

SILVANA MARÍA OROZCO RESTREPO

**RESISTÊNCIA AO MILHO Bt PIRAMIDADO Cry1A.105 + Cry2Ab NA  
LAGARTA DO CARTUCHO: SITUAÇÃO DE CAMPO, HERANÇA E  
ESTABILIDADE**

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

O74r  
2019

Orozco Restrepo, Silvana Máira, 1989-

Resistência ao milho Bt piramidadoCry1A.105 + Cry2Ab  
na lagarta do cartucho : situação de campo, herança e  
estabilidade / Silvana Máira Orozco Restrepo. – Viçosa, MG,  
2019.

ix, 67 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Spodoptera frugiperda*. 2. *Bacillus thuringiensis*.

3. Inseticidas. 4. Resistência aos inseticidas. 5. Milho.

I. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

SILVANA MARÍA OROZCO RESTREPO

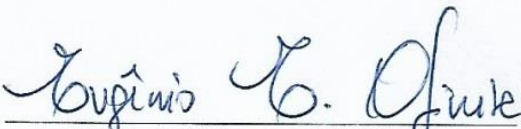
**RESISTÊNCIA AO MILHO Bt PIRAMIDADO Cry1A.105 + Cry2Ab NA  
LAGARTA DO CARTUCHO: SITUAÇÃO DE CAMPO, HERANÇA E  
ESTABILIDADE**

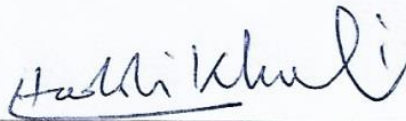
Tese apresentada a Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.


APROVADA: 26 de julho de 2019.


  
Geverson Aelton Resende Silva

  
Rodrigo Soares Ramos

  
Eugênio Eduardo de Oliveira

  
Haddi Khalid

  
Raul Narciso Carvalho Guedes

  
Eliseu José Guedes Pereira  
(Orientador)

*A mis dos ángeles que me acompañan y cuidan siempre en el camino. A mis padres, hermanos y familiares por su esfuerzo, apoyo e ejemplo de vida. A todas las personas que me orientaron y acompañaron en esta caminata con su cariño, compañerismo y amistad.*

*Dedico*

*Cada uno de nosotros debe trabajar para su propia mejora, y al mismo tiempo compartir una responsabilidad general para toda la humanidad.*

*Marie Curie*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
Introdução Geral .....	1
Capítulo I .....	5
Resistência de campo da lagarta-do-cartucho às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e sua instabilidade na ausência de pressão de seleção .....	5
Resumo .....	5
Introdução .....	6
Material e Métodos .....	7
Resultados .....	11
Resistência da população de campo ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab .....	11
Reversão da resistência ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab .....	11
<i>Estabilidade da resistência</i> .....	11
<i>Histórico de vida sem exposição às toxinas Bt</i> .....	12
<i>Fecundidade e fertilidade</i> .....	12
<i>Crescimento populacional fora da exposição às toxinas Bt</i> .....	13
<i>Modo de herança da resistência às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab</i> .....	13
Discussão .....	13
Referências .....	17
Figuras - Capítulo I .....	21
Capítulo II .....	27
Desempenho demográfico de populações da lagarta-do-cartucho em milhos Bt Cry1F e Cry1A.105 + Cry2Ab: algum fator favorável ao manejo da resistência? ...	27
Resumo .....	27
Introdução .....	28
Material e Métodos .....	30
<i>Coleta e manutenção dos insetos</i> .....	30
<i>Bioensaio com folhagem de milho Bt Cry1Fa ou Cry1A.105 + Cry2Ab</i> .....	30
<i>Parâmetros de fertilidade</i> .....	31
<i>Suscetibilidade da progênie F<sub>1</sub> ao milho Bt de uma e duas toxinas Bt</i> .....	31
<i>Nível de resistência e performance ao longo do tempo sem pressão de seleção</i> .....	32
<i>Análise estatística</i> .....	33
Resultados .....	33

<i>Performance em plantas de milho Bt simples e piramidadas</i> .....	33
<i>Dominância efetiva em milho Bt simples e piramidado</i> .....	34
<i>Nível de resistência e histórico de vida ao longo do tempo sem pressão de seleção</i> ..	35
<i>Desempenho populacional ao longo das gerações</i> .....	36
<b>Discussão</b> .....	36
<b>Referências</b> .....	40
<b>Figuras e Tabela - Capítulo 2</b> .....	43
<b>Capítulo III</b> .....	49
<b>Custo adaptativo e mitigação da resistência a duas toxinas Bt em populações da lagarta-do-cartucho</b> .....	49
<b>Resumo</b> .....	49
<b>Introdução</b> .....	50
<b>Materiais e Métodos</b> .....	52
<i>Populações do inseto</i> .....	52
<i>Escolha e cultivo das plantas hospedeiras</i> .....	53
<i>Desenho experimental</i> .....	53
<i>Estimativa do custo adaptativo da resistência em órgãos vegetativos de milho e algodão</i> .....	54
<i>Análise estatística</i> .....	54
<b>Resultados</b> .....	55
<b>Discussão</b> .....	56
<b>Referências</b> .....	59
<b>Figuras - Capítulo 3</b> .....	63
<b>Considerações Finais</b> .....	66

## RESUMO

OROZCO-RESTREPO, Silvana María, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Resistência ao milho Bt piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab na lagarta do cartucho: situação de campo, herança e estabilidade.** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientador: Oscar Fernando Santos-Amaya.

Mundialmente, toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) são usadas na agricultura para manejo de pragas, no entanto a adoção em larga escala de cultivares expressando tais toxinas tem levado ao surgimento de populações resistentes no campo. Alguns fatores da ecologia evolutiva da resistência, tais como a sua recessividade funcional e o desempenho reduzido dos insetos resistentes na planta Bt e não-Bt, são favoráveis ao manejo da resistência, porém esses fatores podem mudar ao longo do tempo. Nesse contexto, aqui se caracterizou a dinâmica da adaptação de insetos resistentes e suscetíveis à toxinas Bt Cry1A.105 + Cry2Ab na presença e ausência das toxinas. Isso foi feito durante dois anos em populações com diferentes históricos evolutivos e em diferentes contextos ecológicos. Como modelo de estudo usamos populações de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Como suspeito, as populações de campo, coletadas em lavouras de milho Bt piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab ou milho Bt Cry1F apresentaram baixa suscetibilidade a ambos milhos. Em bioensaios com larvas derivadas do campo em 2016 usando folhagem do milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e seu isogênico não-Bt, o nível de resistência decaiu em menos de 15 gerações sem pressão de seleção e a população foi extinta, indicando clara instabilidade da resistência. Isso porém não ocorreu na população resistente de 2013, na qual a resistência antes tinha forte custo adaptativo e era instável, indicando que mudanças na arquitetura genética da população devem ter ocorrido durante os cinco anos de intermitente pressão de seleção aplicada para manter o nível da resistência. A resposta da progênie F<sub>2</sub> e de retrocruzamentos indicaram que a resistência nessa população é controlada por um único locus ou mais de um fortemente ligados. Em outras duas populações coletadas em 2017 em campos com suspeita de falha de controle pelos milhos Cry1F e Cry1A.105 + Cry2Ab, a resistência foi estável durante 12 gerações sem pressão de seleção. Essa

resistência não apresentou custos adaptativos aos insetos quando eles desenvolveram em folhagem de milho não-Bt. O mesmo ocorreu em vários órgãos vegetativos de algodão, que é um hospedeiro alternativo de *S. frugiperda*, sendo que o desafio alimentar imposto às larvas não reduziu o desempenho da população resistente em relação às duas suscetíveis usadas no estudo. Em cruzamentos recíprocos entre insetos resistentes e suscetíveis, a progênie F<sub>1</sub> respondeu ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab semelhantemente à população parental suscetível, indicando ser a resistência funcionalmente recessiva. Os resultados desta pesquisa são importantes para nortear a elaboração e/ou recomendação de estratégias adequadas para desfavorecer a rápida seleção de insetos resistentes a plantas Bt no campo. Embora as populações resistentes de 2013 e 2016 tendiam a reestabelecer a suscetibilidade na ausência de pressão de seleção, os resultados mais recentes de 2017 mostraram que a resistência às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab em populações de campo pode ser completa, sem custo adaptativo e estável durante 12 gerações sem pressão de seleção. Essas condições são desfavoráveis ao manejo da resistência no campo. A única condição favorável é que a resistência parece ser funcionalmente recessiva, o que pode possibilitar o seu manejo se houver indivíduos suscetíveis que acasalem com os resistentes. Futuramente os esforços de pesquisa devem buscar entender a interação de táticas de manejo visando integração racional delas, o que pode auxiliar a evitar rápida perda da eficácia de certos cultivares Bt e outras tecnologias de manejo de pragas na agricultura mundial. O problema da resistência de *S. frugiperda* a toxinas Bt merece ser considerado porque há poucas toxinas potentes disponíveis e não há expectativa de lançamento de novas toxinas nos próximos anos.

## ABSTRACT

OROZCO-RESTREPO, Silvana María, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Resistance to Cry1A.105 + Cry2Ab pyramidal Bt corn in fall armyworm: field situation, inheritance and stability.** Advisor: Eliseu José Guedes Pereira. Co-advisor: Oscar Fernando Santos-Amaya.

Worldwide, *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins are used in agriculture for pest management, but the large-scale adoption of cultivars expressing Bt toxins has led to the emergence of resistant populations in the field. Some factors of the evolutionary ecology of Bt resistance, such as the functional recessiveness and the reduced fitness of resistant insects on Bt and non-Bt plants, are favorable to resistance management, but these factors may change over time. In this context, the fitness dynamics of insects resistant and susceptible Cry1A.105 + Cry2Ab Bt toxins was characterized in the presence and absence of the toxins. This was done for two years in populations with different evolutionary histories and in different ecological contexts. As a study model we used populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). As suspected, the field populations collected on field of Bt maize expressing Cry1A.105 + Cry2Ab or Cry1F showed low susceptibility to both Bt maize plants. In bioassays with field-derived larvae in 2016 using foliage of the Bt Cry1A.105 + Cry2Ab maize and its isogenic non-Bt cultivar, the level of resistance declined in less than 15 generations without selection pressure and the population was extinguished, indicating clear instability of resistance. This, however, did not occur in the resistant population of 2013, in which the resistance had a strong fitness costs and was unstable, indicating that changes in population genetic architecture must have occurred during the five years of intermittent selection pressure applied to maintain the resistance level. The response of the F<sub>2</sub> progeny and backcrosses indicated that the resistance in that population is controlled by a single locus or more than one tightly linked loci. In two other populations collected in 2017 in maize fields with suspected control failure by Cry1F and Cry1A.105 + Cry2Ab maize, resistance was stable for 12 generations without selection pressure. The resistant insects did not showed reduced fitness when they developed on foliage of non-Bt maize. The same occurred in several structures of cotton plants, which is

an alternative host of the fall armyworm, and the food challenge imposed on the larvae did not reduce the performance of the resistant population in relation to the two susceptible populations used in the study. In reciprocal crosses between resistant and susceptible insects, the F<sub>1</sub> progeny responded to Cry1A.105 + Cry2Ab maize similarly to the susceptible parental population, indicating that the resistance was functionally recessive. The results of this research should help devise and / or recommend appropriate strategies to manage the rapid selection of resistant insects to Bt plants in the field. Although the resistant populations of 2013 and 2016 tended to reestablish the susceptibility in the absence of selection pressure, recent results from 2017 showed that the resistance to Cry1A.105 + Cry2Ab toxins in field populations may be complete, without fitness costs and stable for 12 generations without selection pressure. These conditions are unfavorable to resistance management in the field. The only favorable condition is that the resistance appears to be functionally recessive, which may enable its management if susceptible fall armyworm moths mate with resistant ones. Future research efforts should try to understand the interaction of management tactics aiming to integrate them rationally. This may help to prevent the rapid loss of control efficacy of certain Bt cultivars and other pest management technologies. The issue of fall armyworm resistance to Bt toxins deserves consideration because there are few potent toxins available, only two or three, and no release of new toxins is expected in the coming years.

## Introdução Geral

Cultivares de plantas transgênicas expressando proteínas ou toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), tem sido amplamente adotadas para o controle de lagartas e alguns besouros no mundo (Carriere *et al.* 2010; Clive 2016). Essa ampla e repetida exposição dos insetos-alvos a toxinas Bt no campo gera uma alta pressão de seleção, resultando em alguns casos, na evolução de resistência com redução do efeito inseticida das plantas Bt (Janmaat & Myers 2003; Tabashnik *et al.* 2013). Especialmente, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) tem potencial de desenvolver resistência tanto a plantas Bt de uma toxina quanto a plantas Bt piramidadas contendo duas ou mais toxinas (Farias *et al.* 2014; Santos-Amaya *et al.* 2015; Omoto *et al.* 2016; França 2018).

Nos insetos resistentes a uma toxina Bt (e.g., Cry1F) parece haver ausência de desvantagem adaptativa, possivelmente devido aos mínimos efeitos pleiotrópicos do alelo de resistência (Santos-Amaya *et al.* 2017; Niu *et al.* 2018). Esse cenário é desfavorável ao manejo da evolução da resistência porque não deve haver forte seleção natural contra a resistência a campo. Entretanto, a realidade pode ser diferente para resistência conjunta a duas toxinas Bt, conforme indicam evidências prévias em nosso laboratório (França 2018; Santos-Amaya *et al.*, 2019).

Do ponto de vista ecológico-evolutivo, resistência a xenobióticos ou a patógenos é uma característica de história de vida sujeita a balanços com outras características do organismo, tais como investimento em crescimento, reprodução, etc., havendo assim um custo adaptativo (*fitness cost*) associado à resistência (Coustau *et al.* 2000). Tais custos ao organismo podem ser modulados e magnificados por variações nas condições ecológicas e ambientais nas quais estão expostas às populações resistentes, incluindo plantas hospedeiras (Janmaat & Myers 2005; Bird & Akhurst 2007; Saeed *et al.* 2010), competição (Chapman *et al.* 1999), aleloquímicos vegetais (Williams *et al.* 2011) e entomopatógeno (Raymond *et al.* 2007; Gassmann *et al.* 2008). Os custos adaptativos tendem a promover instabilidade ou declínio da resistência como consequência da desvantagem adaptativa dos insetos resistentes em relação aos suscetíveis, podendo restaurar a suscetibilidade populações resistentes dependendo do balanço da pressão seletiva

(Tabashnik *et al.* 1994; Cao *et al.* 2014). Contudo, em populações resistentes inicialmente com custo adaptativo pode haver mitigação do custo por seleção de alelos de resistência mais favoráveis ou de alelos de outros loci que podem agir como modificadores do custo adaptativo (Liu *et al.* 1996, Coustau *et al.* 2000; Guedes *et al.* 2006). Ou seja, se a pressão seletiva persistir por muitas gerações é provável que alterações genéticas ocorram para atenuar os efeitos deletérios causados pela adaptação inicial de modo a refiná-la, sendo que os custos adaptativos iniciais não mais serão detectados.

Portanto, usando como modelo populações de *S. frugiperda*, nosso estudo visou documentar a dinâmica evolutiva da resistência simultânea a duas toxinas Bt (Cry1A.105 + Cry2Ab) a campo e determinar possíveis custos adaptativos da resistência ao milho Bt piramidado, a magnificação desses custos sob influência hospedeira e suas instabilidade quando fora da pressão de seleção.

A presente tese foi elaborada em três capítulos. A hipótese inicial era que as populações recém-coletadas do campo apresentassem instabilidade (custo adaptativo) da resistência enquanto a população de laboratório que teve mais longo processo de seleção apresentasse resistência mais estável (com menor custo adaptativo). No Capítulo 1, mostramos que uma população de *S. frugiperda* coletada no campo em 2016 desenvolveu resistência às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab, a qual foi incompleta e instável, padrão oposto ao observado na população mantida em laboratório desde 2013. O Capítulo 2 descreve a pesquisa com duas novas populações de campo obtidas no final de 2017, mostrando que o perfil da resistência às duas toxinas mudou para completa, sendo ela estável durante 12 gerações sem exposição às toxinas. No Capítulo 3, usando folhagem de milho não-Bt e várias estruturas da planta de algodão, testamos se a estabilidade da resistência estava associada à ausência de custo adaptativo na população isolada do campo em 2017 e naquela mantida laboratório desde 2013. Finalmente, nas Considerações Finais, concluímos que todo esse cenário é desfavorável ao manejo da resistência de *S. frugiperda* a Cry1A.105 + Cry2Ab, exceto pela recessividade da resistência, e que isso deve ser considerado no uso racional de estratégias de manejo da resistência.

## Referências

- Bird, L.J. & Akhurst, R.J. (2007). Effects of host plant species on fitness costs of Bt resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 40, 196-203.
- Cao, G., Feng, H., Guo, F., Wu, K., Li, X., Liang, G. *et al.* (2014). Quantitative analysis of fitness costs associated with the development of resistance to the bt toxin cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 4.
- Carriere, Y., Crowder, D.W. & Tabashnik, B.E. (2010). Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. *Evolutionary Applications*, 3, 561-573.
- Chapman, J.W., Williams, T., Escribano, A., Caballero, P., Cave, R.D. & Goulson, D. (1999). Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Behavioral Ecology*, 10, 298-303.
- Clive, J. (2016). Global status of commercialized biotech/gm crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca (NY).
- Coustau, C. Chevillon, C. & french-Constant, R. (2000). Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 378-383.
- Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., dos Santos, A.C. *et al.* (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64, 150-158.
- França, J.C.O. (2018). Desempenho de populações de campo de *Spodoptera frugiperda* em milhos Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa. . In: *Entomologia*. Universidade Federal de viçosa, p. 20.
- Gassmann, A.J., Stock, S.P., Sisterson, M.S., Carriere, Y. & Tabashnik, B.E. (2008). Synergism between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* crops: integrating biological control and resistance management. *Journal of Applied Ecology*, 45, 957-966.
- Guedes R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B. & Serrão J.E. (2006) Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31:30–38.
- Janmaat, A.F. & Myers, J.H. (2005). The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272, 1031-1038.
- Niu, Y., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2018). Inheritance and fitness costs of Cry1A. 105 resistance in two strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Crop protection*, 110, 229-235.

- Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R.J., Dourado, P.M., Crivellari, A. *et al.* (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72, 1727-1736.
- Raymond, B., Sayyed, A.H., Hails, R.S. & Wright, D.J. (2007). Exploiting pathogens and their impact on fitness costs to manage the evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Ecology*, 44, 768-780.
- Saeed, S., Sayyed, A.H. & Ahmad, I. (2010). Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, 83, 165-172.
- Santos-Amaya, O.F., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Tavares, C.S., Campos, S.O., Guedes, R.N.C. *et al.* (2015). Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5.
- Santos-Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Campos, S.O., Guedes, R.N.C., Alves, A.P. *et al.* (2017). Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 73, 35-43.
- Tabashnik, B.E., Groeters, F.R., Finson, N. & Johnson, M.W. (1994). Instability of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Science and Technology*, 4, 419-426.
- Williams, J.L., Ellers-Kirk, C., Orth, R.G., Gassmann, A.J., Head, G., Tabashnik, B.E. *et al.* (2011). Fitness cost of resistance to Bt cotton linked with increased gossypol content in pink bollworm larvae. *Plos One*, 6.

