, em estilo-estigmas e grãos, a mortalidade foi inferior a 50 e 6% respectivamente. Variabilidade geográfica na suscetibilidade de populações *S. frugiperda* a Cry1A.105 e Cry2Ab2 foi detectada, com reduções significativas na suscetibilidade a essas proteínas para algumas populações de 2011 a 2014. A técnica de “F<sub>2</sub> screen” foi utilizada para a caracterização da resistência de *S. frugiperda* ao milho VT PRO e PW a partir de populações coletadas na safra de 2012. Verificou-se uma alta variabilidade na frequência fenotípica de isofamílias resistentes ao milho VT PRO e PW, sendo que as maiores frequências foram observadas em populações coletadas na região Central do Brasil. Com a técnica de “F<sub>2</sub> screen” foi possível selecionar linhagens resistentes ao milho VT PRO e PW, denominadas de RR-2 e RR-3 respectivamente. Tanto a linhagem RR-2 quanto a RR-3 que foram criadas por 18 gerações consecutivas nos respectivos eventos de milho Bt apresentaram razões de resistência superiores a 3300, 2700 e ≈ 10 vezes a Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2, respectivamente. Cruzamentos recíprocos das linhagens RR-2 e RR-3 com uma linhagem suscetível de referência revelaram que o padrão da herança da resistência é autossômica recessiva. A recessividade genética da resistência também foi confirmada pela mortalidade completa de indivíduos heterozigotos (descendentes provenientes de cruzamentos entre as linhagens RR-2 ou RR-3 com a linhagem suscetível) em tecidos de milho VT PRO e PW, demonstrando que esses eventos atendem ao conceito de alta dose para o MRI. Em retrocruzamentos da progênie F<sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos com as linhagens resistentes confirmou-se a hipótese de que a resistência é poligênica. A presença de custo adaptativo associado à resistência foi verificada para as linhagens RR-2 e RR-3, porém ausente para os indivíduos heterozigotos, baseado nos parâmetros biológicos avaliados. Neste estudo fornecemos a primeira evidência do potencial de evolução da resistência de *S. frugiperda* a eventos de milho Bt piramidados e informações para o refinamento das estratégias de MRI para preservar a vida útil das tecnologias de milho Bt para o controle de *S. frugiperda* no Brasil.

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





## ABSTRACT

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

The strategy of pyramid of genes has been exploited to delay the evolution of insect resistance to genetically modified crops expressing insecticidal proteins from from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt). In Brazil, YieldGard VT Pro™ (VT PRO) and PowerCore™ (PW) corn technologies expressing Cry1A.105/Cry2Ab2 and Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F proteins respectively were released for commercial use in 2009. Resistance risk assessment were conducted to support an Insect Resistance Management (IRM) program of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) to VT PRO and PW corn. Initially, studies were conducted to evaluate the biological activity of Bt proteins expressed in different plant structures of VT PRO and PW corn on *S. frugiperda* and to monitor the susceptibility to Cry1A.105 and Cry2Ab2 in pest populations collected from different geographical regions in Brazil from 2011 to 2014 growing seasons. The mortality of neonate larvae of *S. frugiperda* was 100% when fed on leaf tissue of VT PRO and PW corn. However, the larval mortality when fed on silks and grains was less than 50 and 6% respectively. A geographical variation in the susceptibility of *S. frugiperda* to Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins was detected among populations, with significant reduction in susceptibility to these proteins in some populations from 2011 to 2014. The F<sub>2</sub> screen technique was used to characterize the resistance of *S. frugiperda* to VT PRO and PW corn from populations sampled in 2012 growing season. High variability in the frequency of resistant phenotypic isofamilies to VT PRO and PW corn was obtained with higher frequencies in *S. frugiperda* populations from Midwestern region of Brazil. Resistant populations to VT PRO and PW corn were selected by using F<sub>2</sub> screen which were designated as RR-2 and RR-3 strains respectively. Both RR-2 and RR-3 strains reared on respective Bt maize events for 18 consecutive generations showed resistance ratios greater than 3,300; 2,700 and ≈ 10-fold to Cry1A.105, Cry1F and Cry2Ab2 respectively. Reciprocal crosses of RR-2 and RR-3 strains with a susceptible reference strain revealed that the inheritance of resistance is autosomal recessive. The genetic recessiveness of the resistance was also confirmed by the complete mortality of heterozygous individuals (offspring from the crosses between RR-2 or RR-3 strains with susceptible strain) on VT PRO and PW corn leaf tissues, indicating that these events meet the concept of high-dose for IRM strategies. Backcrosses of F<sub>1</sub> progenies with both resistant strains revealed that resistance is polygenic. Fitness costs associated with resistance were found in RR-2 e RR-3 strains but not in heterozygous individuals, based on life history traits. In this study, we reported the first evidence of the potential of *S. frugiperda* to evolve resistance to pyramided Bt corn events, as well as provide valuable information to support the current IRM strategies to preserve the useful life of Bt corn technologies for *S. frugiperda* control in Brazil.

