

JOSÉLIA CARVALHO OLIVEIRA FRANÇA

**DESEMPENHO DE POPULAÇÕES DE CAMPO de *Spodoptera frugiperda* EM MILHOS Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

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

T

F814d  
2018 França, Josélia Carvalho Oliveira, 1987-  
Desempenho de populações de *Spodoptera frugiperda* em milhos  
Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa / Josélia Carvalho Oliveira França. -  
Viçosa, MG, 2018.

viii,21f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Lagarta-do-cartucho. 2. Resistência aos inseticidas. 3. Milho -  
Doenças e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. II.  
Título.

CDD22. ed. 633.1596

JOSÉLIA CARVALHO OLIVEIRA FRANÇA

**DESEMPENHO DE POPULAÇÕES DE CAMPO de *Spodoptera frugiperda* EM MILHOS Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2018.

---

Haddi Khalid

---

Marcelo Coutinho Picanço

---

Simone Martins Mendes  
(Coorientadora)

---

Eliseu José Guedes Pereira  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade de realização deste curso.

A capes, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, professor Eliseu José Guedes Pereira, por todo direcionamento ao longo do curso, pela humildade de um líder e sabedoria de um mestre.

À Dra. Simone Martins Mendes, minha coorientadora por ter a sensibilidade de me acolher em um momento tão delicado na Embrapa Milho e Sorgo e pelos conselhos acadêmicos e pessoais.

Ao professor Marcelo Coutinho Picanço, pela co-orientação, por ter sido um pai nessa jornada cheia de desafios. Gratidão por seus valiosos conselhos e por ter me ajudado a crescer e me tornar parte da profissional que sou.

Ao Dr Oscar F Santos Amaya, por toda a ajuda do começo ao fim. Por ser um grande amigo e por me mostrar o tão capaz que eu era.

Ao Rafael Pitta da Embrapa Agrossilvipastoril, pela disponibilidade das áreas de estudos e toda ajuda na coleta.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Milho e Sorgo, por me ajudarem na execução desse trabalho com muita responsabilidade. Em especial Caio e Bruna pela participação ativa.

Aos amigos do Laboratório de Interação Inseto Planta, por estarem sempre me apoiando e me ensinando cada dia mais e por tornarem um ambiente tão estressante em um lugar alegre e feliz. Obrigada por esses anos de convivência!

Em especial, agradeço ao amigo Marcelo Rabelo por ter estado ao meu lado durante toda essa caminhada. Sou grata pela amizade e humildade de me ensinar o que sabia. Ao Teds, por ter sido um ombro amigo e fiel. A Silvana, por estar sempre me apoiando e pela parceria. Ao estagiário João Marcus, pelas brincadeiras diárias que alegam meu dia.

Aos amigos Eustáquio da Embrapa Milho e Sorgo, me auxiliando e me ensinando muito durante a execução desse trabalho e pela amizade. E ao Sr José Evaristo, por sempre alegrar o laboratório com seu bom humor e piadas. Ao Sr Romualdo por toda dedicação e amizade.

Aos meus pais, base de tudo em minha vida. Com muito amor envolvido e sinceridade conseguimos vencer mais esse desafio. O apoio incondicional de vocês, me faz respirar mais leve. Aos meus irmãos e sobrinhos, mesmo distante sempre se

fizeram presente de alguma forma. Ao meu namorado Islan, sou grata por toda força, companheirismo e muito amor e paciência.

E, finalmente, a todos amigos que de alguma forma foram importantes para que eu chegasse até aqui. Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
2.1. Coleta e criação dos insetos .....	3
2.3. Reposta das populações à exposição a Vip3Aa e Cry1A.105 + Cry2Ab.....	5
2.3.1. Laboratório.....	6
2.3.2. Casa de vegetação.....	7
2.4- Análises Estatísticas .....	8
<b>3.Resultados.....</b>	<b>9</b>
3.1. Reposta das populações à exposição a Vip3Aa e Cry1A.105 + Cry2Ab em laboratório .....	9
3.2. Reposta das populações à exposição a Vip3Aa e Cry1A.105 + Cry2Ab em ensaio em casa de vegetação .....	14
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>19</b>

## RESUMO

FRANÇA, Josélia Carvalho Oliveira França, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Desempenho de populações de *Spodoptera frugiperda* em milhos Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa.** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientadora: Simone Martins Mendes.