# Capítulo I

## Resistência de campo da lagarta-do-cartucho às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e sua instabilidade na ausência de pressão de seleção

### Resumo

Mundialmente, as plantas transgênicas piramidadas expressando conjuntamente duas ou mais proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), são usadas para aumentar a eficácia e a amplitude de controle de insetos-praga e retardar a seleção de resistência em populações dos insetos-alvos. Bioensaios de tecido foliar Bt piramidado foram realizados com larvas de *Spodoptera frugiperda* provenientes do campo para avaliar a resistência dos indivíduos à tecnologia Bt. A população de campo e outra de laboratório com resistência ao milho piramidado foram colocadas fora da exposição a Bt para caracterizar instabilidade da resistência ao longo do tempo. Adicionalmente, foi caracterizado o modo de herança da resistência simultânea a duas toxinas. Como suspeitado, a população de campo apresentou baixa suscetibilidade ao milho Bt piramidado. No entanto, no período de 15 meses em que os insetos ficaram sem exposição a Bt foi restabelecida a suscetibilidade da população, que perdeu completa capacidade reprodutiva dos indivíduos ao serem criados em folhagem do mesmo milho Bt que foi o agente de seleção. A população de laboratório perdeu parte da resistência ao milho Bt, porém, houve uma frequência de cerca de 20% dos indivíduos resistentes que se mantiveram na população ao longo do tempo sem pressão de seleção. O modo de herança monogênica da resistência se enquadrou nos resultados dos cruzamentos, indicando que a resistência simultânea a duas toxinas parece determinada por um único gene ou mais de um gene fortemente ligados. Esses resultados mostram que em alguns casos a resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab em *S. frugiperda* pode ser instável, porém pode se tornar estável em populações que em houver pressão de seleção continuada.

**Palavras-chave:** *Spodoptera frugiperda*, milho Bt, reversão de resistência, custo adaptativo.

## Introdução

Cultivares de plantas transgênicas expressando proteínas ou toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), tem sido amplamente adotados para o controle de lagartas e alguns besouros no mundo (Carriere *et al.* 2010; Clive 2016). Ampla e repetida exposição dos insetos-alvos a toxinas Bt no campo gera uma alta pressão de seleção, resultando em alguns casos, na evolução de resistência com redução do efeito inseticida das plantas Bt (Janmaat & Myers 2003; Tabashnik *et al.* 2013). *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) tem potencial de desenvolver resistência tanto a plantas de milho Bt de uma toxina quanto a plantas Bt piramidadas, produzindo duas ou mais toxinas (Storer *et al.* 2010; Farias *et al.* 2014; Santos-Amaya *et al.* 2015; Omoto *et al.* 2016). Os mecanismos bioquímico-moleculares de resistência de insetos a toxinas Bt fundamentam-se na perda de afinidade de ligação da toxina Bt a receptores e/ou alterações em proteínas essenciais para a rota de toxicidade ou patogênica de Bt no tubo digestivo do inseto (Jurat-Fuentes *et al.* 2011; Tiewisiri & Wang 2011). Mecanicamente, Gassmann *et al.* (2009) hipotetiza que as ditas modificações associadas a resistência a Bt podem trazer um incremento da permeabilidade da membrana do intestino do inseto resistente. Isto pode desencadear prejuízos tanto nos processos destoxificativos como nos digestivos, ocasionando desordem fisiológica para aquisição e alocação de matéria e energia no indivíduo resistente.

Do ponto de vista ecológico-evolutivo, resistência a xenobióticos ou a patógenos é uma característica de história de vida sujeita a balanços com outras características do organismo, tais como investimento em crescimento, reprodução, etc., havendo assim um custo adaptativo (*fitness cost*) associado à resistência (Coustau *et al.* 2000). Tais custos adaptativos tendem a promover instabilidade ou declínio da resistência como consequência da desvantagem adaptativa dos insetos resistentes em relação aos suscetíveis, podendo restaurar a suscetibilidade de populações resistentes dependendo do balanço da pressão seletiva (Tabashnik *et al.* 1994; Cao *et al.* 2014). Entretanto, a falta de custo adaptativo nos insetos resistentes a uma toxina Bt (Santos-Amaya *et al.* 2017a; Niu *et al.* 2018) possivelmente pelos mínimos efeitos pleiotrópicos do alelo de resistência, é desfavorável ao manejo da

da resistência e configura em uma situação de maior um risco à perda de eficiência da tecnologia Bt piramidada. Além disso, em populações resistentes inicialmente com custo adaptativo pode haver mitigação do custo por seleção de alelos de resistência mais favoráveis ou de alelos de outros loci que podem agir como modificadores do custo adaptativo (Liu *et al.* 1996, Coustau *et al.* 2000)

Com base nesta problemática, no presente estudo documentou-se em uma população de campo de *S. frugiperda* sua resistência ao milho Bt piramidado com as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e foi analisado o modo de herança da resistência simultânea a ambas as toxinas. Adicionalmente, documentou-se a instabilidade e reversão da resistência através da manutenção das populações de campo e laboratório fora da exposição ao milho Bt. A hipótese era que a população recém-coletada do campo apresentasse instabilidade (custo adaptativo) da resistência, enquanto a população de laboratório que teve mais longo processo de seleção apresentasse resistência mais estável (com menor custo adaptativo).

## **Material e Métodos**

### *Origem e manutenção dos insetos*

Uma população suscetível de *S. frugiperda* (Embrapa), uma população resistente de laboratório (LabRR) às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e uma população coletada em campo com suspeita de resistência (DZO) ao milho piramidado foram utilizadas neste estudo. A população LabRR foi derivada a partir de uma população base coletada em lavouras de milho no estado da Bahia, Brasil, mediante seleção contínua em laboratório por 11 gerações de exposição ao milho Bt que expressa conjuntamente as toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab (Santos-Amaya *et al.* 2015). A população DZO foi coletada em 2016 na região de Viçosa, MG, Brasil, em uma lavoura de milho Cry1A.105 e Cry2Ab fortemente infestada por *S. frugiperda*. Larvas de 4º e 5º instar foram colocadas individualmente em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, São Paulo, Brasil) e trazidas para o laboratório. As larvas continuaram sendo alimentados com seções de folha do mesmo milho Bt até atingirem o estágio pupa e os adultos emergidos foram

colocados em gaiolas para o acasalamento e estabelecimento da nova progênie. Para manutenção das posteriores gerações das populações mencionadas acima, larvas foram alimentadas em milho expressando as duas toxinas ou em dieta artificial (Kasten Jr *et al.* 1978) sem nenhuma exposição a inseticidas. Mariposas foram mantidas em gaiolas de PVC (40 cm de altura x 30 cm de diâmetro) recobertas internamente com papel sulfite para oviposição e alimentadas com solução aquosa de 10% açúcar e 5% de ácido ascórbico. Os ovos foram coletados a cada dois dias e armazenados em sacolas plásticas até a eclosão. A criação permaneceu sob ambiente controlado ( $27 \pm 2$  °C, UR  $70 \pm 15$  % e fotoperíodo 14L: 10E).

*Nível de resistência da população de campo em folhas de milho Cry1A.105 + Cry2Ab*

As taxas de sobrevivência dos estágios larval e pupal foram quantificadas na primeira geração ( $F_1$ ) procedente dos insetos coletados em campo (i.e., população DZO). A suscetibilidade dos indivíduos foi determinada pela exposição ao milho Bt piramidado expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e seu respectivo isohíbrido (variedade híbrida RB9110 PRO e sua isogênica RB9110, Riber KW Sementes, Patos de Minas, MG). Folhas foram obtidas de plantas em estágio V4-V9 cultivadas em condições de campo e seguindo os tratamentos culturais recomendados, com irrigação diária visando obter alimento de boa qualidade para os indivíduos ao longo do experimento. Grupos de cinco neonatas (< 24 h) da população DZO foram transferidas para cada célula de bandejas de PVC de 16 poços e alimentadas com seções foliares Bt ou não-Bt ( $n = 160$ ). A sobrevivência e biomassa larval foram mensuradas aos sete e quatorze dias. O número de indivíduos que atingiram o estágio de pupa, a biomassa das pupas e o tempo de desenvolvimento de neonata até pupa também foi medido ao longo do experimento.

### *Caracterização do desempenho (fitness) na ausência de pressão de seleção*

No laboratório, as populações DZO (campo) e LabRR (laboratório) foram mantidas fora da exposição ao milho piramidado durante 48 e 15 meses respectivamente. O desempenho de cada população foi avaliado em três gerações dentro desses períodos. De cada população, 160 neonatas foram alimentadas com pedaços de folhas de milho produzindo Cry1A.105 + Cry2Ab ou seu isohíbrido não-Bt. A cada geração de avaliação, larvas foram individualizadas após sete dias e em seguida pesadas e acompanhadas até atingirem o estágio de pupa. A sobrevivência de pupas, a biomassa pupal e tempo de desenvolvimento de neonata até pupa também foi mensurado para cada população ao longo das gerações.

### *Determinação das características reprodutivas e de crescimento populacional*

Características da história de vida relacionadas com a capacidade reprodutiva dos indivíduos e o potencial de crescimento populacional foram avaliados ao longo das gerações. Para cada população pupas obtidas de cada tratamento do experimento descrito acima foram sexadas para constituir 15 casais virgens. Adultos recém-emergidos foram acasalados individualmente em gaiolas de PVC (10 cm de altura e 10 cm de diâmetro) e alimentados com solução aquosa de 10% açúcar e 5% de ácido ascórbico. As gaiolas foram recobertas com papel sulfite como substrato de oviposição. As posturas de ovos foram coletadas e contabilizadas diariamente até a morte da fêmea. Os ovos foram colocados em sacos plásticos e após a sua eclosão o número de neonatas por fêmea foi mensurado para registrar a fertilidade ao longo da vida. Adicionalmente, com o pacote estatístico lifetable SAS 9.0 a taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ) foi calculada.

### *Estimativa do número de loci associados à resistência Cry1A.105 e Cry2Ab*

Para caracterizar o número de genes envolvidos na resistência às toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab, as populações LabRR (RR) e Embrapa (SS) foram utilizadas como linhagens parentais. Larvas de cada população foram inicialmente alimentadas com milho Bt ou não-Bt, respectivamente, até pupa e após

emergência dos adultos pelo cruzamento massal (30 casais em uma gaiola) foram obtidos o genótipos heterozigotos ( $F_1$ ). Seguindo a metodologia descrita por Tabashnik (1991) foi realizado um autocruzamento da progênie  $F_1$  ( $F_1 \times F_1$ ) e um retrocruzamento com a linhagem resistente ( $F_1 \times \text{LabRR}$ ). Neonatas das progênies provenientes dos cruzamentos e dos parentais foram individualizadas em bandejas de bioensaio de 128 células e expostas ao milho piramidado expressando Cry1A.105 + Cry2Ab ou ao seu isohíbrido não-Bt. A mortalidade larval foi registrada sete dias após para testar o modelo mendeliano monogênico (Tabashnik 1991). Se a resistência a duas toxinas estiver associada a um único fator genético (gene ou mais de um gene fortemente ligados), as proporções genótípicas esperadas da progênie  $F_2$  serão 25% SS, 50% SR e 25% RR, enquanto para a progênie do autocruzamento será 50% RS e 50% RR. Assim, com os dados de mortalidade obtidos, a hipótese de herança monogênica foi avaliada usando o teste de qui-quadrado.

#### *Análise estatística*

A quantificação das taxa de sobrevivência na população de campo (DZO) foi analisada através da comparação dos indivíduos alimentados nas duas versões de milho (Bt e não-Bt). Os dados foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) e quando pertinente, a diferença entre as médias dos tratamentos foram separadas através do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) (SigmaPlot 9.0). Os dados de sobrevivência pupal avaliados ao longo do tempo fora da pressão de seleção do Bt foram submetidos a análise de variância de uma via para determinar a diferença entre as médias. Os dados de biomassa de larvas e pupas e os tempos de desenvolvimento dos indivíduos bem como dados de fecundidade, viabilidade de ovos e fertilidade foram analisados de forma semelhante. O potencial de crescimento populacional de cada população foi analisado conforme relatado por Maia *et al.* (2000) usando a técnica de Jackknife para estimar as variâncias dos parâmetros de tabela de vida (SAS 2011).

## **Resultados**

### **Resistência da população de campo ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab**

Quando expostos ao milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab, a progênie ( $F_1$ ) dos indivíduos procedentes da coleta de campo em milho Bt piramidado mostrou capacidade de sobreviver e se desenvolver até adulto deixando descendentes. As características da história de vida dos insetos criados no milho Bt ou o seu isohíbrido não-Bt são mostrados na Fig.1.1. As taxas de sobrevivência larval mensuradas aos 7 e 14 dias além da sobrevivência de pupa foram menores no milho piramidado ( $P < 0,05$ ), sendo em média a metade da sobrevivência no milho não-Bt (Fig.1.1a). O ganho de biomassa das larvas foi reduzido na exposição ao milho Bt nos primeiros sete dias de desenvolvimento ( $P < 0,05$ ), porém o peso das larvas após 14 dias e das pupas foi similar em ambos os milhos ( $P > 0,05$ ) (Fig.1.1b). O tempo de desenvolvimento dos insetos expostos ao milho Bt durou 3 dias a mais até eles atingirem o estágio de pupa ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1.1c).

### **Reversão da resistência ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab**

#### ***Estabilidade da resistência***

Ao longo de várias gerações na ausência de pressão de seleção, mensurou-se a sobrevivência de uma população de laboratório (LabRR) submetida a um longo período de seleção ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab e da população de campo (DZO) coletada em lavoura com suspeita de falha de controle em 2013, ambas com baixa suscetibilidade ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab. Ambas as populações mostraram uma redução significativa na resistência ao milho Bt ao longo do tempo fora da exposição às toxinas Bt (Fig.1.2). A sobrevivência da população de campo DZO diminuiu no milho Bt até atingir, após quinze meses, o nível de 6% de sobrevivência pupal ( $P < 0,01$ ). Na população LabRR, após 28 meses fora da exposição a sobrevivência reduziu para próximo de 20%, e interessante, depois se manteve no mesmo patamar ( $P = 0,12$ ). No milho não-Bt a

sobrevivência não variou significativamente ao longo das gerações, assim as médias foram o melhor preditor em ambas as populações ( $P > 0,05$ ).

### ***Histórico de vida sem exposição às toxinas Bt***

As características dos indivíduos na fase imatura criados no milho não-Bt ou milho expressando Cry1A.105 e Cry2Ab são mostradas na Fig. 1.3. Para todas as gerações avaliadas, a biomassa larval aos 7 dias nos indivíduos de ambas as populações criados no milho Bt foi significativamente menor que naqueles criados no milho não-Bt ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1.3a-b). A biomassa pupal dos indivíduos da população DZO variou para cada geração avaliada, sendo menor no milho Bt na primeiro mês e após 15 meses a biomassa pupal foi maior nos indivíduos criados no milho Bt ( $P < 0,05$ ). Em contraste, não houve diferenças nos indivíduos da população LabRR quando criados em ambos os milhos ( $P > 0,05$ ) (Fig. 1.3c-d). Os indivíduos criados no milho Bt de ambas as populações tiveram atraso no tempo de desenvolvimento para atingir a fase de pupa em todas as gerações ( $P > 0,05$ ) (Fig. 1.3e-f).

### ***Fecundidade e fertilidade***

Durante o período reprodutivo dos adultos de cada população foi quantificado através das gerações o número de descendentes por fêmea (fertilidade) nos dois tipos de milho. Houve variação da fertilidade entre cada geração testada de cada população. No entanto, a oviposição, a percentagem de eclosão e os descendentes por fêmeas das populações DZO e LabRR nos dois tipos de milho não foi diferente até o quinto e trigésimo segundo mês de avaliação respectivamente ( $P > 0,05$ ). Em contraste, no quadragésimo oitavo mês, as fêmeas da população LabRR apresentaram seis vezes menos neonatas por fêmea ( $F = 6,61$ ;  $gl = 1, 23$ ;  $P = 0,02$ ) (Fig. 1.4f). Na população DZO no décimo quinto mês não houve oviposição dos indivíduos criados em folhagem Bt e portanto ela foi extinta (Fig. 1.4e).

### ***Crescimento populacional fora da exposição às toxinas Bt***

As mudanças nos valores da taxa intrínseca de crescimento populacional ao longo das gerações quando os insetos permaneceram fora da exposição às toxinas Bt são mostrados na Fig. 1.5. Para a população LabRR, o valor da taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) dos insetos criados em folhagem do milho Bt foi menor que aquele dos insetos criados na folhagem não-Bt somente no primeiro mês de avaliação ( $P < 0,05$ ) e posteriormente manteve-se similar em ambos os milhos ( $P > 0,05$ ) (Fig. 1.5a). Para a população DZO, as taxas de crescimento populacional não diferiram na primeira e quinta geração ( $P > 0,05$ ). No entanto, quinze meses fora da exposição ao milho Bt foram suficientes para que a população perdesse a resistência ao milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab (Fig. 1.5b), não havendo reprodução nos poucos indivíduos que atingiram a fase adulta.

### ***Modo de herança da resistência às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab***

Como apenas insetos da população resistente LabRR sobreviveram, avaliou-se neles o modelo de herança monogênica (o mais simples) por comparações entre as mortalidades esperadas e observadas da progênie  $F_2$  ( $F_1 \times F_1$ ) e do retrocruzamento ( $F_1 \times \text{LabRR}$ ) em bioensaios com folha de milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. A mortalidade observada dos genótipos da geração  $F_2$  e do retrocruzamento  $F_1 \times \text{LabRR}$  foi 28,9% e 46,06% respectivamente, similar às proporções fenotípicas esperadas dentro do modelo (i.e.,  $F_2 = 30\%$ ;  $F_1 \times \text{LabRR} = 50\%$ ) (Fig. 1.6). No teste de qui-quadrado não foi rejeitada a hipótese de herança monogênica ( $\chi^2 = 0,127$ , gl = 3,  $P > 0,98$ ). Portanto, segregação da população em ambas as gerações ajustou-se ao modelo no qual a resistência a duas toxinas está associada com um único gene, ou mais de um ligados fortemente.

## **Discussão**

Este estudo reporta pela primeira vez que larvas de *S. frugiperda* derivadas de indivíduos coletados em campo de milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab possuíam de

fato uma baixa suscetibilidade à exposição ao milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. Os parâmetros avaliados mostram a capacidade dos indivíduos em sobreviver quando criados em folhagem do milho Bt piramidado. Embora as sobrevivências larval e pupal foram menores no milho Bt que no milho não-Bt, os indivíduos completaram o seu desenvolvimento larval. Esse desempenho menor dos indivíduos resistentes no milho Bt em relação ao desempenho deles no milho não-Bt (isogênico) permite o reconhecimento da resistência como incompleta (Carriere & Tabashnik 2001; Carriere *et al.* 2010).