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



## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

Outro fator que pode contribuir para a evolução da resistência é a variação dos níveis de proteína durante o desenvolvimento e nas diferentes estruturas da planta (folha, estilo-estigma e grão) o que pode afetar a exposição das pragas-alvo e alterar a resposta biológica dos insetos permitindo a sobrevivência diferencial de alguns insetos e, conseqüentemente, favorecer a evolução da resistência, uma vez que os indivíduos heterozigotos poderiam estar sobrevivendo nesta situação (EPA, 2010; HUANG et al., 2011).

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

No início da evolução da resistência a frequência de indivíduos fenotipicamente resistentes é baixa (em geral inferior a  $10^{-3}$ ) (ROUSH, 1994; ANDOW; ALSTAD, 1998). A técnica do F<sub>2</sub> screen pode detectar alelos da resistência ou estimar a frequência fenotípica de indivíduos resistentes mesmo em baixa frequência (ANDOW; ALSTAD, 1998). Esta técnica permite a manutenção da variabilidade genética e, por um processo de endogamia na geração F<sub>1</sub>, é possível detectar genótipos resistentes raros na geração F<sub>2</sub>, mediante a utilização de bioensaios de concentrações discriminatórias de proteínas Bt com dieta artificial (MARÇON et al., 1999; LUTTRELL; WAN; KNIGHTE, 1999), inseticidas ou tecidos de planta Bt (ANDOW; IVES, 2002; HUANG et al., 2011). Este método tem sido amplamente usado em programas de monitoramento da resistência na Austrália (MAHON; OLSEN; DOWNES, 2008; MAHON et al., 2010; MAHON; DOWNES; JAMES, 2012) e para estimar a frequência alélica e fenotípica de indivíduos resistentes para validação de estratégias de manejo da resistência (ANDOW; ALSTAD, 1998; SIEGFRIED et al., 2007). Além do mais, com a técnica do F<sub>2</sub> screen, é possível selecionar em laboratório linhagens de insetos resistentes para testar pressupostos para o MRI, como, padrão de herança, grau de dominância, número de alelos e custo adaptativo associado à resistência.

Estudos com base genética demonstraram que há um predomínio recessivo ou incompletamente recessivo da resistência para a proteína Cry, com herança autossômica e

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

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

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

- Avaliar o custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™.