É grande a importância das toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) na agricultura mundial. Atualmente no Brasil, são amplamente usados para controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), milhos Bt de segunda geração (i.e., piramidados), entre os quais estão aqueles que expressam toxinas Bt Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa. A exposição prolongada desta praga as toxinas Bt, pode ocasionar o surgimento de populações resistentes, o que pode comprometer o uso dessas plantas no manejo de pragas. Neste trabalho, foi documentada a história de vida de cinco populações de *S. frugiperda* sob efeitos dos milhos Vip3Aa e Cry1A.105 + Cry2Ab. Larvas de *S. frugiperda* foram coletadas em cinco mesorregiões do Mato Grosso usando a progênie desses indivíduos, analisaram-se os efeitos dessas toxinas sobre as taxas de sobrevivência e outras características de história de vida. Em laboratório, obteve-se mortalidade de 100% para os indivíduos de todas as populações submetidos à exposição à toxina Vip3Aa. A taxa de sobrevivência para os insetos expostos a Cry1A.105 + Cry2Ab foi menor que 50% e o tempo de desenvolvimento larval foi maior em todas as populações expostas a essas toxinas. A biomassa pupal não diferiu em nenhuma das populações expostas ao milho Cry1A.105+Cry2Ab ou aos milhos não-Bt embora houvesse forte efeito de redução da massa larval dos indivíduos expostos ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab. Neste milho Bt os insetos de uma população (Nova Mutum) apresentaram índice de desempenho biótico semelhante aos insetos desta população criados no milho isogênico não-Bt, mas no milho não-Bt, tais insetos tiveram desempenho menor que os insetos suscetíveis. Em casa de vegetação, as larvas infestadas nas plantas com toxina Bt, principalmente Vip3Aa, ocasionaram menor injúria em relação às infestadas nas plantas não-Bt. Esses resultados indicam que o milho Vip3Aa continua eficiente para controle de *S. frugiperda* e que uma população apresentou resistência ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab, embora tal característica

pareça carregar um custo adaptativo aos insetos resistentes. Para lidar adequadamente com a lagarta do cartucho é preciso realizar manejo integrado das populações dessa praga no campo visando retardar possível desenvolvimento de resistência aos milhos Bt disponíveis aos produtores.

## ABSTRACT

FRANÇA, Josélia Carvalho Oliveira França, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Performance of *Spodoptera frugiperda* populations on Bt Cry1A.105 + Cry2Ab and Vip3Aa.** Advisor: Eliseu José Guedes Pereira. Co-advisor: Simone Martins Mendes.

The importance of the insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in the world agriculture is great. Currently in Brazil, they are widely used to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), second-generation Bt maize (i.e., pyramids), among which are those that express Bt toxins Cry1A.105 + Cry2Ab and Vip3Aa. Prolonged exposure of these pests to Bt toxins can lead to the emergence of resistant populations, which may compromise the use of these plants in pest management. In this work, the life history of five populations of *S. frugiperda* was documented under the effects of Vip3Aa and Cry1A.105 + Cry2Ab. Larvae of *S. frugiperda* were collected in five mesoregions of Mato Grosso using the progeny of these individuals, the effects of these toxins on the survival rates and other characteristics of life history were analyzed. In the laboratory, 100% mortality was obtained for individuals from all populations exposed to Vip3Aa toxin. The survival rate for insects exposed to Cry1A.105 + Cry2Ab was less than 50% and larval development time was highest in all populations exposed to these toxins. Pupal biomass did not differ in any of the populations exposed to Cry1A.105 + Cry2Ab maize or to non-Bt maize although there was a strong effect of reducing the larval mass of individuals exposed to Cry1A.105 + Cry2Ab maize. In this Bt maize the insects of a population (Nova Mutum) showed a similar biotic performance index to the insects of this population created in non-Bt isogenic maize, but in non-Bt maize, these insects performed less than susceptible insects. In a greenhouse, the larvae infested in plants with Bt toxin, mainly Vip3Aa, caused less injury than those infested in non-Bt plants. These results indicate that Vip3Aa corn is still efficient to control *S. frugiperda* and that a population showed resistance to Cry1A.105 + Cry2Ab maize, although this characteristic appears to carry an adaptive cost to resistant insects. In order to deal adequately with the cartridge caterpillar, it is necessary to carry out integrated management of the populations of this pest in the

field in order to delay possible development of resistance to the Bt maize available to the producers.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de culturas transgênicas expressando toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, representa uma das mais significativas mudanças nas práticas de manejo de pragas proporcionando impactos positivos na produção agrícola mundial [1, 2], tal como a redução no uso de lagarticidas de amplo espectro de ação [3]. Entretanto, há uma grande preocupação com o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), a principal praga alvo, devido aos inúmeros casos de resistência a milhos Bt já reportados mundialmente [4, 5].