Um estudo anterior da resistência da população LabRR, que é derivada de coleta em campo em 2013 e depois selecionada em laboratório com as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab, mostrou que a resistência foi caracterizada como autossômica, sem efeito maternal, completamente recessiva, incompleta (Santos-Amaya *et al.* 2015) e apresentando custos adaptativos (Santos-Amaya *et al.* 2019). Aqui, demonstramos que o modo de herança da resistência parece ser determinada por um único gene (monogênica), ou mais genes fortemente ligados que se segregam com um único fator genético. Dado que evolução de resistência depende do desempenho dos diferentes fenótipos da população e do tipo de planta disponível no campo (i.e., refúgio ou plantas Bt), custos adaptativos e resistência incompleta podem atrasar o desenvolvimento de resistência e manter a eficiência em campo das culturas piramidadas (Carriere & Tabashnik 2001; Crowder & Carrière 2009).

Larvas da população DZO com sete dias de exposição ao milho Bt sofrem um significativo efeito deletério no ganho de peso, porém conseguem recuperar o crescimento posteriormente até atingirem com sucesso a fase de pupa. Algumas dessas características biológicas são consistentes com a resposta à seleção de *S. frugiperda* em laboratório, a qual levou a resistência simultânea às duas toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab (Santos-Amaya *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2019).

Nas Américas, populações de *S. frugiperda* tem desenvolvido rapidamente resistência de campo a uma única toxina Bt (Storer *et al.* 2010; Farias *et al.* 2014;

Santos-Amaya *et al.* 2017b). Assim, a partir de 2008, a piramidação tem sido usada como uma estratégia de manejo da resistência com o intuito atrasar a evolução de resistência da praga às toxinas de Bt disponíveis (Carrière *et al.* 2015). No entanto, a prevalência de plantios sucessivos e a resistência cruzada entre as toxinas Cry1Fa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1A.105, deixando no milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab somente Cry2Ab como toxina ativa contra *S. frugiperda* (Hernández-Rodríguez *et al.* 2013; Huang *et al.* 2014; Santos-Amaya *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2019), acelera o processo de seleção de indivíduos resistentes no campo (Tabashnik & Carrière 2017). Contudo, algumas características da ecologia evolutiva das populações resistentes (e.g., custos adaptativos) podem ajudar a manter um certo nível de eficácia e durabilidade da tecnologia.

Custos adaptativos são geralmente associados aos efeitos deletérios produzidos pelo alelo de resistência, os quais em um ambiente na ausência do agente seletivo (toxina Bt) levam a um desempenho final (i.e., fitness) dos indivíduos resistentes inferior ao desempenho dos indivíduos suscetíveis (Gassmann *et al.* 2009). Esse estudo reporta pela primeira vez em *S. frugiperda* que tanto a população resistente de laboratório (LabRR) quanto a população coletada em campo com baixa suscetibilidade ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab(DZO) perderam adaptação a essas toxinas Bt ao longo do período que permaneceram sem pressão de seleção fora da exposição às toxinas Bt. O nível de resistência de ambas as populações LabRR e DZO decresceu ao longo do tempo, porém na última o forte custo adaptativo levou à sua extinção quando permaneceu fora da exposição ao milho Bt por 15 meses. Resultados de estudos publicados associando efeitos deletérios da resistência Cry1A.105 + Cry2Ab tem sido divergentes com populações que parecem apresentar ou não custos adaptativos (Acharya *et al.* (2017); Bernardi *et al.* 2017; Niu *et al.* 2018). Essa divergência não é surpreendente porque a arquitetura genética nas populações resistentes é dinâmica devido aos processos evolutivos, sendo que o histórico de seleção de alelos de resistência e de outros genes ligados a eles pode levar a diferentes cenários nas populações.

A população LabRR foi caracterizada anteriormente com custo adaptativo quando comparada com sua população isogênica no milho não-Bt (Santos-Amaya et al. 2019). Neste trabalho, após 28 meses fora da pressão de seleção, a população resistente apresentou considerável perda de resistência ao milho piramidado, sendo que a sobrevivência dos indivíduos reduziu a aproximadamente 20% no milho piramidado. Após esse período a percentagem de sobrevivência da população manteve-se no mesmo nível. Esses resultados são consistentes com a prévia caracterização da população resistente (Santos-Amaya et al. 2019). Interessantemente, os efeitos subletais gerados pela alimentação na folhagem do milho Cry1A.105 + Cry2Ab, observados pela menor biomassa larval e maior tempo de desenvolvimento até pupa, não afetaram a fertilidade e as taxas de crescimento populacionais nas subseqüentes gerações. Embora houvesse menor proporção de sobrevivência de fêmeas obtidas no milho piramidado que no milho não-Bt, os indivíduos compensaram o desempenho reprodutivo através da quantidade de ovos férteis colocados e, assim, não houve efeitos negativos nas taxas intrínsecas de crescimento populacional ( $r_m$ ) ao longo das últimas gerações. Esse padrão de resposta parece consistente com Liu *et al.* (1996), que argumenta que com uma seleção prolongada com toxina pode haver redução de custos adaptativos pela substituição por alelos alternativos conferindo resistência ou pela seleção de loci modificadores não relacionados diretamente com a resistência.

Este estudo também mostrou que a população de campo DZO manteve uma constante queda no desempenho demográfico ao longo do tempo avaliado, e finalmente, quinze meses após estar fora da exposição às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab, não houve indivíduos viáveis para o acasalamento, impossibilitando a geração de nova progênie e levando a população à extinção. Pouco há na literatura sobre o restabelecimento de suscetibilidade em populações resistentes. Atualmente, as populações de *S. frugiperda* com resistência de campo a toxina Bt (i.e., Cry1Fa) têm sido caracterizadas com ausência de custos adaptativos, o que é associado à manutenção da resistência ao longo do tempo (Jakka *et al.* 2014; Vélez *et al.* 2014; Horikoshi *et al.* 2015; Santos-Amaya *et al.* 2017b). A reversão de resistência é mais provável quando existem custos adaptativos aditivos ou

dominantes nos indivíduos resistentes (Carriere & Tabashnik 2001). Os resultados desta pesquisa indicam diferenças na tendência de restabelecimento da suscetibilidade na ausência de exposição a Bt, possivelmente devido à influência do histórico evolutivo de cada população.

Em resumo, este trabalho documenta pela primeira vez resistência de campo ao milho piramidado expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Abem uma população de *S. frugiperda*. Adicionalmente, demonstrou-se instabilidade da resistência, o que pode estar associado a um forte custo adaptativo, um fator que parece oferecer condição favorável ao manejo da resistência. O custo adaptativo deve contribuir para o atraso do surgimento de resistência em populações de *S. frugiperda* Cry1A.105 + Cry2Abou até a reversão da mesma, conforme ocorreu na população de campo aqui estudada. No entanto, é necessário mais pesquisa sobre a característica de instabilidade da resistência simultânea às duas toxinas. Assim, manter os esforços para verificar se alguns cenários tais como a integração de milho Bt com o uso de inseticidas via tratamento de semente e/ou pulverização pode ser útil para o racional controle da praga e a eficácia da tecnologia Bt em cultivares de milho e outras culturas na agricultura mundial.

## Referências

- Acharya, B., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2017). Fitness costs and inheritance of Cry2Ab2 resistance in *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Journal of invertebrate pathology*, 149, 8-14.
- Bernardi, D., Bernardi, O., Horikoshi, R.J., Salmeron, E., Okuma, D.M., Farias, J.R. *et al.* (2017). Selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034× TC1507× NK603 maize technology. *Crop Protection*, 94, 64-68.
- Cao, G., Feng, H., Guo, F., Wu, K., Li, X., Liang, G. *et al.* (2014). Quantitative analysis of fitness costs associated with the development of resistance to the bt toxin cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 4.
- Carrière, Y., Crickmore, N. & Tabashnik, B.E. (2015). Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature biotechnology*, 33, 161.

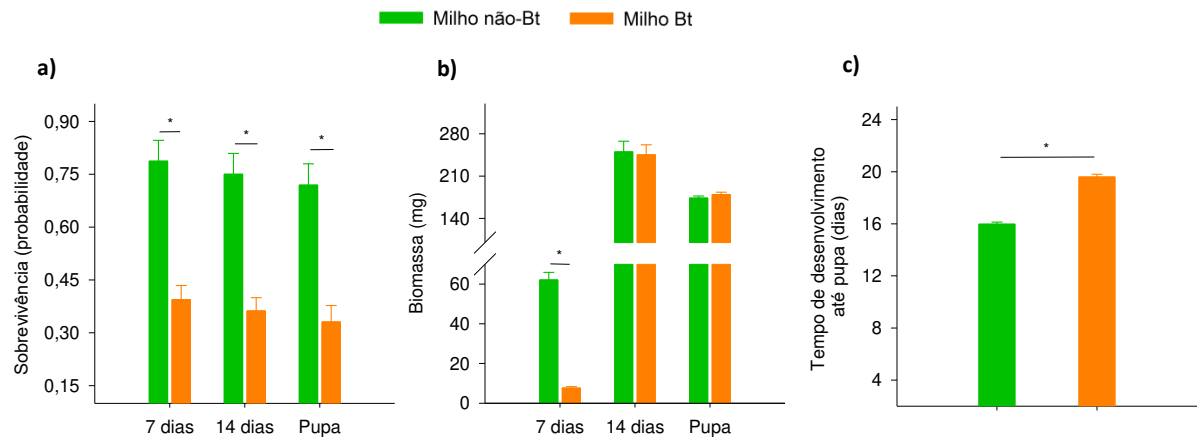
- Carriere, Y., Crowder, D.W. & Tabashnik, B.E. (2010). Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. *Evolutionary Applications*, 3, 561-573.
- Carriere, Y. & Tabashnik, B. (2001). Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268, 1475-1480.
- Clive, J. (2016). Global status of commercialized biotech/gm crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca (NY).
- Coustau, C. Chevillon, C. & french-Constant, R. (2000). Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 378-383.
- Crowder, D.W. & Carrière, Y. (2009). Comparing the refuge strategy for managing the evolution of insect resistance under different reproductive strategies. *Journal of Theoretical Biology*, 261, 423-430.
- Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., dos Santos, A.C. *et al.* (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64, 150-158.
- Gassmann, A.J., Carriere, Y. & Tabashnik, B.E. (2009). Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 54, 147-163.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Hernández-Martínez, P., Van Rie, J., Escriche, B. & Ferré, J. (2013). Shared midgut binding sites for Cry1A, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PloS one*, 8, e68164.
- Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Bernardi, D., Okuma, D.M., Farias, J.R., Miraldo, L.L. *et al.* (2015). Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. *Journal of economic entomology*, 109, 854-859.
- Huang, F., Qureshi, J.A., Meagher Jr, R.L., Reising, D.D., Head, G.P., Andow, D.A. *et al.* (2014). Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *PloS one*, 9, e112958.
- Jakka, S., Knight, V. & Jurat-Fuentes, J. (2014). Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 107, 342-351.
- Janmaat, A.F. & Myers, J. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers,

*Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270, 2263-2270.

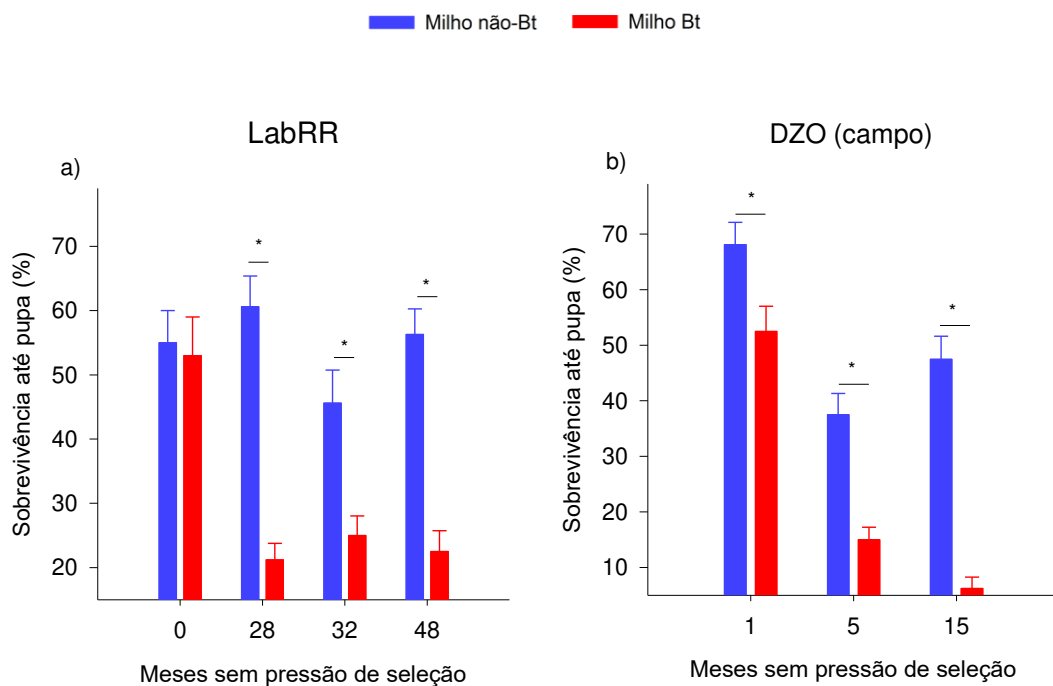
- Jurat-Fuentes, J.L., Karumbaiah, L., Jakka, S.R.K., Ning, C., Liu, C., Wu, K. *et al.* (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Plos One*, 6.
- Liu, Y.-B., Tabashnik, B.E. & Puzshtai-Carey, M. (1996). Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89, 798-804.
- Maia, A.H.N., Luiz, A.J.B. & Campanhola, C. (2000). Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: Computational aspects. *Journal of Economic Entomology*, 93, 511-518.
- Niu, Y., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2018). Inheritance and fitness costs of Cry1A. 105 resistance in two strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Crop protection*, 110, 229-235.
- Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R.J., Dourado, P.M., Crivellari, A. *et al.* (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72, 1727-1736.
- Santos-Amaya, O.F., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Tavares, C.S., Campos, S.O., Guedes, R.N.C. *et al.* (2015). Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5.
- Santos-Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Campos, S.O., Guedes, R.N.C., Alves, A.P. *et al.* (2017a). Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 73, 35-43.
- Santos-Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Rodrigues-Silva, N., Guedes, R.N.C. *et al.* (2017b). Magnitude and allele frequency of cry1F resistance in field populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 110, 1770-1778.
- SAS, I. (2011). STAT 9.3 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Storer, N.P., Babcock, J.M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G.D., Bing, J.W. *et al.* (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103, 1031-1038.
- Tabashnik, B.E. (1991). Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. *Journal of Economic Entomology*, 84, 703-712.

- Tabashnik, B.E., Brévault, T. & Carrière, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature biotechnology*, 31, 510-521.
- Tabashnik, B.E. & Carrière, Y. (2017). Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nature biotechnology*, 35, 926.
- Tabashnik, B.E., Groeters, F.R., Finson, N. & Johnson, M.W. (1994). Instability of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Science and Technology*, 4, 419-426.
- Tiewsiri, K. & Wang, P. (2011). Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 14037-14042.
- Vélez, A., Spencer, T., Alves, A., Crespo, A. & Siegfried, B. (2014). Fitness costs of Cry1 F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of applied entomology*, 138, 315-325.
- Zhu, C., Niu, Y., Zhou, Y., Guo, J., Head, G.P., Price, P.A. *et al.* (2019). Survival and effective dominance level of a Cry1A. 105/Cry2Ab2-dual gene resistant population of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) on common pyramided Bt corn traits. *Crop Protection*, 115, 84-91.

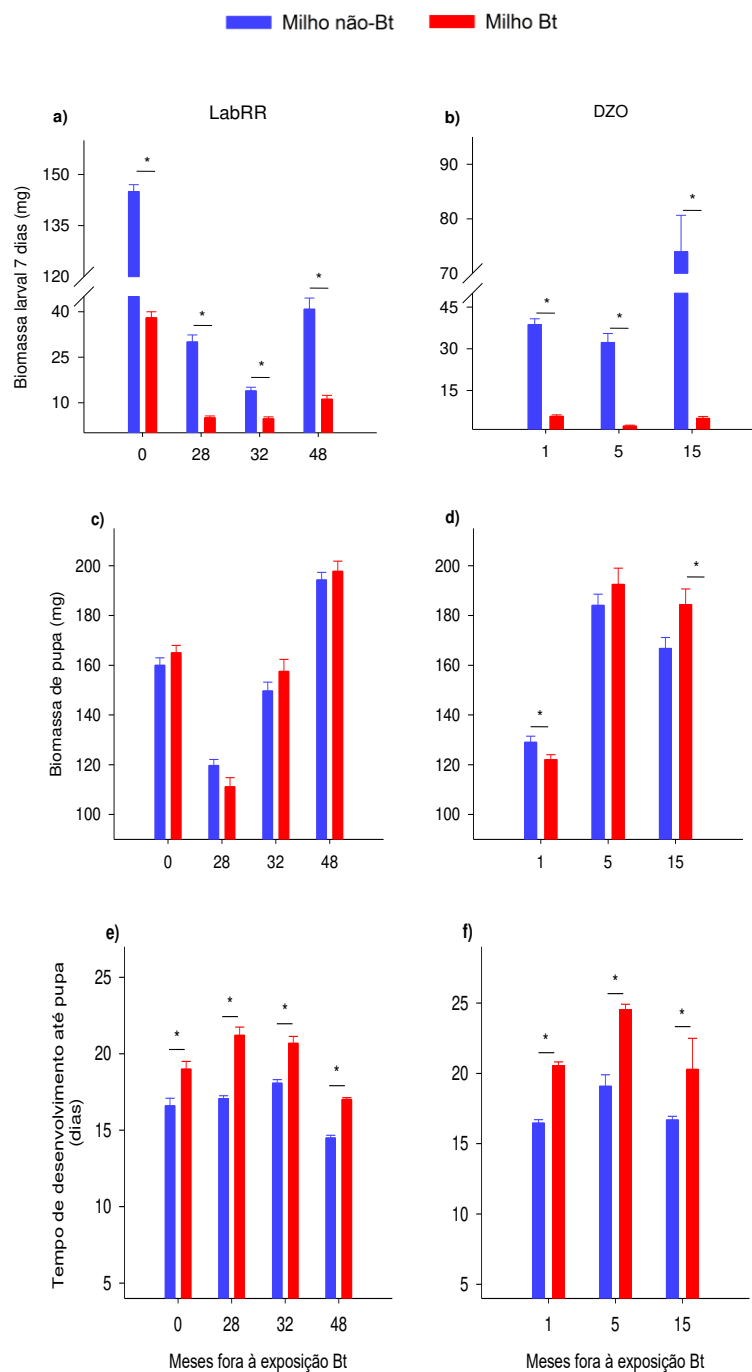
## Figuras - Capítulo I



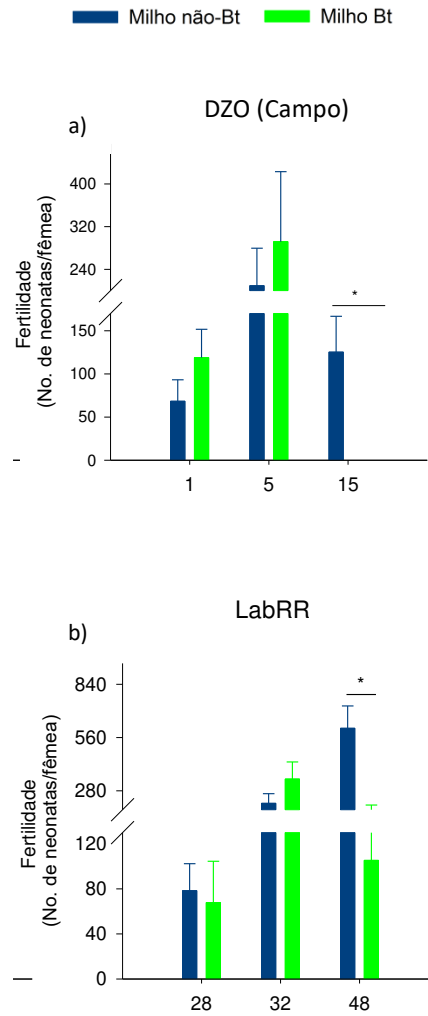
**Figura 1.1. Caracterização do desempenho da população de *S. frugiperda* (DZO) coletada em 2016 em campo com suspeita de falha de controle pelo milho Bt pirimidado Cry1A.105 + Cry2Ab.** Dados são médias  $\pm$  erro padrão mensuradas na progênie dos indivíduos procedentes do campo. a) Sobrevivência larval aos 7 e 14 dias e no estágio de pupa. b) Biomassa larval aos 7 e 14 dias e massa corpórea no estágio de pupa. c) Tempo de desenvolvimento de neonata até pupa. Barras com asterisco indicam diferenças significativas (ANOVA) entre o milho não-Bt e o milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.