## Referências

- ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. The F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 572-578, 1998.
- ANDOW, D.A.; IVES, A.R. Monitoring and adaptive resistance management. **Ecological Applications**, Tempe, v. 12, p. 1378-1390, 2002.
- ANDOW, D.A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.
- ASHLEY, T.R.; WISEMAN, B.R.; DAVIS, F.M.; ANDREWS, K.L. The fall armyworm: a bibliography. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 72, n. 1, p. 152-202, 1989.
- BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. Oviposition, development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.
- BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R.; OLIVEIRA, M.D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p. 237-245, 2010.
- BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? **Trends in Biotechnology**, St. Louis, v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.
- BRÉVAULT, T.; HEUBERGERB, S.; ZHANG, M.; ELLERS-KIRK, C.; NI, X.; MASSOND, L.; LIB, X.; TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 15, p. 5806–5811, 2013.
- CARRIÈRE, Y.; CROWDER, D.W.; TABASHNIK, B. E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, New York, v. 3, n. 5, p. 561-573, 2010.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa - Embrapa Milho e Sorgo, 1995. 45p. (Circular Técnica, 21).
- CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos e Tolerante a herbicidas, MON 89034xTC1507xNK603**. In: Parecer Técnico nº 2753/2010. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15833.html>>. Acesso em: 22 Nov. 2014.
- CTNBIO, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos da ordem lepidoptera e pragas do milho**,

**evento TC1507.** In: Parecer Técnico nº 1679/2008. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12818.html>>. Acesso em: 25 Nov. 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

### Resumo

Para subsidiar um programa de manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ (VT PRO) e PowerCore™ (PW) que expressam as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner, respectivamente, foram conduzidos estudos para avaliar a atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas da planta de milho VT PRO e PW sobre *S. frugiperda* e monitorar a suscetibilidade às proteínas inseticidas Cry1A.105 e Cry2Ab2 de *Bacillus thuringiensis* Berliner em populações da praga coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil durante as safras de 2011 a 2014. Houve 100% de mortalidade de neonatas de *S. frugiperda* quando expostas ao tecido foliar de milho VT PRO e PW. No entanto, em estilo-estigmas e grãos a mortalidade foi inferior a 50 e 6% respectivamente e mais de 49% das lagartas completaram o ciclo biológico. Foram observadas variabilidade geográfica na suscetibilidade de populações *S. frugiperda* a Cry1A.105 e Cry2Ab2, para algumas populações de 2011 a 2014. As populações de *S. frugiperda* coletadas durante a 1ª e 2ª safras de 2011 e 2012, 1ª safra de 2013 apresentaram elevada suscetibilidade a Cry1A.105 com sobrevivência < 7% e inibição do desenvolvimento larval > 85% nos bioensaios de aplicação da proteína na superfície da dieta na concentração diagnóstica de 5000 ng. cm<sup>2</sup> de dieta. Contudo, na 2ª safra de 2013 e 1ª safra de 2014 houve aumento significativo na sobrevivência. No entanto, foram verificadas inibição do desenvolvimento larval de 57 a 100%. Para Cry2Ab2, o melhor critério de resposta para avaliação da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* foi à inibição do desenvolvimento larval. Não houve redução significativa da suscetibilidade a Cry2Ab2 em populações de *S. frugiperda* ao longo do tempo, baseado nos bioensaios de incorporação da proteína na concentração diagnóstica de 100 µg/ml de dieta. Baseado nos resultados do presente trabalho, a variação na atividade biológica de proteínas Bt expressas em diferentes estruturas vegetativas de milho VT PRO e PW pode acelerar a evolução da resistência. Reduções significativas na suscetibilidade de algumas populações de *S. frugiperda* a Cry1A.105 mas não para Cry2Ab2 foram constatadas no decorrer do tempo, indicando assim a necessidade de revisar as estratégias atuais de manejo da resistência.

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

### Abstract

To support a resistance management program of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) to YieldGard VT Pro™ (VT PRO) and PowerCore™ (PW) corn technologies expressing Cry1A.105/Cry2Ab2 and Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F proteins from from *Bacillus thuringiensis* Berliner respectively, we conducted studies to evaluate the biological activity of Bt proteins expressed in different plant structures of VT PRO and PW corn on *S. frugiperda* and to monitor the susceptibility to Cry1A.105 and Cry2Ab2 in pest populations collected from different geographical regions in Brazil from 2011 to 2014 growing seasons. The mortality of neonate larvae of *S. frugiperda* was 100% when fed on leaf tissue of VT Pro and PW corn. However, the larval mortality when fed on silks and grains was less than 50 and 6%

respectively and more than 49% of the larvae completed the biological cycle. A geographical variation in susceptibility of *S. frugiperda* to Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins was detected among populations, for some populations from 2011 to 2014. *S. frugiperda* populations collected during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> seasons of 2011 and 2012 and the 1<sup>st</sup> season 2013 showed high susceptibility to Cry1A.105, with survival < 7% and inhibition of larval development > 85% at diagnostic concentration bioassays of 5.000 ng.cm<sup>2</sup> of diet (diet surface treatment bioassay). However, in the 2<sup>nd</sup> season 2013 and the 1<sup>st</sup> season of 2014 there was a significant increase in the larval survival. However, the larval growth inhibition was from 57 to 100%. The best response criterion for assessing the susceptibility of populations of *S. frugiperda* to Cry2Ab2 was the larval growth. There was no significant reduction in susceptibility to Cry2Ab2 in *S. populations* over time at diagnostic concentration bioassays of 100 µm/ml of diet (diet incorporation bioassay). In conclusion, the variation in the biological activity of Bt proteins in different plant structures of VT PRO and PW corn can favor the evolution of resistance. A significant reduction was detected in the susceptibility of some populations of *S. frugiperda* to Cry1A.105 but not to Cry2Ab2 over time, indicating the need to revise current resistance management strategies.

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

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

#### Resumo

A técnica de “F<sub>2</sub> screen” foi utilizada para a caracterização da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) ao milho YieldGard VT PRO™ (VT PRO) e PowerCore™ (PW) que expressam, respectivamente, as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Foram testadas 552 isofamílias a partir de populações de *S. frugiperda* coletadas na safra de 2012. Verificou-se uma alta variabilidade na frequência fenotípica de isofamílias resistentes ao milho VT PRO e PW, sendo que as maiores frequências foram observadas em populações coletadas na região Central do Brasil, com estimativas de até 41% e 19% das isofamílias positivas para VT PRO e PW respectivamente. Com a técnica de “F<sub>2</sub> screen” foi possível selecionar linhagens resistentes ao milho VT PRO e PW, denominadas de RR-2 e RR-3 respectivamente. Tanto a linhagem RR-2 quanto a RR-3 que foram criadas por 18 gerações consecutivas nos respectivos eventos de milho Bt e apresentaram razões de resistência superiores a 3300, 2700 e ≈ 10 vezes a Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2, respectivamente. As linhagens RR-2 e RR-3 apresentaram a capacidade de sobreviver e completar o ciclo biológico em milho VT PRO e PW respectivamente, deixando descendentes férteis. Cruzamentos recíprocos das linhagens RR-2 e RR-3 com uma linhagem suscetível de referência revelaram que o padrão da herança da resistência é autossômica recessiva. A recessividade genética da resistência também foi confirmada pela mortalidade completa de indivíduos heterozigotos (descendentes provenientes dos cruzamentos entre as linhagens RR-2 ou RR-3 com a linhagem suscetível) em tecidos de milho VT PRO e PW, demonstrando que esses eventos atendem ao conceito de alta dose para o MRI. Em retrocruzamentos da progênie F<sub>1</sub> dos cruzamentos recíprocos com as linhagens resistentes confirmou-se a hipótese de que a resistência é poligênica. Neste estudo fornecemos a primeira evidência do potencial de evolução da resistência de *S. frugiperda* a eventos de milho Bt piramidados no Brasil.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*; Milho piramidado; F<sub>2</sub> screen; Manejo da Resistência de Insetos.