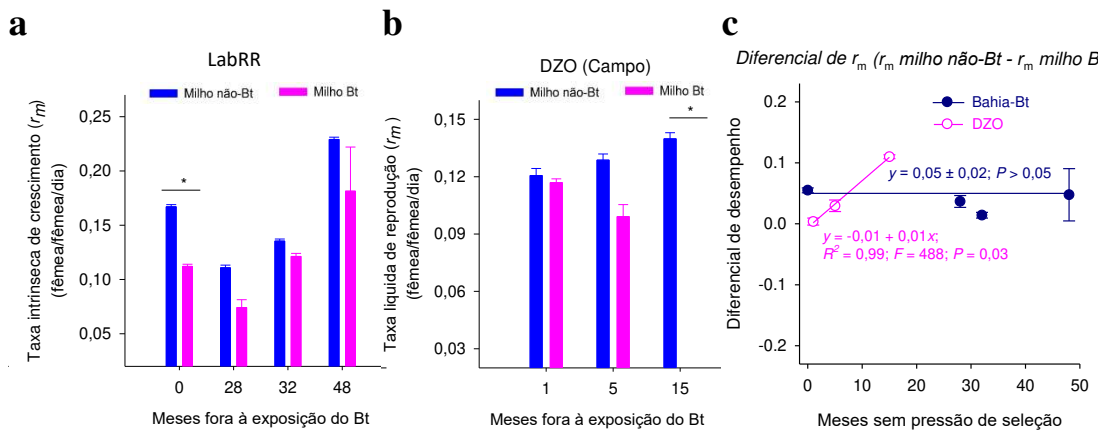
**Figura 1.2. Perda do nível de resistência de duas populações de *S. frugiperda* ao longo do tempo na ausência de pressão de seleção.** a) Sobrevivência pupal das populações de a) laboratório (LabRR) e b) de campo (DZO) ao se criar as larvas em folhagem de milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab ou em milho não-Bt. Dados são médias  $\pm$  erro padrão e barras com asterisco indicam diferenças significativas (ANOVA) entre o milho não-Bt e o milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.



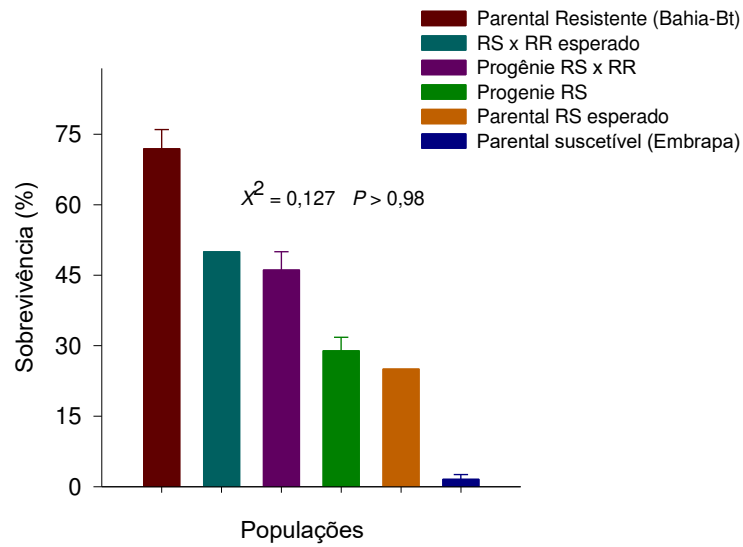
**Figura 1.3. Características do ciclo de vida de *S. frugiperda* de duas populações oriundas de laboratório e campo em milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab.** Os parâmetros mensurados ao longo das gerações foram (a, b) biomassa larval aos 7 dias, (c, d) biomassa pupal e (e, f) tempo de desenvolvimento de neonata até pupa das populações DZO e LabRR. Dados são médias  $\pm$  erro padrão e barras com asterisco indicam diferenças significativas (ANOVA) entre o milho não-Bt e o milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.



**Figura 1.4. Fertilidade dos insetos das populações de *S. frugiperda* após várias gerações sem pressão de seleção às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.** (a) População de campo e (b) de laboratório. Dados são médias  $\pm$  erro padrão mensurados ao longo do tempo (meses sem pressão de seleção com toxinas Bt). Barras com asterisco indicam diferenças significativas (ANOVA) entre o milho não-Bt e o milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.



**Figura 1.5. Desempenho demográfico de populações de *S. frugiperda* mantidas sem pressão de seleção ao longo do tempo.** Dados são médias  $\pm$  erro padrão das estimativas da taxa intrínseca de crescimento para (a) a população de laboratório e para (b) a população de campo. (b) Diferencial de desempenho dos insetos resistentes no milho Bt e não-Bt mostrando a estabilidade ou instabilidade da resistência nas populações, nas quais os valores de  $r_m$  obtidos para os insetos criados no milho não-Bt foram subtraídos daqueles obtidos do milho Bt. Dados são média e erro padrão. Barras com asterisco indicam diferenças significativas (Jackknife, teste t,  $P < 0,05$ ) entre desempenho dos insetos no milho não-Bt e o milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.



**Figura 1.6.** Teste do modelo monogênico mendeliano da herança da resistência de *S. frugiperda* às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. A análise de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) dos dados de sobrevivência compara as frequências esperadas do modelo e as observadas nas progênies do cruzamento e retrocruzamento. Colunas com barras de erro padrão representam as médias de sobrevivência obtidas na exposição ao milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.

## Capítulo II

### Desempenho demográfico de populações da lagarta-do-cartucho em milhos Bt Cry1F e Cry1A.105 + Cry2Ab: algum fator favorável ao manejo da resistência?

#### Resumo

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) é uma espécie que tem adquirido uma grande importância por sua dispersão das Américas para África e Ásia e por muitas delas terem desenvolvido resistência a cultivares que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). A adoção em larga escala de cultivares Bt para o controle *S. frugiperda* exerce uma alta pressão de seleção que pode ocasionar o desenvolvimento de resistência no campo, o que foi o tema em deste trabalho. Larvas de *S. frugiperda* de instares tardios foram coletadas em cultivos de milho expressando uma (Cry1F) ou simultaneamente duas toxinas (Cry1A.105 + Cry2Ab) para se determinar o nível de resistência dos indivíduos a estas toxinas e estudar se o perfil da resistência mudou em relação àquele descrito anteriormente em 2013 e 2016. A resposta das progêneses F<sub>1</sub> resultantes do cruzamento dos insetos das populações do campo com insetos suscetíveis de laboratório também foi determinada para estimar a dominância da resistência. Posteriormente, as populações de campo foram mantidas durante 16 meses fora da exposição à pressão de seleção com toxina Bt para testar a estabilidade da resistência, como observado nos casos anteriores. As populações de campo apresentaram resistência completa aos milhos Cry1Fa e Cry1A.105 + Cry2Ab. Somente o milho piramidado afetou negativamente os parâmetros biológicos dos insetos na fase imatura, porém sem diferenças nos valores da taxa intrínseca de crescimento populacional em relação aos insetos criados no milho não-Bt. Esse semelhante desempenho dos insetos resistentes na folhagem do milho Bt vs. não-Bt indica que a resistência ao milho de duas toxinas é completa. Na escala de 0 (completamente recessiva) a 1 (completamente dominante), o valor da dominância funcional da resistência foi 0,44 e 0,96 no milho de única toxina e completamente recessiva (0,04 e 0,05) no híbrido piramidado. O grau de resistência (diferencial de desempenho demográfico dos insetos resistentes na folhagem de milho Bt em relação ao milho não-Bt) manteve-se ao longo das gerações em que os indivíduos foram mantidos fora da exposição a Bt. Esses resultados são consistentes com o desenvolvimento de resistência ao milho piramidado no campo, a qual parece ser recessiva e estável por mais de 12 gerações na ausência de pressão de seleção. Esse perfil de resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab aqui caracterizado parece diferir daquele documentado anteriormente em *S. frugiperda*, aqui sendo a resistência completa e estável, condições desfavoráveis ao manejo da resistência.

**Palavras-chave:** Piramidação, *Spodoptera frugiperda*, dominância funcional

## Introdução

Cultivares transgênicos piramidados, como o milho expressando duas toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), entraram no mercado agrícola em 2010 como ferramenta no controle de populações de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). O conceito de piramidação refere-se à incorporação de dois ou mais genes que codificam para toxinas com dissimilares sítios de ação. Essa estratégia de ataque múltiplo tem o potencial de atrasar o desenvolvimento de resistência mais eficientemente quando comparadas às plantas de um única toxina (Carrière *et al.* 2016). Na atualidade, o milho Bt piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab é adotado contra *S. frugiperda* apesar de muitas de suas populações apresentarem resistência ao milho Cry1Fa (Storer *et al.* 2010; Farias *et al.* 2014) e haver risco de resistência cruzada entre a toxina e Cry1A.105 (Santos-Amaya *et al.* 2015). Além disso, há poucas opções de toxinas Bt efetivas contra *S. frugiperda* para uso em plantas transgênicas. Atualmente somente estão disponíveis Cry1A.105, Cry2Ab e VipAa, as duas primeiras com já com alguma perda de eficácia relatada, o que torna importante os estudos que buscam fornecer informações para o manejo de resistência a essas toxinas.

As práticas de manejo da resistência de insetos baseiam-se na estratégia de alta dose/refúgio e a piramidação (Gould 1998). Um dos fatores importantes para manter a durabilidade dos cultivares Bt piramidados é a ausência de resistência cruzada entre as toxinas, porém existe grande risco de resistência cruzada entre toxinas Bt do grupo Cry1 (Bernardi *et al.* 2015). No entanto, fatores genéticos das populações podem oferecer condições favoráveis ou não à manutenção da eficácia da tecnologia Bt. Por exemplo, herança recessiva, resistência incompleta, frequência inicial baixa de alelos de resistência e presença de custo adaptativo apresentam-se como condições favoráveis ao manejo da resistência ou mesmo à seleção contra a resistência a toxinas Bt (Gassmann *et al.* 2009; Tabashnik *et al.* 2009; Carriere *et al.* 2010). Com a presença de populações de *S. frugiperda* no campo resistentes à toxina Cry1Fa e com resistência cruzada a uma das toxinas Bt componentes do milho Bt piramidado, resta apenas resistência incompleta e a

presença de custo adaptativo como condições que poderiam favorecer a durabilidade da eficácia de controle de *S. frugiperda* por esta tecnologia Bt.

A resistência a Cry1Fa tem sido caracterizada como recessiva e estável, com ausência de custos adaptativos (Farias *et al.* 2014; Santos-Amaya *et al.* 2017a). Adicionalmente, estudos têm documentado que populações de laboratório respondem rapidamente a seleção com toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab, produzindo resistência caracterizada como incompleta, recessiva e com custos adaptativos (Santos-Amaya *et al.* 2015; Bernardi *et al.* 2017). No entanto, os fatores genéticos da resistência são dinâmicos devido à pressão de seleção no campo e podem apresentar variações em direção ao aumento da frequência de resistência ou a seu declínio. Por exemplo, os custos adaptativos associados a certos alelos de resistência podem ser mitigados se a pressão de seleção for mantida por muito tempo (Cousteau *et al.* 2000). Niu *et al.* (2016b) através de F<sub>2</sub> screen documentou a presença de diferentes alelos de resistência a Cry2Ab em populações de campo de *S. frugiperda* nos Estados Unidos. Assim, estudos sobre o status atual da resistência nas populações de campo e as características da base genética deve gerar conhecimento novo e útil à tomada de decisões no manejo da resistência, possibilitando uso racional de estratégias que promovam mais eficientemente o atraso na taxa de desenvolvimento de resistência no campo.

Além do histórico mencionado acima, tem havido algumas reclamações de perda de eficiência de controle de *S. frugiperda* pelo milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab. Isso pode estar ou não associado com resistência às toxinas Bt como mostra prévios estudos (França 2018; Santos Amaya *et al.* 2019; Souza *et al.* 2019) e para melhor entender o fenômeno, é preciso caracterizar a possível resistência em populações provenientes de lavouras com suspeita de falha de controle do inseto. Em 2013 e 2016, foram obtidas populações de *S. frugiperda* resistentes a Cry1A.105 + Cry2Ab derivadas do campo (Santos-Amaya *et al.* 2015, Cap. 1 desta tese). A resistência foi incompleta, recessiva e associada a fortes custos adaptativos (Santos-Amaya *et al.* 2019), capazes de selecionar contra a resistência (Cap.1). No entanto, com a continuada pressão de seleção, é possível que o perfil da resistência tenha mudado desde 2013. Portanto, o objetivo neste estudo foi

caracterizar o atual status da resistência em populações de campo de *S. frugiperda* em milhos Bt expressando as toxinas Cry1Fa e Cry1A.105 + Cry2Ab. Além disso, no milho Bt, avaliou-se o desempenho dos insetos supostamente heterozigotos resultantes de cruzamento em laboratório e a estabilidade da resistência ao longo de 12 ou mais gerações sem pressão de seleção.

## **Material e Métodos**

### ***Coleta e manutenção dos insetos***

Larvas de quinto instar de *S. frugiperda* foram coletadas em 2017 de lavouras de milho Bt Herculex (Cry1Fa) e VTPro (Cry1A.105 + Cry2Ab2) nos municípios de Coimbra e Cajuri, Minas Gerais, Brasil, respectivamente. Os insetos coletados foram transferidos para bandejas de PVC de 16 poços e alimentados com folhas do respectivo milho até o estágio de pupa. Os insetos de cada localidade permaneceram separados formando as populações nomeadas RHX17 e RPR17. Os adultos resultantes de cada população foram colocados em gaiolas de PVC (40 cm de altura × 30 cm de diâmetro) recobertas no interior com papel sulfite para oviposição. Placas de petri com algodão embebido em solução de açúcar e de ácido ascórbico (10%-5%) foi fornecido para sua alimentação. Os insetos foram mantidos em temperatura controlada de  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 15\%$  e fotoperíodo de 14L: 10D. Coleta de ovos foi realizada a cada dois dias e após eclosão, neonatas foram utilizadas para a montagem do experimento ou colocadas em dieta artificial para a manutenção da população em laboratório.

### ***Bioensaio com folhagem de milho Bt Cry1Fa ou Cry1A.105 + Cry2Ab***

Parâmetros biológicos dos insetos foram avaliados nas duas populações de campo e uma população suscetível de laboratório (Embrapa SS, padrão de suscetibilidade a inseticidas cedida pela Embrapa Milho e Sorgo). O experimento foi conduzido com as progênies F<sub>1</sub> de *S. frugiperda* em milho Herculex e RB9110PRO expressando respectivamente as toxinas de *B. thuringiensis* Cry1Fa e Cry1A.105

+ Cry2Ab2, foram cultivados em condições de campo seguindo os tratos culturais recomendados. O cultivar RB9110, um isohíbrido não-Bt, foi utilizado como controle. Cento e sessenta neonatas (< 24 horas de eclosão) de cada população foram transferidas para bandejas de PVC de 16 poços (Advento do Brasil, Diadema, SP) contendo secções foliares de milhos em estágio fisiológico V4-V5. A folhagem foi fornecida às larvas e trocada a cada dois dias até elas atingirem o estágio de pupa. As características da história de vida das populações mensuradas foram a taxa de sobrevivência até pupa, a biomassa das larvas aos sete dias de idade e pupas, além do tempo de desenvolvimento de neonata até pupa em cada tipo milho de milho utilizado.

### ***Parâmetros de fertilidade***

Vinte casais de cada população para cada milho de milho (Cry1Fa, Cry1A.105 + Cry2Ab2 e o isohíbrido não-Bt) foram formados de machos e fêmeas virgens provenientes do experimento anterior. Cada casal foi colocado individualmente (1♀:1♂) em gaiolas de acasalamento (10 cm de altura × 10cm de diâmetro) recobertas com papel sulfite. A coleta de ovos e a contagem de neonatas eclodidas foram realizadas diariamente até a morte dos indivíduos. Os dados coletados foram usados na confecção de tabela de vida para determinar os seguintes parâmetros: taxa líquida de reprodução (fêmea/fêmea/geração,  $R_0$ ), taxa intrínseca de crescimento (fêmea/fêmea/dia,  $r_m$ ) e tempo de geração (dias,  $T$ ).

### ***Suscetibilidade da progênie $F_1$ ao milho Bt de uma e duas toxinas Bt***

Bioensaios com folhagem foram realizados em laboratório como descrito anteriormente para avaliar a sobrevivência dos insetos das populações resistentes (RHX17 e RPR17), suscetível (Embrapa SS) e  $F_1$  provenientes dos cruzamentos recíprocos entre os parentais ( $R♀/S♂$  e  $R♂/S♀$ ). Milhos Herculex e RB9110PRO expressando respectivamente as toxinas Cry1Fa e Cry1A.105 + Cry2Ab foram utilizados para a alimentação das larvas. O isohíbrido não-Bt RB9110 foi utilizado como controle. Uma pequena seção foliar (1-2 cm) foi colocada dentro de cada

célula de uma bandeja de bioensaio de 128 células. Uma neonata foi transferida individualmente para cada célula e as células cobertas com papel adesivo para evitar o escape das larvas. A folhagem foi substituída a cada três dias. As bandejas contendo as neonatas foram mantidas a  $27 \pm 2$  °C,  $70 \pm 15\%$  u.r. e fotoperíodo de 14L: 10D. Para cada combinação de genótipo de inseto e tipo de milho foram feitas oito repetições contendo 16 neonatas ( $n = 8 \times 16 = 128$  larvas). A sobrevivência larval foi avaliada sete dias após. A dominância funcional da resistência ( $D_x$ ) foi calculada a partir da fórmula  $D_x = (X_{RS} - X_{SS}) / (X_{RR} - X_{SS})$ , aonde  $X_{RR}$ ,  $X_{SS}$  e  $X_{RS}$  correspondem aos valores de sobrevivência do genótipo resistente, suscetível e heterozigoto ( $F_1$ ), respectivamente. Quando o valor de  $D_x$  é 0 significa que a herança da resistência é recessiva e um valor de 1 indica resistência completamente dominante. Um valor intermediário de 0,5 é refere-se à resistência codominante ou aditiva (Bourguet *et al.* 2000).

#### ***Nível de resistência e performance ao longo do tempo sem pressão de seleção***

Observações prévias em nosso laboratório indicam que o nível de resistência às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab nos insetos de algumas populações tende a reduzir quando são mantidos fora da exposição às toxinas Bt, caracterizando os efeitos acumulativos do provável custo adaptativo da resistência ao longo de várias gerações. Os componentes de desempenho biótico e reprodutivo da população RHX17 e RPRO17 foram analisados em quatro ocasiões ao longo de um período de 12 meses sem exposição às toxinas Cry1Fa e Cry1A.105 + Cry2Ab. Larvas das populações suscetível e resistente foram alimentadas com folhagem de milho Bt e não-Bt (híbrido RB9110 PRO e sua isogênico RB9110, Riber KW Sementes, Patos de Minas, MG). As folhas foram obtidas de plantas em estágio V4-V9 cultivadas em condições de campo e seguindo os tratamentos culturais recomendados, com irrigação diária para garantir alimento de boa qualidade aos insetos ao longo do experimento. Neonatas de cada genótipo do inseto foram individualizadas em bandejas de PVC de 16 poços e alimentadas com fragmentos de folha sob condições controladas de laboratório. A folhagem foi trocada a cada dois dias até as larvas atingirem o estágio de pupa. A sobrevivência e peso das lagartas aos 7

dias, além do tempo de desenvolvimento, peso pupal e sobrevivência de pupa dos indivíduos das três populações foram avaliados para as devidas comparações. As pupas obtidas foram sexadas para formar de 15-20 casais virgens para cada combinação de população e tipo de milho (Bt e não-Bt). Cada casal foi colocado em uma gaiola de PVC (10 cm altura x 10 cm Ø), com alimento para as mariposas (solução aquosa de 10% açúcar e 5% ácido ascórbico em algodão hidrofílico) e avaliado diariamente durante toda a fase reprodutiva. A coleta de ovos e a contagem de neonatas eclodidas foi feita diariamente para se obter a estimativa da fertilidade das fêmeas. Com esses dados, foram estimados os parâmetros de crescimento populacional, incluindo, taxa líquida reprodutiva ( $R_0$ ), taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) e tempo médio de geração ( $T$ ).

### ***Análise estatística***

As taxas de sobrevivência foram comparadas ao longo das gerações por meio de análise de variância das estimativas obtidas para indivíduos resistentes e suscetíveis. A biomassa de larvas, de pupas e tempo de desenvolvimento foram submetidas a análise de variância de uma via com cada população de *S. frugiperda* nos milhos Bt e não-Bt. As médias foram separadas usando o teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

As estatísticas de tabela de vida, que fornecem estimativas do potencial de crescimento populacional, foram calculadas através do protocolo “life table, SAS” desenvolvido por Maia *et al.* (2000) (SAS 2011). As variâncias associadas às estimativas foram estimadas utilizando o método de Jackknife, que fornece os intervalos de confiança e teste  $t$  com seus respectivos  $P$  valores para comparações entre os grupos de indivíduos de cada população expostos aos diferentes milhos.

## **Resultados**

### ***Performance em plantas de milho Bt simples e piramidadas***

A taxa de sobrevivência larval e de neonatas até pupa foi maior que 70% em ambas as populações de *S. frugiperda* no milho Cry1F e milho não-Bt, enquanto

que este parâmetro foi duas vezes menor na população RPR17 no milho Cry1A.105 + Cry2Ab2 (Fig. 2.1a-b). A biomassa de larvas e pupas foi similar ou maior no milho Cry1Fa em relação ao milho não-Bt. Entretanto, o milho Cry1A.105 + Cry2Ab2 inibiu significativamente ( $P < 0.05$ ) o ganho de biomassa das larvas de ambas populações (Figura 2.1c) aumentando o tempo para as larvas atingirem o estágio de pupa (Fig. 2.1e).

O número de descendentes femininos (taxa líquida de reprodução,  $R_0$ ) não diferiu ( $P > 0.05$ ) entre as populações RHX17 e RPR17 nos três tipos de milho (2 Bt e 1 não-Bt) (Fig. 2.2a, d). A taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ) da população RHX17 foi maior (cerca de 4%) no milho Cry1Fa, porém não diferiu entre o milho piramidado e o não-Bt. Da mesma forma, não houve diferenças entre o valor de  $r_m$  nos três milhos na população RPRO17 (Fig. 2.2b, e). Para ambas as populações, o tempo de geração ( $T$ ) foi maior no milho Cry1A.105 + Cry2Ab2 do que Cry1Fa. Importante, todos esses parâmetros não diferiram ( $P > 0.05$ ) quando comparados ao milho não-Bt (Fig. 2.2c-f).

### ***Dominância efetiva em milho Bt simples e piramidado***

Os insetos parentais e as progênes sobreviviram mais de 80% no milho não-Bt, permitindo observar a resposta delas aos milhos Bt. Os insetos parentais suscetíveis não sobreviveram em nenhum dos milhos Bt, mostrando a sensibilidade deles às toxinas expressas nos milhos, ao contrário dos resistentes de ambas as populações, que sobreviveram de 80-90% no milho Cry1F contra 55-65% no milho piramidado (Fig. 2.3a-b). No milho Cry1F, a progênie do cruzamento  $R_{\text{♀}} \times S_{\text{♂}}$  teve a metade da sobrevivência da progênie  $S_{\text{♀}} \times R_{\text{♂}}$ , indicando efeito parental, efeito que não observado no milho piramidado. Mais importante, as progênes do cruzamento de RHX17 sobreviveram 10-50% no milho Cry1F, contra 90% de sobrevivência dos parentais resistentes (Fig.2.3a). Essa comparação para RPRO17 foi de 70% contra 80%, respectivamente para as progênes e os parentais (Fig.2.3b). No milho Bt piramidado, as progênes  $F_1$  em ambas as populações resistentes sobreviveram menos que 5%, valor que é mais

semelhante aos parentais suscetíveis (0%) do a os parentais resistentes (55 e 65%) (Fig.2.3a-b).

As taxas de sobrevivência nos milhos Bt descritas acima foram corrigidas para obter a dominância funcional da resistência ( $Dx$ ) de ambas as populações. Os resultados mostraram que a resistência ao milho Cry1Fa foi incompletamente recessiva ( $Dx = 0,44$ ) na população RHX17 e dominante ( $Dx = 0,96$ ) na população RPRO17. Por outro lado, a resistência ao milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab foi completamente recessiva em ambas as populações, com valores de dominância efetiva ( $Dx$ ) variando entre 0,04 e 0,05 (Tabela 1).

### ***Nível de resistência e histórico de vida ao longo do tempo sem pressão de seleção***

Considerando somente características individuais nos insetos, ambas as populações mostraram uma diminuição da capacidade adaptativa ao milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab após o período sem pressão de seleção (Fig. 2.4). A sobrevivência da população RHX17 diminuiu a 30% no milho Bt num período de 12 meses ( $P < 0,01$ ). Embora a população mostrou uma sobrevivência constante no milho não-Bt ( $P > 0,05$ ), indivíduos mantidos no laboratório como população base perderam a capacidade de completar o desenvolvimento impossibilitando obter novas progênies para as avaliações posteriores. A sobrevivência dos insetos na população RPRO17 variou no milho Bt a cada geração avaliada, oscilando entre níveis de 30% e 45% de sobrevivência ao longo dos 12 gerações fora da exposição ( $P > 0,05$ ). Adicionalmente, houve uma diminuição significativa da sobrevivência no milho não-Bt ( $P = 0,01$ ), até atingir na última geração o mesmo patamar que o milho Bt (Fig. 2.4d). Para ambas as populações, a biomassa larval aos 7 dias foi menor no milho Bt que no milho não-Bt ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2.4b, e) o que consequentemente atrasou o desenvolvimento dos indivíduos de neonata até a fase de pupa em todas as gerações ( $P < 0,05$ ) (Fig. 2.4c, f). Na população RHX17, a biomassa pupal dos indivíduos manteve-se menor quando criados no milho Bt que no não-Bt ( $P <$

0,05) (Fig. 2.4b), contrário ao observado na população RPRO17, aonde a biomassa pupal na maioria das gerações fora à exposição Bt não apresentou diferenças entre os dois tipos de milho ( $P > 0,05$ ) (Fig. 2.4e).

### ***Desempenho populacional ao longo das gerações***

Tanto no milho Bt quanto não-Bt, os valores dos parâmetros demográficos de ambas as populações quando os insetos permaneceram fora da exposição às toxinas Bt decaíram ao longo das gerações (Fig. 2.5). Em ambas as populações houve uma redução da produção de fêmeas por geração tanto no milho Bt quanto no milho não-Bt ( $P < 0,05$ ) (dados não mostrados). Da mesma forma, houve um decréscimo na taxa de crescimento populacional nos dois tipos de milho ( $P < 0,05$ ). Na população RHX17 ao final de doze meses os indivíduos criados no milho Bt ou não-Bt alcançaram níveis similares de reprodução, mas não houve indivíduos viáveis que produziram progênie para as avaliações posteriores. Importante, mesmo os insetos resistentes tendo reduzido o desempenho demográfico na folhagem de ambos os milhos, o diferencial de desempenho deles no milho Bt e não-Bt foi nulo, indicando que a resistência se manteve estável durante 12 a 16 meses (Fig. 2.6).

### **Discussão**

Cultivares piramidados têm sido utilizados como estratégia para prolongar a vida útil da tecnologia Bt no manejo de pragas. Embora em certos casos há mais doze anos a tecnologia tem se mantido eficaz, a seleção para resistência em populações de insetos-praga no campo é um constante desafio, principalmente em regiões de intensiva agricultura (Tabashnik & Carrière 2017). No ano 2017, a suscetibilidade de duas populações de *S. frugiperda*, RHX17 e RPRO17, provenientes de coletas em lavouras de milho Cry1Fa e Cry1A.105 + Cry2Ab, respectivamente, foi caracterizadas em milhos Bt piramidado e de uma única toxina. Como demonstrado previamente, populações de *S. frugiperda* tiveram melhoria de desempenho (por resistência) quando expostas à toxina Cry1Fa (Storer *et al.* 2010; Farias *et al.* 2014; Huang *et al.* 2014; Santos-Amaya *et al.* 2017b). Além disso, já 2015, evidências mostravam um alto risco de desenvolvimento de resistência a duas

toxinas Bt usadas conjuntamente em um mesmo cultivar (Santos-Amaya *et al.* 2015; Bernardi *et al.* 2017) embora alelos de resistência à toxina Cry2Ab pareçam ser mais raros em algumas populações de campo de *S. frugiperda* (Niu *et al.* 2016b). Os resultados deste trabalho confirmam a reduzida eficácia do milho de única toxina e mostram resistência de campo ao milho piramidado expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. Em ambas as populações, as taxas de sobrevivência e outras características dos indivíduos na fase imatura (i.e., biomassa de larvas e pupas e tempo de desenvolvimento), não foram afetadas pela alimentação larval em folhagem de milho Cry1Fa. Em contraste, a sobrevivência no milho Bt piramidado variou entre 30% e 70% até atingir o estágio de pupa, a biomassa larval foi menor e o tempo de desenvolvimento aumentou em relação ao milho não-Bt. No entanto, o desempenho demográfico nos insetos de ambas as populações não diferiu entre o milho não-Bt e os dois tipos de milho Bt. Esses resultados são pioneiros em caracterizar populações de campo de *S. frugiperda* com resistência completa às toxinas Cry1Fa e ao milho Bt piramidado que expressa Cry1A.105 + Cry2Ab, contrastando com resultados prévios em populações resistentes de laboratório (Santos-Amaya *et al.* 2015). Assim, é provável que certas reclamações de falha de controle de *S. frugiperda* pelo milho Cry1A.105 + Cry2Ab se devam de fato ao desenvolvimento de resistência.

Teoricamente, situações favoráveis ao manejo de resistência ocorrem quando a resistência é incompleta e possui herança recessiva e custos adaptativos (Carriere & Tabashnik 2001; Gassmann *et al.* 2009; Carriere *et al.* 2010). Aqui, o desempenho dos indivíduos F<sub>1</sub> (supostamente heterozigotos) nos três tipos de milho indicou que a dominância funcional da resistência ao milho Cry1Fa variou entre as populações, sendo incompletamente recessiva (RHX17) até dominante (RPRO17). Em contraste, a dominância às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab foi recessiva em ambas as populações, nesse aspecto sendo favorável ao manejo se houver indivíduos suscetíveis que acasalam com os resistentes. Casos de resistência a Bt com herança não recessiva parece não ser tão infrequentes em *S. frugiperda* (Farias *et al.* 2016; Niu *et al.* 2016a, 2018). Semelhante ao nosso resultado, há casos em que a resistência a Cry2Ab e sua piramidação com Cry1A.105 apresentou herança completamente recessiva (Santos-Amaya *et al.*

2015; Acharya *et al.* 2017; Bernardi *et al.* 2017), mas há também casos em que a resistência mostrou ser um caractere não recessivo (Niu *et al.* 2019; Zhu *et al.* 2019). Seja qualquer o tipo de dominância que predomine, os resultados deste estudo indicam a presença de alelo de resistência a Cry1F que parece ser dominante, em contraste com a resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab que parece ser codificada por alelo(s) em recessividade nas duas populações de *S. frugiperda* estudadas.

A resistência completa ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab nas populações aqui estudadas é indício de um perfil de resistência às toxinas diferente da população isolada em 2013 e 2016 (Santos-Amaya, *et al.*, 2015, Cap. 1). Frente às possíveis mudanças nas características biológicas de adaptação às toxinas Bt nas atuais populações de *S. frugiperda* (Cousteau *et al.* 2000, Liu *et al.* 2002) é pertinente questionar se a presença de custos adaptativos (Santos-Amaya *et al.* 2019) continuam ser um fator importante que potencialmente pode afetar a estabilidade da resistência (Gassmann *et al.* 2009). Ao remover a pressão de seleção (*i.e.*, consumo de folhagem do milho Bt), obteve-se respostas adaptativas semelhantes ao longo do tempo nas populações resistentes aqui estudadas. Em ambas as populações, as características que representam o desempenho da fase imatura foram inferiores nos indivíduos alimentados com folhagem Bt durante todas as gerações, mas o diferencial entre o desempenho demográfico dos insetos no milho Bt e não-Bt foi nulo, indicando que a resistência não decaiu com o tempo. Efeitos deletérios de outros fatores se manifestaram pela redução no número de fêmeas e diminuição das progênies em ambos os tipos de milho. Isso parece ter sido determinante para as populações terem baixas taxas de crescimento ao longo do tempo fora da pressão de seleção. A estabilidade da resistência a Cry1Fa em *S. frugiperda* está ligada à ausência de custos adaptativos (Vélez *et al.* 2014; Santos-Amaya *et al.* 2017a), ausência essa também observada em populações com resistência a Cry1A.105 (Niu *et al.* 2018) ou a Cry2Ab (Acharya *et al.* 2017). No entanto, previamente nas populações com resistência simultânea às duas toxinas, custos adaptativos foram evidentes (Bernardi *et al.* 2015), Santos-Amaya *et al.*, 2019).

Assim, os resultados desta pesquisa indicam que não deve haver tendência de restabelecimento da suscetibilidade pela presença de custos adaptativos associados com a resistência (Carriere & Tabashnik 2001). No entanto, as populações também diminuíram o seu desempenho reprodutivo no milho não-Bt. Sabe-se que a manutenção laboratorial de alguns lepidópteros é um grande desafio devido a depressão endogâmica populacional (FIFRA 2018). Adicionalmente, estudos de laboratório mostram que baixa diversidade genética devido a um número restrito de indivíduos na população pode levar tanto a maior mortalidade larval quanto a reduções no desempenho geral (i.e., *fitness*) dos indivíduos, podendo até levar a população à extinção (Bryant *et al.* 1999; Markert *et al.* 2010). Portanto, a queda no desempenho demográfico dos insetos tanto na presença quanto na ausência de toxina Bt pode ter sido influenciado por possíveis efeitos de manutenção das populações em laboratório e/ou depressão endogâmica dos indivíduos.

Em resumo, este estudo alerta para a ampla disseminação da resistência a Cry1Fa, sendo encontrada até mesmo em populações de região sem intensa pressão de seleção, como é o caso das populações aqui estudadas. Além disso, foi documentado o desenvolvimento de resistência em populações de campo às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. Tal resistência simultânea a duas toxinas foi completa e estável ao longo de 16 meses, condição desfavorável ao manejo da resistência em campo. No entanto, a resistência parece ser funcionalmente recessiva, o que pode possibilitar o manejo da resistência se houver indivíduos suscetíveis que acasalam com os resistentes. Essas características associadas à manutenção de áreas de refúgio, preservação do controle biológica natural e uso de outras táticas de manejo, incluindo aplicação de inseticidas sintéticos quando necessário, devem ser as ações mais prudentes para reduzir ou mitigar o aumento da frequência de alelos de resistência ao milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab no campo. Esforços adicionais de pesquisas, principalmente que busquem entender a interação de táticas de manejo visando integração racional delas, são importantes para auxiliar a manutenção da eficácia dos cultivares Bt e outras tecnologias de manejo de pragas na agricultura.