#### Abstract

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

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

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Pyramided corn; F<sub>2</sub> screen; Insect Resistance Management



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

##### **Resumo**

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

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

##### **Abstract**

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

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

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

## 5 CONCLUSÕES

- A atividade biológica das tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ para controle de *S. frugiperda* foi alta em folhas e baixa em estilo-estigmas e grãos em condições de laboratório.
- Algumas populações de *S. frugiperda* apresentaram redução na suscetibilidade à proteína Cry1A.105, porém não a Cry2Ab2, no decorrer das safras agrícolas de 2011 a 2014.
- A partir da técnica de “F<sub>2</sub> screen”, a frequência fenotípica de isofamílias positivas de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT Pro™ e PowerCore™ foi alta, principalmente, para as populações de *S. frugiperda* coletadas da região Central do Brasil.
- As linhagens de *S. frugiperda* resistentes às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™, selecionadas a partir da técnica de “F<sub>2</sub> screen”, apresentaram elevada razão de resistência a Cry1A.105 e Cry1F, porém baixa para Cry2Ab2.
- O padrão de herança da resistência de *S. frugiperda* resistentes às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ foi autossômica recessiva e poligênica.
- Houve custo adaptativo associado à resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ baseado em parâmetros biológicos. No entanto, indivíduos heterozigotos foram igualmente adaptados à linhagem suscetível de referência na ausência da pressão seletiva.
- A dominância funcional da resistência de *S. frugiperda* para às tecnologias de milho Bt YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ foi completamente recessiva para neonatas. No entanto, houve um aumento significativo na sobrevivência larval de heterozigotos quando as lagartas iniciaram a alimentação em YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ do segundo ao sexto instar larval.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A evolução da resistência de *S. frugiperda* às tecnologias de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ é uma das principais ameaças para a sustentabilidade destas tecnologias no campo. No presente trabalho, foram verificados que os eventos de milho YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ não atendem as premissas básicas da estratégia de piramidação de genes e há indícios fortes de resistência cruzada entre as proteínas de Bt, observado a partir da redução significativa na suscetibilidade de *S. frugiperda* as proteínas que compartilham o mesmo modo de ação, ou seja, Cry1F e Cry1A.105. No entanto, não foi observada a presença de indícios de resistência cruzada destas proteínas a Cry2Ab2. Sendo assim, possivelmente a expressão da proteína Cry2Ab2 não é alta o suficiente para o controle de indivíduos resistentes a Cry1F/Cry1A.105. O alto risco de evolução da resistência às tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ foi verificado devido à elevada frequência de indivíduos fenotipicamente resistentes em condições de campo, a partir da técnica de “F<sub>2</sub> screen”, principalmente, para a região Central do Brasil. Esses fatores tornam-se mais preocupantes quando levamos em conta o cenário agrícola brasileiro, onde o milho é cultivado em praticamente duas épocas de cultivos, com sobreposição de culturas que expressam proteínas de Bt que compartilham o mesmo modo de ação e com baixa atividade biológica sobre a praga. Contudo, uma das grandes vantagens das tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ é a expressão de alta dose das proteínas inseticidas nos tecidos foliares das plantas, acarretando na mortalidade completa dos indivíduos heterozigotos, tornando a resistência funcionalmente recessiva deste indivíduos, que são os principais responsáveis pela dispersão de alelos da resistência a campo. No entanto, esta estratégia somente é eficiente quando associado com a presença de áreas de refúgios com plantas de milho não-Bt externamente a área com milho Bt. O presente trabalho demonstra que a expressão de alta dose das proteínas de Bt, conjuntamente com a presença de áreas de refúgios, são fatores positivos para o programas de Manejo de Resistência de Insetos (MRI) para às tecnologias YieldGard VT PRO™ e PowerCore™ para preservar a vida útil destes eventos de milho Bt. Portanto, existe a necessidade de conscientização das empresas detentoras das tecnologias de Bt e produtores rurais para a importância da implementação de áreas de refúgio para programas de MRI, uma vez com que a elevada frequência fenotípica de indivíduos resistentes, capacidade de resistência cruzada entre proteínas inseticidas, a ausência de custo adaptativo dos indivíduos heterozigotos associado com o aumento da dominância funcional da resistência com o desenvolvimento larval podem ocasionar um risco significativo de *S. frugiperda* em evoluir para a resistência às tecnologias de milho YieldGard

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