## Referências

- Acharya, B., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2017). Fitness costs and inheritance of Cry2Ab2 resistance in *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Journal of invertebrate pathology*, 149, 8-14.
- Bernardi, D., Bernardi, O., Horikoshi, R.J., Salmeron, E., Okuma, D.M., Farias, J.R. *et al.* (2017). Selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034× TC1507× NK603 maize technology. *Crop Protection*, 94, 64-68.
- Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Dourado, P.M., Carvalho, R.A. *et al.* (2015). Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. *PLoS One*, 10, e0140130.
- Bourguet, D., Genissel, A. & Raymond, M. (2000). Insecticide resistance and dominance levels. *Journal of economic entomology*, 93, 1588-1595.
- Bryant, E.H., Backus, V.L., Clark, M.E. & Reed, D.H. (1999). Experimental tests of captive breeding for endangered species. *Conservation Biology*, 13, 1487-1496.
- Carriere, Y., Crowder, D.W. & Tabashnik, B.E. (2010). Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. *Evolutionary Applications*, 3, 561-573.
- Carrière, Y., Fabrick, J.A. & Tabashnik, B.E. (2016). Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? *Trends in biotechnology*, 34, 291-302.
- Carriere, Y. & Tabashnik, B. (2001). Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268, 1475-1480.
- Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., dos Santos, A.C. *et al.* (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64, 150-158.
- Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Santos, A.C.d. & Omoto, C. (2016). Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. *Pest management science*, 72, 974-979.
- FIFRA (2018). A Set of Scientific Issues Being Considered by the Environmental Protection Agency Regarding: Resistance of Lepidopteran Pests to *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant Incorporated Protectants (PIPs) in The United States. In: *FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting Minutes and Final Report*.

- França, J.C.O. (2018). Desempenho de populações de campo de *Spodoptera frugiperda* em milhos Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa. . In: *Entomologia*. Universidade Federal de viçosa, p. 20.
- Gassmann, A.J., Carriere, Y. & Tabashnik, B.E. (2009). Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 54, 147-163.
- Gould, F. (1998). Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43, 701-726.
- Huang, F., Qureshi, J.A., Meagher Jr, R.L., Reisig, D.D., Head, G.P., Andow, D.A. *et al.* (2014). Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *PloS one*, 9, e112958.
- Maia, A.H.N., Luiz, A.J.B. & Campanhola, C. (2000). Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: Computational aspects. *Journal of Economic Entomology*, 93, 511-518.
- Markert, J.A., Champlin, D.M., Gutjahr-Gobell, R., Grear, J.S., Kuhn, A., McGreevy, T.J. *et al.* (2010). Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC evolutionary biology*, 10, 205.
- Niu, Y., Guo, J., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2019). Phenotypic performance of nine genotypes of Cry1A. 105/Cry2Ab2 dual-gene resistant fall armyworm on non-Bt and MON 89034 maize. *Pest management science*.
- Niu, Y., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2016a). Performance of Cry1A. 105-selected fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic maize plants containing single or pyramided Bt genes. *Crop Protection*, 88, 79-87.
- Niu, Y., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2018). Inheritance and fitness costs of Cry1A. 105 resistance in two strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Crop protection*, 110, 229-235.
- Niu, Y., Qureshi, J.A., Ni, X., Head, G.P., Price, P.A., Meagher Jr, R.L. *et al.* (2016b). F2 screen for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab2-maize in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) from the southern United States. *Journal of invertebrate pathology*, 138, 66-72.
- Santos-Amaya, O.F., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Tavares, C.S., Campos, S.O., Guedes, R.N.C. *et al.* (2015). Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5.
- Santos-Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Campos, S.O., Guedes, R.N.C., Alves, A.P. *et al.* (2017a). Fitness costs and stability of Cry1Fa

resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 73, 35-43.

Santos-Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Rodrigues-Silva, N., Guedes, R.N.C. *et al.* (2017b). Magnitude and allele frequency of cry1F resistance in field populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 110, 1770-1778.

Santos Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Santana, I.V., Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C. *et al.* (2019). Strong fitness costs of insect resistance to dual-gene Bt corn are magnified on less-suitable host-crop cultivars. *Em processo de submissão*.

SAS, I. (2011). STAT 9.3 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Souza, C., Silveira, L., Pitta, R., Waquil, J., Pereira, E. & Mendes, S. (2019). Response of field populations and Cry-resistant strains of fall armyworm to Bt maize hybrids and Bt-based bioinsecticides. *Crop Protection*, 120, 1-6.

Storer, N.P., Babcock, J.M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G.D., Bing, J.W. *et al.* (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103, 1031-1038.

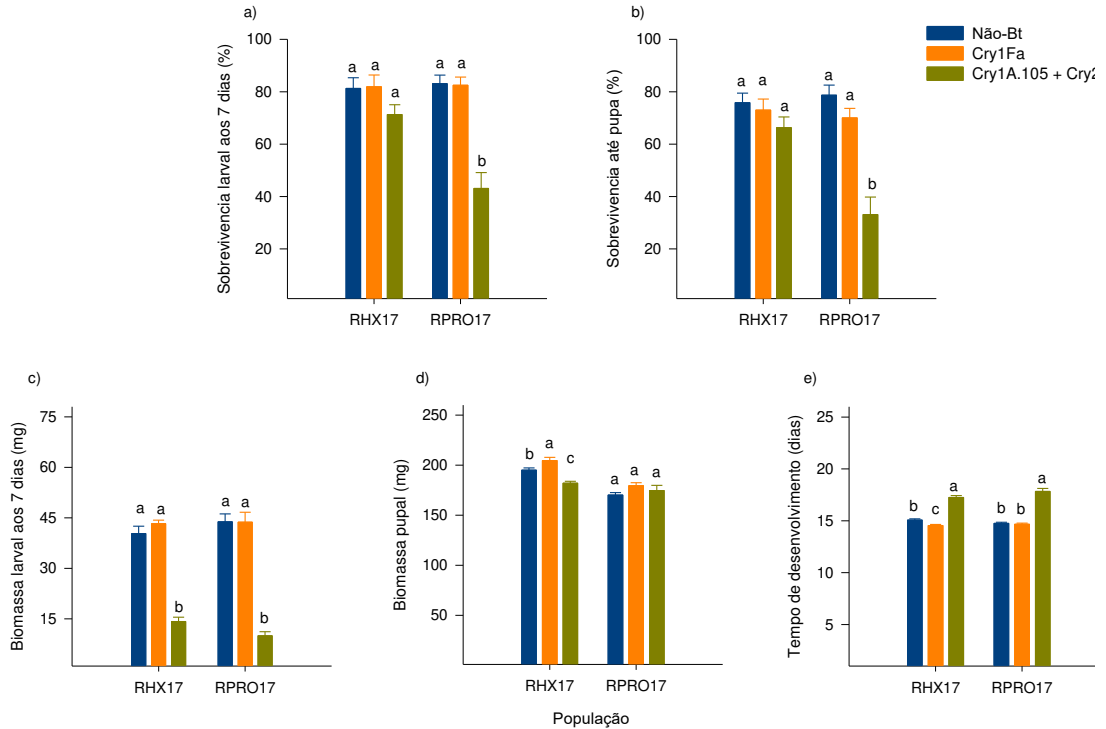
Tabashnik, B.E. & Carrière, Y. (2017). Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nature Biotechnology*, 35, 926.

Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J. & Carrière, Y. (2009). Field-evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology*, 102, 2011-2025.

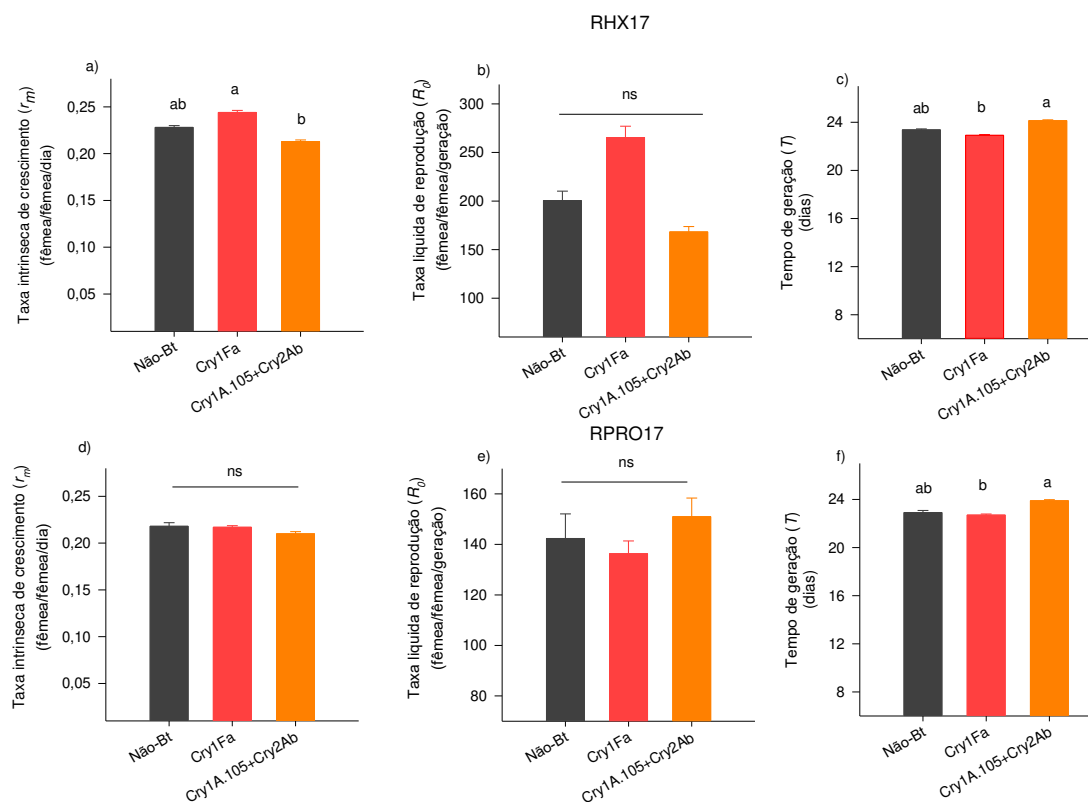
Vélez, A., Spencer, T., Alves, A., Crespo, A. & Siegfried, B. (2014). Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Applied Entomology*, 138, 315-325.

Zhu, C., Niu, Y., Zhou, Y., Guo, J., Head, G.P., Price, P.A. *et al.* (2019). Survival and effective dominance level of a Cry1A.105/Cry2Ab2-dual gene resistant population of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) on common pyramided Bt corn traits. *Crop Protection*, 115, 84-91.

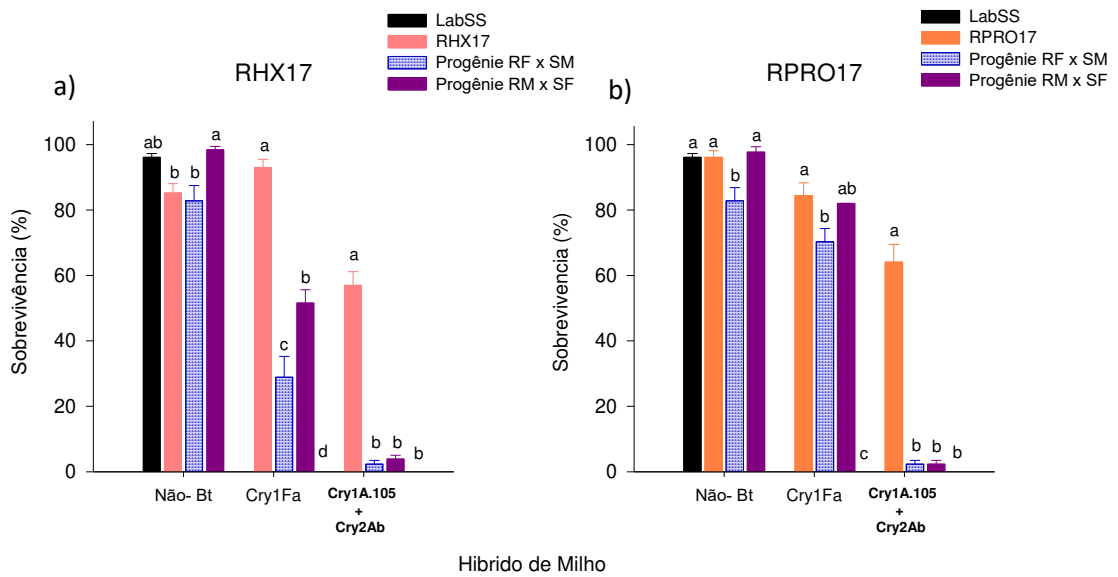
## Figuras e Tabela - Capítulo 2



**Figura 2.1. Características da história de vida de duas populações de campo de *S. frugiperda* criadas em folhagem de milhos Bt e não-Bt. a-b) Sobrevivência dos indivíduos aos sete dias e até o estágio de pupa. c) Biomassa de larvas aos sete dias. d) Biomassa dos indivíduos que atingiram o estágio de pupa. e) Tempo de desenvolvimento de neonata até a fase de pupa. Colunas (médias  $\pm$  erro padrão) com mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ) entre os tipos de milho.**



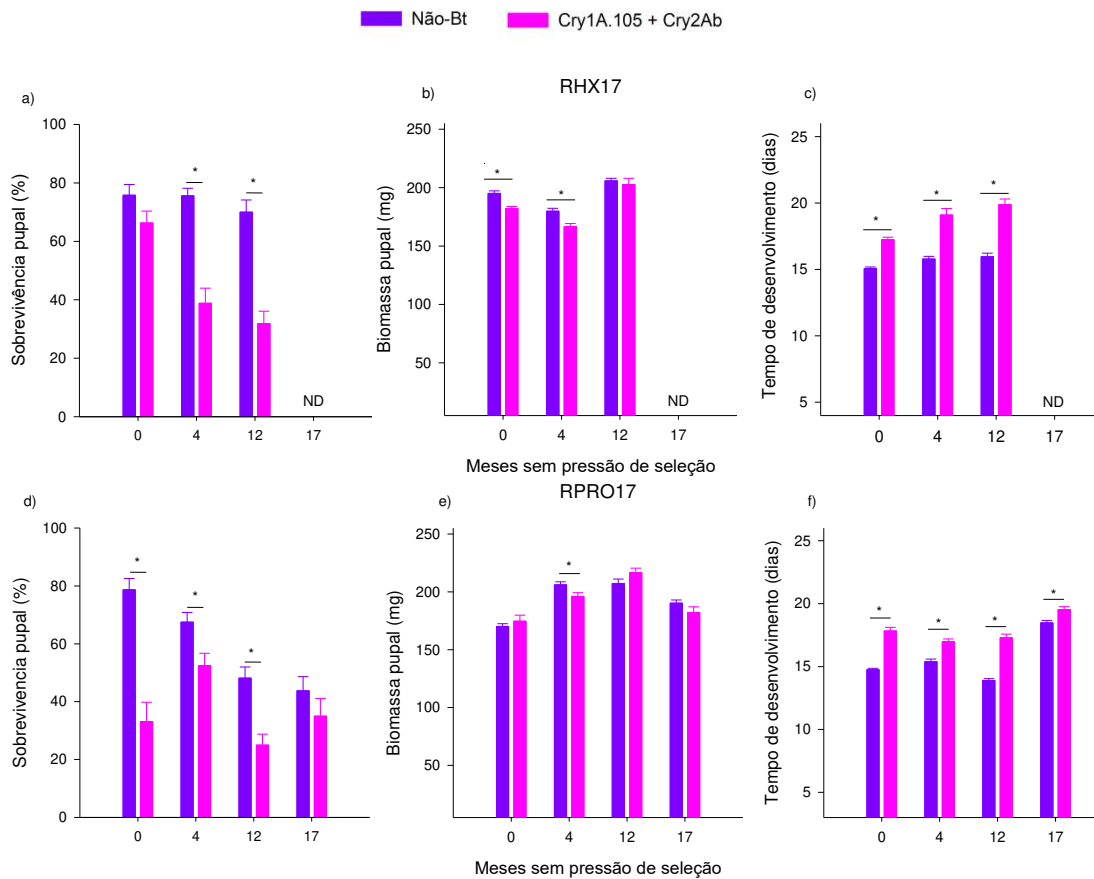
**Figura 2.2. Resistência completa de duas populações de *S. frugiperda* a plantas de milho Bt Cry1F e Cry1A.105 + Cry2Ab.** Mostradas são as estimativas dos parâmetros de tabela de vida de fertilidade obtidos: a e b) Taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ); c e d) Taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ); e e f) Tempo de geração ( $T$ ). Para cada parâmetro, médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste  $t$  por comparações de grupos pareados ( $\alpha = 0.05$ ). ns = não significativo.



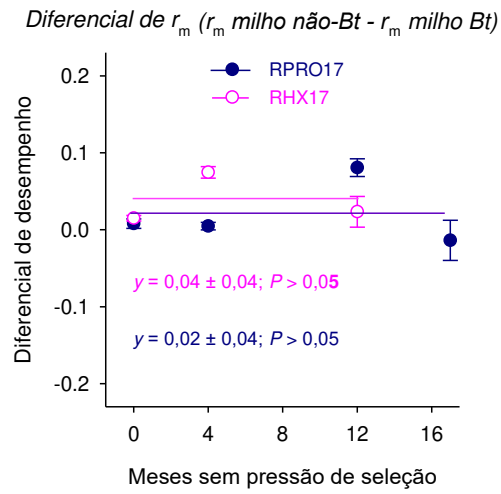
**Figura 2.3. Sobrevivência larval de insetos parentais e suas progênes de cruzamentos recíprocos nas duas populações de campo de *S. frugiperda* quando alimentados folhagem de milhos Bt simples e piramidado.** Dados são médias  $\pm$  erro padrão da sobrevivência larval aos 7 dias em milho não-Bt e Bt expressando as toxinas Cry1Fa e Cry1A.105 + Cry2Ab. As taxas de sobrevivência foram mensuradas para indivíduos suscetíveis (LabSS), heterozigotos (F<sub>1</sub>) e resistentes das populações (a) RHX17 e (b) RPRO17. Barras com diferente letra indicam diferenças significativas (ANOVA, test de Tukey,  $P < 0,05$ ) entre as linhagens dentro do milho não-Bt ou Bt.

**Tabela 1.** Dominância efetiva da resistência a Cry1Fa e Cry1A.105 + Cry2Ab em duas populações de campo de *S. frugiperda*. A variável resposta foi a sobrevivência aos sete dias de exposição às toxinas expressa nos milhos Bt.

Milho Bt	População ou Cruzamento	Porcentagem de Sobrevivência	Dominância efetiva
Cry1Fa	LabSS	0,00	
	F <sub>1</sub> (RHX17 x LabSS)	43,64	0,44
	F <sub>1</sub> (RPRO17 x LabSS)	84,45	0,96
	RHX17	100,00	
	RPRO17	87,80	
Cry1A.105 + Cry2Ab	LabSS	0,00	
	F <sub>1</sub> (RHX17 x LabSS)	3,40	0,05
	F <sub>1</sub> (RPRO17 x LabSS)	2,62	0,04
	RHX17	66,97	
	RPRO17	66,67	



**Figura 2.4. Taxa de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de imaturos de duas populações de campo de *S. frugiperda* ao longo do tempo sem exposição ao Bt.** As características mensuradas foram (a, d) Sobrevivência pupal, (b, e) biomassa pupal e (c, f) tempo de desenvolvimento de neonata até pupa das populações RHX17 e RPRO17. Dados são médias  $\pm$  erro padrão e barras com asterisco indicam diferenças significativas (ANOVA) entre o milho não-Bt e o milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab.



**Figura. 5. Diferencial de desempenho dos insetos resistentes no milho Bt e não-Bt mostrando a estabilidade da resistência nas populações.** Os valores de  $r_m$  obtidos para os insetos criados no milho não-Bt foram subtraídos daqueles obtidos do milho Bt. Dados médias e erros padrão.

## Capítulo III

### Custo adaptativo e mitigação da resistência a duas toxinas Bt em populações da lagarta-do-cartucho

#### Resumo

Aliada ao ataque múltiplo pela piramidação de toxinas Bt, a estratégia de refúgio é recomendada para diminuir a velocidade de desenvolvimento de resistência no campo, sendo que a presença de plantas não-Bt ou a qualidade de plantas hospedeiras alternativas no refúgio podem amplificar uma possível desvantagem adaptativa nos insetos carreadores de alelos de resistência. No presente trabalho, quatro populações de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), duas resistentes ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab (i.e., uma isolada do campo em 2017 e outra de laboratório, mantida desde 2013) e duas que são padrão de suscetibilidade às toxinas foram usadas para determinar a existência de custos associados à resistência. Utilizando milho e algodão não-Bt como fonte alimentar, comparou-se entre as populações a taxa de sobrevivência, a biomassa de pupas, tempo de desenvolvimento e o efeito combinado desses fatores calculando-se um índice de desempenho geral. A sobrevivência larval, pupal, biomassa e tempo de desenvolvimento dos insetos foi menor só para a população de laboratório LabRR, tanto no milho quanto nas estruturas de algodão. Consequentemente isso refletiu em que o índice de adaptação fosse menor quando comparado às demais populações. Os resultados indicaram que a resistência de campo ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab não está associada a custos adaptativos no milho não-Bt e a variação alimentar provida pela qualidade nutricional do algodão não afetou negativamente o desempenho da população resistente. Esse cenário potencialmente é desfavorável ao manejo de resistência de *S. frugiperda* ao milho e algodão Bt contendo Cry1A.105 e/ou Cry2Ab, cenário esse que deve ser considerado no uso racional de estratégias de manejo da resistência.

**Palavras-chave:** *Spodoptera frugiperda*, Cry1A.105/Cry2Ab, população de campo, manejo da resistência

## Introdução

O uso de cultivares transgênicos produzindo toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm sido uma tática usada com sucesso no controle de pragas-alvo, porém sua eficácia tem sido reduzida pela aparição de resistência a toxinas Bt em algumas populações das pragas. As práticas para o manejo de resistência de insetos a plantas Bt baseiam-se no uso da estratégia de alta dose/refúgio e eventos piramidados (Tabashnik *et al.* 2013). A alta dose/refúgio consiste em promover o acasalamento de insetos sobreviventes (resistentes) das lavouras Bt com indivíduos suscetíveis provenientes do refúgio (planta não-Bt), produzindo descendentes híbridos que irão morrer se a dose for alta o suficiente para que a resistência seja recessiva, atrasando a evolução da resistência (Tabashnik *et al.* 2009). Adicionalmente, fatores que podem interagir favorecendo o sucesso do refúgio são: menores frequências iniciais do alelo de resistência, resistência incompleta e custos adaptativos (Tabashnik *et al.* 2013). Custos adaptativos são o resultado dos efeitos negativos pleiotrópicos do alelo de resistência, e juntamente com o grau de dominância dos custos, tem o potencial de selecionar contra qualquer um dos genótipos que carregam o alelo de resistência (Gassmann *et al.* 2009).

Custos adaptativos associados com a resistência a Bt podem ser importantes na ausência de pressão de seleção (e.g., refúgio). Normalmente a instabilidade da resistência é tomada como evidência do custo adaptativo, o qual também é notável quando o desempenho dos indivíduos resistentes é menor se comparado com indivíduos susceptíveis. Quando custos são recessivos, eles afetam unicamente indivíduos homozigotos resistentes e quando dominantes comprometem ambos os genótipos carregando o alelo de resistência (Carriere *et al.* 2010). Apesar dos esforços feitos na elaboração de estratégias que são recomendadas para aumentar a vida útil da tecnologia Bt no controle de pragas, evolução de resistência a campo a proteínas Cry tem sido evidenciada em algumas populações de insetos (Storer *et al.* 2010; Farias *et al.* 2014; Omoto *et al.* 2016). Em alguns desses casos de resistência há ausência de custos adaptativos (Jakka *et al.* 2014; Santos-Amaya *et al.* 2017). No caso da resistência a Cry1F, o mecanismo de resistência em

populações de *S. frugiperda* parece associado à diminuição na produção de proteínas de fosfatase alcalina (ALP), receptor de ligação na interação com a toxina e que paralelamente contribui em funções destoxificativas. Assim, esperava-se que essa diminuição associada com a resistência afetasse processos fisiológicos no inseto, porém esse parece não ser o caso, pois a redução na concentração da proteína de membrana não alterou a sobrevivência e desenvolvimento dos insetos resistentes (Jurat-Fuentes *et al.* 2011).

Custos adaptativos interagindo com o ambiente podem ser magnificados por variações nas condições ecológicas nas quais estão expostas às populações resistentes, incluindo plantas hospedeiras (Saeed *et al.* 2010) e poderiam ser utilizados como parte de uma estratégia para retardar a evolução de resistência ou revertê-la (Janmaat & Myers 2003; Bird & Akhurst 2007). Além da preferência hospedeira de *S. frugiperda* pelo milho, suas larvas tem a capacidade de infestar campos de algodão (Martinelli *et al.* 2007). No algodão, o comportamento alimentar pode variar de acordo com o estágio larval do inseto, sendo que neonatas (larvas com < 24 h de eclosão) começam se alimentar da superfície da folha e posteriormente se movimentam para botões e flores. Em ínstares larvais mais desenvolvidos, os insetos conseguem se alimentar das cápsulas reprodutivas antes de empuparem (Barros *et al.* 2010). Para magnificar custos adaptativos da resistência em certos insetos-praga, o algodoeiro pode ser uma planta hospedeira promissora pela presença de gossipol, aleloquímico que é constitutivamente produzido pela planta e pode ser induzido em resposta à herbivoria (Bird & Akhurst 2007; Williams *et al.* 2011).

A resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab em populações brasileiras de *S. frugiperda* inicialmente parecia associada a fortes custos adaptativos (Santos-Amaya *et al.* 2019), capazes de auxiliar na manutenção da eficácia de cultivares de milho expressando tais toxinas Bt. No entanto, essa condição favorável ao manejo pode mudar se houver seleção de alelos de resistência menos custosos ao organismo ou que estejam acompanhados de genes mitigadores do custo adaptativo (Cousteau *et al.* 2000). Até 2015/2016, haviam populações de *S. frugiperda* que ainda apresentavam forte custo adaptativo, levando à instabilidade da resistência (Cap.

1). Mais recentemente, novas populações resistentes foram isoladas (Cap. 2) e o questionamento é se a atual resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab ainda continua associada a fortes custos adaptativos como na população de 2013. Além disto, processo semelhante de ajuste na arquitetura genética de uma população resistente (Cousteau et al. 2000) pode ocorrer em laboratório e o questionamento é se o cenário anterior (de forte custo adaptativo) ainda está presente na população de *S. frugiperda* mantida em laboratório há cerca de seis anos.

Baseando-se nesses conhecimentos, o objetivo neste trabalho foi testar a presença de custo adaptativo em duas populações resistentes a Cry1A.105 + Cry2Ab, uma recentemente isolada do campo e outra mantida em laboratório por cerca de seis anos sob intermitente pressão de seleção. Para isso, foram selecionadas duas culturas hospedeiras de *S. frugiperda* em que órgãos vegetais de variedades não-Bt foram usados para verificar a presença e/ou magnificação de custos adaptativos associados à resistência. Não se detectou custo adaptativo na população resistente coletada em 2017, o qual somente foi observado nos indivíduos da população resistente isolada do campo em 2013, porém em magnitude menor que anteriormente. Esses resultados foram consistentes com a estabilidade da resistência observada no Cap. 2 desta tese e devem ser considerados no manejo da resistência, o qual pode não mais contar com a desvantagem adaptativa dos insetos resistentes a Cry1A.105 + Cry2Ab em populações de *S. frugiperda*.

## **Materiais e Métodos**

### ***Populações do inseto***

O experimento foi conduzido usando quatro populações de *S. frugiperda*, duas resistente a Cry1A.105 + Cry2Ab e duas suscetíveis a toxinas Bt. A população resistente RPRO17 foi coletada em campo em 2017 e caracterizada previamente possuindo baixa suscetibilidade ao milho piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab, enquanto a população LabRR foi coletada no campo em 2013 e posteriormente selecionada em laboratório com o milho Bt por 11 gerações (Santos-Amaya et al. 2015). As populações LabSS e Lab Iso-RR, isogênica da população resistente de laboratório e mantidas sem exposição a inseticidas por 20 anos, foram usadas

como padrões de suscetibilidade. Larvas das populações foram mantidas em dieta artificial (Kasten Jr *et al.* 1978) e/ou a cada cinco gerações, indivíduos das populações resistente são criadas em folhas do milho Bt que expressa Cry1A.105 + Cry2Ab para eliminar eventuais indivíduos suscetíveis da população, visando manutenção do seu nível de resistência. As mariposas foram mantidas em gaiolas de PVC (40 cm de altura x 30 cm de diâmetro) recobertas internamente com papel sulfite para oviposição e alimentadas com solução aquosa de 10% açúcar e 5% de ácido ascórbico. Os ovos foram coletados a cada dois dias e armazenados em sacolas plásticas até a eclosão. A criação é mantida em ambiente controlado ( $27 \pm 2$  °C, UR  $70 \pm 15$  % e fotoperíodo 14L: 10E).

### ***Escolha e cultivo das plantas hospedeiras***

Foram utilizados dois tipos de hospedeiros de contrastante qualidade para as larvas da lagarta do cartucho: milho (*Zea mays*) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.). As variedades plantadas, ambas não-Bt, foram R9080 Riber KW Sementes e DeltaOpal, respectivamente. Duas parcelas de algodão foram semeadas escalonadamente visando ter folhagem, botão floral, flor e maçã ao longo do experimento. A folhagem de milho para alimentação dos indivíduos foi coletada em estágio de crescimento V3-V7. As espécies vegetais foram cultivadas a campo, seguindo os tratos culturais padrões para fertilização e irrigação sem aplicação de pesticidas.

### ***Desenho experimental***

O experimento foi esquematizado considerando o milho e o algodão como tratamentos principais para comparar o desempenho entre as populações. Devido ao pouco conhecimento sobre os comportamentos alimentares da *S. frugiperda* no algodoeiro, três estruturas vegetativas da planta foram analisadas: folha, botão floral e flor. Pré-testes anteriores realizados no nosso laboratório mostraram que neonatas não sobrevivem à alimentação com frutos de algodão (maçã), portanto esse tratamento foi desconsiderado no começo do experimento. Assim, 160 neonatas de cada população foram alimentadas com as diferentes estruturas do algodão por cinco dias e depois as larvas foram individualizadas em copos de

poliestireno de 250 ml e alimentadas com maça de algodão até a empupação. Da mesma forma, 160 neonatas de cada população foram expostas e acompanhadas no milho não-Bt até atingirem o estágio de pupa. Tanto as estruturas do algodão quando a folhagem de milho foi adicionada ou trocada a cada dois dias.

### ***Estimativa do custo adaptativo da resistência em órgãos vegetativos de milho e algodão***

A taxa de sobrevivência larval foi documentada após cinco dias de alimentação com os órgãos vegetais mencionados acima. Indivíduos sobreviventes nas estruturas vegetativas do algodão foram individualizados e alimentados até pupa com frutos do algodão. A taxa de sobrevivência em todos os tratamentos continuou sendo registrada até atingir o estágio de pupa. A biomassa de cada pupa e o tempo de desenvolvimento de neonatas até pupa também foram estimados.

Para determinar se a cultura hospedeira influencia ou magnifica a presença de custos associados à resistência simultânea a duas toxinas, os dados das taxas de sobrevivência de pupa, a biomassa pupal e o tempo de desenvolvimento de neonatas até pupa dos indivíduos de cada população, mensurados no experimento anterior foram as variáveis usadas para calcular o índice de cada população em cada hospedeiro. Este índice tem sido utilizado para determinar o desempenho de indivíduos assumindo que existe uma correlação positiva entre a biomassa das pupas e a fecundidade (Leuck & Perkins 1972). O cálculo do índice foi feito utilizando a fórmula: *índice de desempenho (ID) = sobrevivência pupal × peso de pupa ÷ tempo de desenvolvimento* (Jallow & Zalucki 2003).

### ***Análise estatística***

Os parâmetros de sobrevivência, biomassa pupal e tempo de desenvolvimento das populações suscetíveis e resistentes da lagarta do cartucho foram submetidas a análise de variância de uma via dentro de cada hospedeiro. Quando pertinente, as médias foram separada pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma, análise de variância foi utilizada para comparar os índices de desempenho estimados para cada população em cada hospedeiro e as médias foram separadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## Resultados

Em órgãos vegetais de algodão, a suscetibilidade dos insetos nos primeiros instares foi avaliada em diversas estruturas vegetais da planta (Fig. 3.1). Custo adaptativo na sobrevivência larval não foi detectado nas populações resistentes quando alimentadas com milho não-Bt ( $F = 1,11$ ;  $gl = 3,60$   $P = 0,35$ ) (Fig.3.1a). Em contraste, a alimentação por cinco dias em folha e botão floral de algodão reduziu a taxa de sobrevivência das larvas das populações resistentes às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab em relação às populações suscetíveis ( $P < 0,05$ ) (Fig. 3.1b, c). Na flor de algodão, a mortalidade larval foi variável e não se observou diferença nas taxas de sobrevivência dos insetos (Fig. 3.1d).

Nas características da história de vida ao longo da fase imatura dos indivíduos das populações resistentes não se observou diferenças indicativas de custo adaptativo na sobrevivência até pupa e nem na biomassa delas, variável que aliás foi superior para insetos da população RPRO17 em folhagem de milho (Fig. 3.2 a, b). Um atraso de 3 dias no tempo de desenvolvimento dos indivíduos da população resistente RPRO17 foi observado e um adiantamento de 3 dias no desenvolvimento dos insetos LabRR (Fig. 3.2c).

Diferente ao observado na folhagem de milho, a alimentação em maçãs do algodoeiro teve um maior efeito deletério sobre o desenvolvimento dos indivíduos resistentes. Só duas larvas da população resistente LabRR conseguiram chegar ao estágio de pupa (Fig. 2d) mostrando o efeito da baixa qualidade alimentar de frutos de algodão sobre custos adaptativos da resistência. Interessantemente, a taxa de sobrevivência e o tamanho pupal da população resistente de campo (RPRO17) não diferiram dos valores obtidos nos indivíduos suscetíveis ( $P > 0,05$ ) (Fig.3.2a-b). Não se observou diferenças no tempo de desenvolvimento dos insetos alimentados com maçã de algodão ( $P > 0,05$ ) (Fig.3.2f).

A sobrevivência, a biomassa pupal e o tempo de desenvolvimento larval foram combinados em um índice para mensurar o desempenho dos indivíduos resistentes e suscetíveis (Fig.3.3). Os insetos de todas as populações mostraram o mesmo desempenho na folhagem de milho ( $P > 0,05$ ). Em contraste, no algodoeiro

detectou-se maior custo adaptativo nos insetos da população LabRR, determinado pela mínima sobrevivência dos indivíduos ( $P < 0,05$ ). O desempenho larval dos insetos da população RPRO17 e das populações suscetíveis não diferiram quando alimentados com frutos de algodão ( $P > 0,05$ ) (Fig.3.3).

## Discussão

Neste trabalho, documentou-se o relativo desempenho larval de indivíduos de *S. frugiperda* resistentes às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab na ausência das toxinas Bt e sob influência de uma planta hospedeira de pior qualidade aos insetos. Adaptações a novos ambientes como no caso da resistência a plantas Bt, podem resultar em custos adaptativos nos indivíduos quando na ausência de exposição às toxinas que foram os agentes de seleção (Coustau et al. 2000). Adicionalmente, considera-se que os custos adaptativos podem ser magnificados pela variação de fatores ecológicos como a qualidade da planta hospedeira (Gassmann et al. 2009).

Evidenciou-se aqui que a alimentação em folhagem de milho não-Bt não teve nenhum efeito sobre a sobrevivência das larvas resistentes até terceiro instar (cinco dias). No entanto, as taxas de sobrevivência dos indivíduos resistentes foram entre 30% e 50% menores em folhagem e botão floral do algodoeiro quando comparadas às populações suscetíveis. Esses resultados mostram que o custo da resistência a duas toxinas nas populações estudadas manifestou-se no desenvolvimento inicial das larvas alimentadas com certos órgãos vegetais de algodão, porém não se detectou tal custo quando as larvas alimentaram em folhagem de milho não-Bt.

Em milho, os insetos da população resistente de laboratório LabRR não mostraram custo adaptativo (i.e., desvantagem em relação aos insetos suscetíveis), porém clara desvantagem foi observada quando os indivíduos alimentaram-se em algumas estruturas da planta de algodão. A sobrevivência e a biomassa pupal, e conseqüentemente o índice de desempenho larval dos insetos LabRR foram cerca de 3 a 4 vezes inferiores aos valores para os insetos suscetíveis. Em contrapartida, na população resistente de campo RPRO17 não foi evidenciado custo adaptativo

na sobrevivência até pupa, na biomassa dos insetos e nem no tempo de desenvolvimento em nenhuma das plantas hospedeiras estudadas. Em consequência, o índice de desempenho dos insetos RPRO17 não diferiu dos valores dos índices obtidos para os insetos das populações suscetíveis em ambos os hospedeiros. Essas observações são consistentes com estudos prévios nos quais houve ausência de custo adaptativo na resistência de *S. frugiperda* a Cry1A.105 (Niu *et al.* 2016) e a Cry2Ab (Acharya *et al.* 2017) e apenas ligeiro custo nas populações resistentes aos milhos expressando as duas toxinas simultaneamente (Bernardi *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2019).

Teoricamente, custos ao organismo podem ser modulados e magnificados por variações nas condições ecológicas e ambientais nas quais estão expostas as populações resistentes, incluindo plantas hospedeiras (Janmaat & Myers 2005; Saeed *et al.* 2010). No entanto, aqui documentou-se que populações resistentes com diferentes histórico de seleção podem ter diferentes respostas, manifestando ou não custos adaptativos sob baixa qualidade hospedeira. Isso provavelmente se deve ao histórico das populações de *S. frugiperda* ou até mesmo por diferenças na base genética da resistência. Mutações em alelos que codificam proteínas transportadoras ABC, fosfatase alcalina e caderinas que agem como receptores no intestino do inseto geralmente estão associada à resistência a toxinas de Bt (Gahan *et al.* 2010; Jurat-Fuentes *et al.* 2011; Jakka *et al.* 2016; Banerjee *et al.* 2017). Algumas destas mutações podem interferir na integridade estrutural e funcional do intestino dos insetos, influenciando assim, custos adaptativos pelo incremento de absorção e acúmulo aleloquímicos defensivos das plantas, como o gossipol no caso do algodão (Williams *et al.* 2011). Assim, esperava-se que o mecanismo associado à resistência à dual ação das toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab aumentassem os custos da resistência (Carriere *et al.* 2010), no entanto nossos resultados contrastaram com essas predições. Da mesma forma, a resistência de *S. frugiperda* à toxina Vip3Aa não foi associada a custos adaptativos e as características biológicas dos indivíduos não foram afetadas negativamente pela variação da qualidade hospedeira (Chen *et al.* 2019).

Em relação ao histórico de seleção das populações LabRR e RPRO17, a primeira foi obtida em 2013 embora tenha passado por vários episódios de seleção em laboratório desde a sua primeira caracterização (Santos-Amaya et al. 2015). Essa população apresentava forte custo adaptativo associado à resistência ao milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab(Santos-Amaya et al. 2019), o qual frequentemente demandava seleção com o milho Bt para manter o nível de resistência. Provavelmente, tal processo selecionou alelo(s) de resistência menos deletério(s) ao organismo, como também deve ser o caso de outros genes mitigadores do custo da resistência (Cousteau et al. 2000). Processo semelhante deve ter ocorrido no campo desde do início de uso do milho Bt Cry1A.105 + Cry2Abem 2010, de forma que algumas das atuais populações de *S. frugiperda* resistentes a essas toxinas (e.g., RPRO17) parecem possuir alelos de resistência com menos efeitos pleiotrópicos e/ou genes mitigadores desses. Importante, os estudos realizados no Capítulo 2 desta tese mostram que a resistência na população RPRO17 é estável por um período 16-17 meses. Tais resultados são consistentes com a ausência de forte custo adaptativo associado à resistência aqui evidenciado. Portanto, a estabilidade da completa resistência ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab(Cap. 2) e a ausência de custo adaptativo aqui demonstrado são fortes indícios de que a condição favorável ao manejo da resistência não mais existe.

Para finalizar, cultivares Bt piramidados eram esperados serem mais efetivos no atraso de desenvolvimento da resistência a toxinas Bt, resistência que inicialmente parecia ser incompleta e custosa aos insetos. No entanto, essas condições podem atualmente não mais auxiliar na seleção contra a resistência (Gassmann *et al.* 2009; Carrière *et al.* 2015). O presente estudo evidenciou a mitigação do forte custo adaptativo previamente documentado em larvas de *S. frugiperda* resistentes a Cry1A.105 + Cry2Ab, coletadas em 2013, e a ausência desse custo nos insetos resistentes coletados do campo em 2017. Essa é uma condição desfavorável à durabilidade de eficácia do milho Bt piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab. Além disso, a existência de alelos que aparentemente conferem resistência completa a esse milho Bt em populações de campo da lagarta do cartucho indicam a necessidade de uso racional de estratégias e táticas de manejo da resistência para evitar perda total da eficácia das toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. Essas, juntamente

com a toxina Vip3A, são as únicas disponíveis em milhos Bt para manejo *S. frugiperda*, uma importante espécie invasora em muitas regiões do mundo.

## Referências

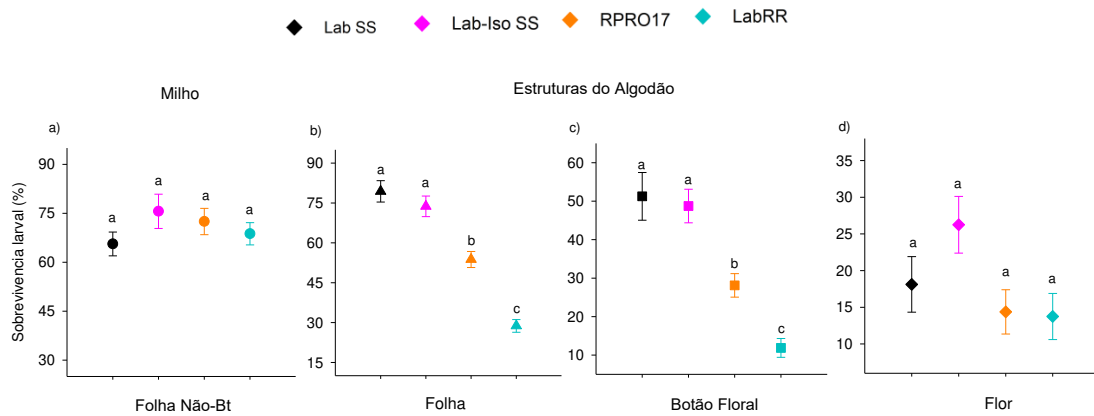
- Acharya, B., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2017). Fitness costs and inheritance of Cry2Ab2 resistance in *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Journal of invertebrate pathology*, 149, 8-14.
- Banerjee, R., Hasler, J., Meagher, R., Nagoshi, R., Hietala, L., Huang, F. *et al.* (2017). Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Scientific Reports*, 7.
- Barros, E.M., Torres, J.B., Ruberson, J.R. & Oliveira, M.D. (2010). Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 137, 237-245.
- Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Dourado, P.M., Carvalho, R.A. *et al.* (2015). Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. *PLoS One*, 10, e0140130.
- Bird, L.J. & Akhurst, R.J. (2007). Effects of host plant species on fitness costs of Bt resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Biological Control*, 40, 196-203.
- Carrière, Y., Crickmore, N. & Tabashnik, B.E. (2015). Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature biotechnology*, 33, 161.
- Carriere, Y., Crowder, D.W. & Tabashnik, B.E. (2010). Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. *Evolutionary Applications*, 3, 561-573.
- Chen, X., Head, G.P., Price, P., Kerns, D.L., Rice, M.E., Huang, F. *et al.* (2019). Fitness costs of Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* on different hosts. *Pest management science*, 75, 1074-1080.
- Coustau, C. Chevillon, C. & french-Constant, R. (2000). Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 378-383.
- Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., dos Santos, A.C. *et al.* (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera*

- frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64, 150-158.
- Gahan, L.J., Pauchet, Y., Vogel, H. & Heckel, D.G. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS genetics*, 6, e1001248.
- Gassmann, A.J., Carriere, Y. & Tabashnik, B.E. (2009). Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 54, 147-163.
- Jakka, S., Knight, V. & Jurat-Fuentes, J. (2014). Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 107, 342-351.
- Jakka, S.R.K., Gong, L., Hasler, J., Banerjee, R., Sheets, J.J., Narva, K. *et al.* (2016). Field-evolved mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic cry1Fa-expressing corn associated with reduced cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 1023-1034.
- Jallow, M.F. & Zalucki, M.P. (2003). Relationship between oviposition preference and offspring performance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). *Austral Entomology*, 42, 343-348.
- Janmaat, A.F. & Myers, J. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 270, 2263-2270.
- Janmaat, A.F. & Myers, J.H. (2005). The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 272, 1031-1038.
- Jurat-Fuentes, J.L., Karumbaiah, L., Jakka, S.R.K., Ning, C., Liu, C., Wu, K. *et al.* (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Plos One*, 6.
- Kasten Jr, P., Precetti, A. & Parra, J. (1978). Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. *Revista de Agricultura*.
- Leuck, D.B. & Perkins, W.D. (1972). Method of estimating fall armyworm lepidoptera-noctuidae progeny reduction when evaluating control achieved by host-plant resistance. *Journal of Economic Entomology*, 65, 482-&.
- Martinelli, S., Clark, P., Zucchi, M., Silva-Filho, M., Foster, J.E. & Omoto, C. (2007). Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera*

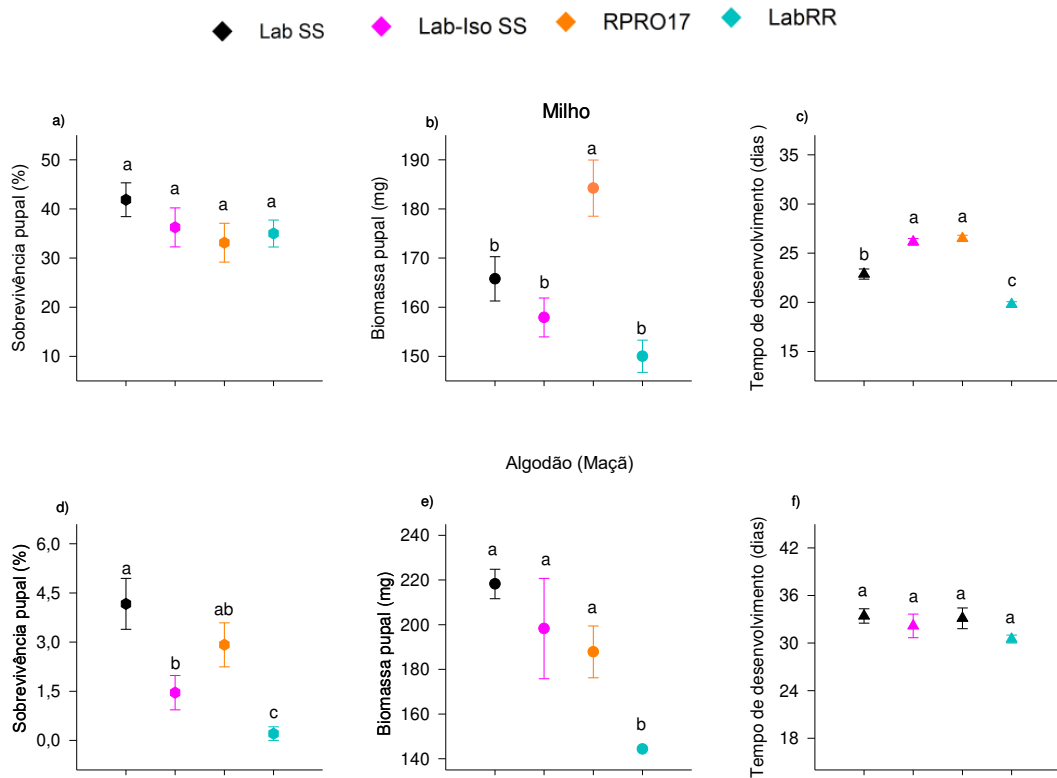
- frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 97, 225-231.
- Niu, Y., Head, G.P., Price, P.A. & Huang, F. (2016). Performance of Cry1A. 105-selected fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic maize plants containing single or pyramided Bt genes. *Crop Protection*, 88, 79-87.
- Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R.J., Dourado, P.M., Crivellari, A. *et al.* (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72, 1727-1736.
- Saeed, S., Sayyed, A.H. & Ahmad, I. (2010). Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Pest Science*, 83, 165-172.
- Santos-Amaya, O.F., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Tavares, C.S., Campos, S.O., Guedes, R.N.C. *et al.* (2015). Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5.
- Santos-Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Campos, S.O., Guedes, R.N.C., Alves, A.P. *et al.* (2017). Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science*, 73, 35-43.
- Santos Amaya, O.F., Tavares, C.S., Rodrigues, J.V.C., Santana, I.V., Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C. *et al.* (2019). Strong fitness costs of insect resistance to dual-gene Bt corn are magnified on less-suitable host-crop cultivars. *Em processo de submissão*.
- Storer, N.P., Babcock, J.M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G.D., Bing, J.W. *et al.* (2010). Discovery and characterization of field resistance to bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103, 1031-1038.
- Tabashnik, B.E., Brévault, T. & Carrière, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature biotechnology*, 31, 510-521.
- Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J. & Carriere, Y. (2009). Field-evolved insect resistance to bt crops: Definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology*, 102, 2011-2025.
- Williams, J.L., Eilers-Kirk, C., Orth, R.G., Gassmann, A.J., Head, G., Tabashnik, B.E. *et al.* (2011). Fitness cost of resistance to Bt cotton linked with increased gossypol content in pink bollworm larvae. *Plos One*, 6.
- Zhu, C., Niu, Y., Zhou, Y., Guo, J., Head, G.P., Price, P.A. *et al.* (2019). Survival and effective dominance level of a Cry1A. 105/Cry2Ab2-dual gene resistat

population of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) on common pyramided Bt corn traits. *Crop Protection*, 115, 84-91.

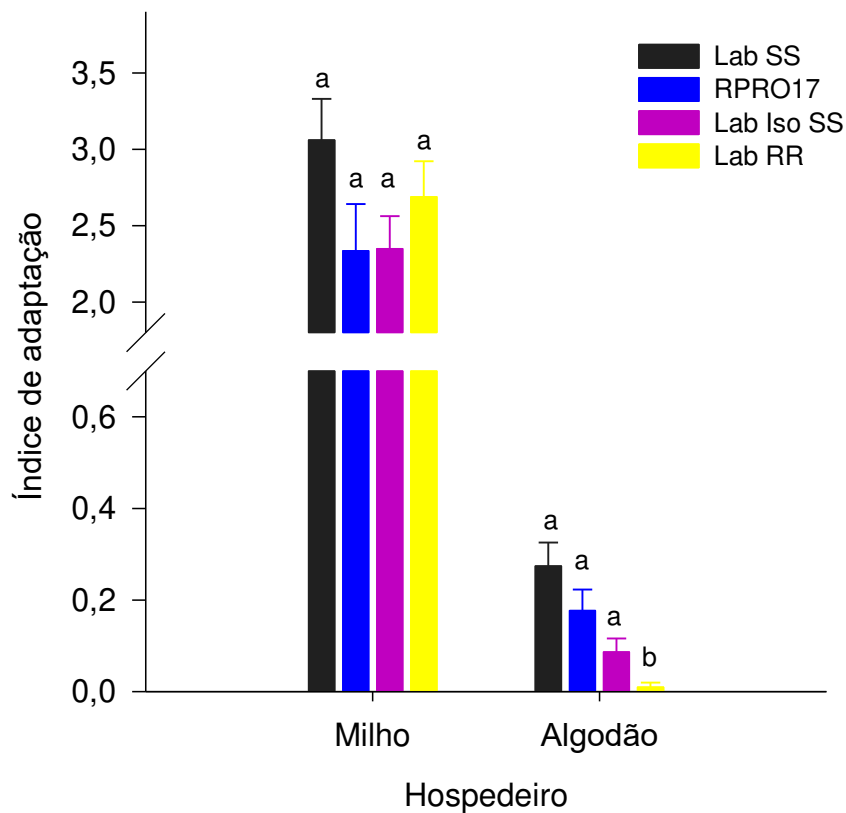
## Figuras - Capítulo 3



**Figura 3.1.** Sobrevivência larval aos cinco dias em populações de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes a Cry1A.105 + Cry2Ab alimentadas com folhagem do cartucho de milho ou estruturas vegetais de algodão (não-Bt). Os dados são médias  $\pm$  erro padrão. Diferentes letras indicam efeito significativo ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey entre as populações em uma mesma estrutura vegetal hospedeira.



**Figura 3.2. Características do histórico de vida da fase imatura de *S. frugiperda* de populações suscetíveis e resistentes a Cry1A.105 + Cry2Abem folhagem de milho e frutos de algodão não-Bt.** (a, d) Sobrevivência pupal (b, e) biomassa pupal e (c, f) tempo de desenvolvimento de neonatas até pupa. Médias  $\pm$  erro padrão com mesma letra indicam diferenças não significativas (ANOVA, teste de Tukey,  $P < 0,05$ ) entre as populações.



**Figura 3.3. Índice desempenho dos indivíduos de *S. frugiperda* de populações suscetíveis e resistentes a Cry1A.105 + Cry2Abem folhagem milho e frutos de algodão não-Bt.** Médias  $\pm$  erro padrão com a mesma barra ou letra não diferem significativamente entre si (ANOVA, teste de Tukey,  $P < 0,05$ ) para comparação das populações dentro de cada planta hospedeira.

## Considerações Finais

Este trabalho abordou o tema da resistência de *S. frugiperda* a toxinas Bt, problema que merece consideração porque há poucas dessas toxinas potentes disponíveis contra ela, somente duas ou três, e não há expectativa de lançamento de novas toxinas nos próximos anos. No Capítulo 1, documentou-se, pela primeira vez, resistência em populações de campo ao milho piramidado expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab em uma população coletada em 2016. Tal resistência demonstrou ser instável, o que deve estar associado a um forte custo adaptativo, conforme observado na população derivada do campo em 2013 (Santos-Amaya et al 2015, 2019). Esse fator oferecia condição favorável ao manejo da resistência. De fato, ele parece ter contribuído para o atraso do surgimento de resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab nas populações de campo de *S. frugiperda*, de acordo com as observações de manutenção da eficácia parcial desse milho contra a lagarta-do-cartucho no Brasil.

No Capítulo 1, ainda se observou que na população derivada do campo em 2013, a resistência tendeu a ser estável. Isso contrasta com as observações prévias no nosso laboratório, em que a resistência nessa população era instável, demandando seleções intermitentes com o milho Bt Cry1A.105 + Cry2Ab para manter o nível da resistência.

No Capítulo 2, foi documentado o desenvolvimento de resistência às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab em populações de campo coletadas no final de 2017. Tal resistência simultânea às duas toxinas foi completa e estável ao longo de 16 meses (12 gerações), condição desfavorável ao manejo da resistência em campo. No entanto, a resistência parece ser funcionalmente recessiva, o que pode possibilitar o seu manejo se houver indivíduos suscetíveis que acasalem com os resistentes (i.e., se houver áreas de refúgio e os insetos dessa área acasalarem com insetos resistentes da área Bt).

No Capítulo 3, o objetivo foi testar se a estabilidade da resistência na população isolada do campo em 2017 e aquela mantida laboratório desde 2013 estavam de fato associada à ausência de custo adaptativo. De fato, a resistência não

apresentou custos adaptativos aos insetos quando eles desenvolveram em folhagem de milho não-Bt. O mesmo ocorreu em vários órgãos vegetativos de algodão, que é um hospedeiro alternativo de *S. frugiperda*, sendo que o desafio alimentar imposto às larvas pelas estruturas do algodão não reduziu o desempenho da população resistente em relação às duas suscetíveis usadas no estudo. Esses resultados estão consistentes com a hipótese da ausência de custo adaptativo nas populações resistentes.

Para finalizar, a resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab em populações de *S. frugiperda*, que inicialmente parecia ser incompleta e custosa aos insetos, mudou desde 2013. O presente estudo mostra a mitigação do forte custo adaptativo previamente documentado na população de 2013 e a ausência desse custo e estabilidade da resistência nos insetos coletados do campo em 2017. Essa é uma condição desfavorável à durabilidade de eficácia do milho Bt piramidado Cry1A.105 + Cry2Ab contra *S. frugiperda*. Além disso, a existência de alelos que aparentemente conferem resistência completa a esse milho Bt indicam a necessidade de uso racional de estratégias e táticas de manejo da resistência para evitar perda total da eficácia das toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. Essas, juntamente com a toxina Vip3Aa, são as únicas disponíveis em milhos Bt para manejo de *S. frugiperda*, uma importante espécie fitófaga em milho nas Américas e invasora em outras regiões do mundo.