Atualmente o principal método de controle de *S. frugiperda* é realizado por plantas transgênicas de segunda geração que expressam as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab (piramidado) e terceira geração que expressa a toxina Vip3Aa [6]. Desde 2009, plantas de milho Vip3Aa [7] foram liberadas para o uso comercial no Brasil, devido a grandes impactos econômico por falhas de controle de eventos de milhos Bt resultado da resistência de *S. frugiperda* ao milho Cry1F. Curiosamente, em cultivos de milho Bt de algumas localidades tem se observado de falha de controle de *S. frugiperda*, certamente em outras localidades esta tecnologia tem sido eficiente no controle desta praga.

Existem três fatores importantes no desenvolvimento de resistência, (i) a disponibilidade constante de plantas Bt cultivadas, (ii) a baixa adoção de áreas de refúgio nos cultivos e (iii) a existência de refúgios naturais insuficientes [8]. Devido aos avanços nos estudos sobre genética de populações e modelagem computacional, é possível se determinar estes três fatores [9-11]. Em insetos, os fatores com maior potencial para desenvolver resistência às toxinas Bt são as altas taxas de

reprodução, polifagia e muitas gerações por ano. Com isso, o risco de evolução da resistência é uma preocupação, porque a perda de susceptibilidade nas populações de insetos alvo pode levar a falhas de controle no campo [12].

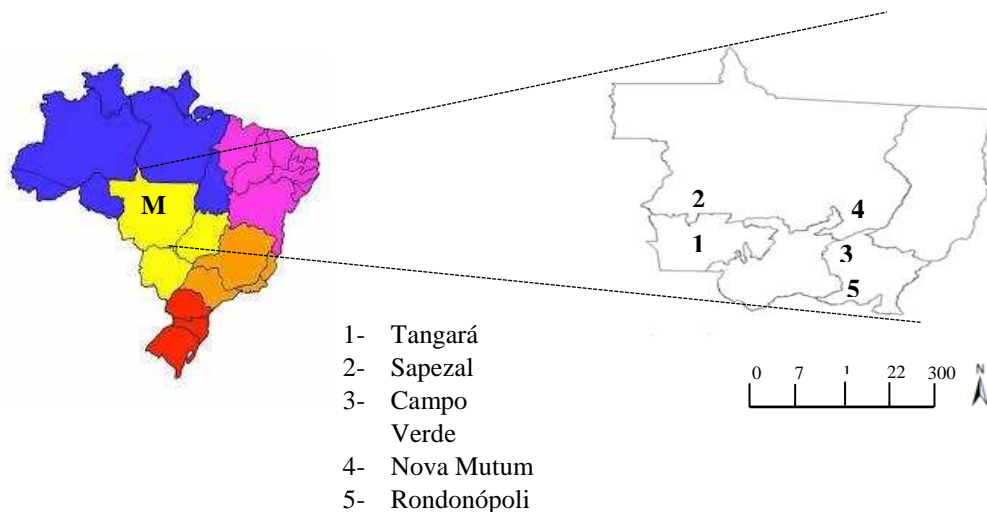
Estratégias como alta dose/refúgio [13, 14] e piramidação de genes [6] podem retardar a evolução da resistência. Os critérios de alta dose para pragas alvo nem sempre são satisfatórios [15], podendo haver exposição dos insetos a uma concentração de toxina que pode produzir um efeito subletal, deletério ou estimulatório [16]. A longo prazo, entretanto, a evolução de resistência em populações dos insetos-alvo nos cultivos Bt constitui uma ameaça à durabilidade de eficácia desse método de controle de pragas [4, 17]. Informações sobre os níveis de susceptibilidade de populações *S. frugiperda* são particularmente importantes para suportar os programas de manejo integrado de pragas (MIP) e manejo de resistência de insetos (MRI) [18].

Neste contexto, os objetivos neste trabalho foram documentar se a exposição prévia de populações de *S. frugiperda* às toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa afeta as taxas de crescimento larval, sobrevivência e desempenho biótico de populações oriundas do cerrado brasileiro. Para se atingir este objetivo se investigou (i) se houve aumento do nível de resistência a certos milhos Bt em populações do inseto (ii) e se esta resistência a Bt tem custo adaptativo aos insetos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta e criação dos insetos**

As lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas em lavouras de milho Bt por entomologistas da Embrapa. Estas foram coletadas em lavouras Bt expressando toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e Vip3Aa e culturas não Bt, de cinco das principais mesorregiões produtoras de milho no estado do Mato Grosso (Figura 1) no período de junho a agosto de 2017 (Tabela 1). No laboratório de Ecotoxicologia de Insetos e Manejo na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas – MG, foi realizada uma triagem dos insetos, que chegaram em caixas Gerbox no estágio de primeiro instar, separando apenas os insetos sadios, para assim dar início as populações em laboratório. Os insetos de cada localidade foram mantidos conjuntamente originando 5 populações. Para manutenção da criação, larvas neonatas foram colocadas em copos plásticos de 50 ml, sendo os potes devidamente fechados com tampas acrílicas transparentes, contendo dieta artificial. Os insetos foram mantidos em sala climatizada a  $27 \pm 2$  °C,  $70 \pm 15\%$  de UR e um e 14 h de fotoperíodo (L:D) e criadas por três gerações em dieta artificial adaptada de GREENE et al.(1976) até a realização do experimento.



**Figura 1.** Amostragem do local de coleta da lagarta do cartucho na região do estado do Mato Grosso, apresentando cada localidade.

**Tabela 1.** Local de coleta, híbridos de milho e números de indivíduos iniciais da lagarta *Spodoptera frugiperda* utilizadas no presente estudo.

Região	Município	Lavoura de Milho	Número de insetos coletados
Sul	Campo Verde	Impacto Convencional	48
		Impacto Vip *	48
		DkB 390 Convencionais	96
		Dkb 390 Vtpro*	96
Norte	Nova Mutum	Impacto Convencional	48
		Impacto Vip *	48
		DkB 390 Convencional	96
		Dkb 390 Vtpro*	96
Sudeste	Rondonópolis	Impacto Convencional	48
		Impacto Vip *	48
		DkB 390 Convencionais	96
		Dkb 390 Vtpro*	96
Sudoeste	Sapezal	Impacto Convencional	48
		Impacto Vip *	48
		DkB 390 Convencionais	96
		Dkb 390 Vtpro*	96
Oeste	Tangará	Impacto Convencional	48
		Impacto Vip *	48
		DkB 390 Convencionais	96
		Dkb 390 Vtpro*	96

\*Plantas Bt

## **2.2. Cultivo do Milho e Montagem dos experimentos**

Quatro híbridos de milhos comercialmente utilizadas no Brasil foram utilizados: Impacto Viptera (evento MIR162, toxina Bt Vip3Aa) e seu isogênico não-Bt (Impacto não-Bt), além do híbrido DKB390 VTPRO (com toxinas Bt Cry1A.105 + Cry2Ab) e seu isogênico não-Bt (DKB390). As folhas das plantas foram retiradas em estágio vegetativo de desenvolvimento V6-V9. No campo experimental da Embrapa Milho & Sorgo, foi realizado semeadura escalonada a cada duas semanas. As irrigações foram realizadas umas vezes por semana e a adubação foi realizada no 10º e 35º dia após a emergência, com 40 g de NPK 8-28-16. Os tratamentos culturais seguiram as práticas de cultivo recomendadas para a cultura do milho, exceto pelo controle mecânico de ervas daninha e pela não aplicação de inseticidas.

## **2.3. Reposta das populações à exposição a Vip3Aa e Cry1A.105 + Cry2Ab**

Foram realizados dois experimentos, um em Laboratório e outro em casa de vegetação. Um experimento foi realizado no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos, em salas climatizada a  $27 \pm 2$  °C,  $70 \pm 15\%$  de UR e um e 14 h de fotoperíodo (L:D) durante os meses de junho a agosto de 2017. Em outro experimento, em casa de vegetação, foi avaliada as injúrias ocasionadas pelas larvas desde neonatas até a fim da fase larval. Para ambos experimentos, foi usado um esquema fatorial (6 populações x 2 tipos de toxinas Bt x 2 híbridos de milho) em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. No experimento em laboratório foram avaliadas as características da história de vida de *S. frugiperda* em um conjunto de 24 copos plástico de 50 ml (dispostos em suportes de isopor).

Já em casa de vegetação foi avaliado as injúrias causadas pelas larvas às plantas, totalizando 96 vasos de 20 litros.

### **2.3.1. Laboratório**

Folhas de milho foram cortadas do cartucho das plantas em estágio V6-V9, coladas em baldes com água para manter a turgidez e levadas para o laboratório. Em seguida foram limpas, secas e seccionadas em pedaços de 2 cm, descartando-se os 10 cm mais distais das folhas. As seções foliares foram transferidas para as unidades experimentais e larvas neonatas (1 dia) de cada população foram transferidas individualmente para copos de 50 ml. Foram transferidas 48 larvas para o milho Vip3Aa e seu isogênico não-Bt enquanto 96 larvas foram transferidas para o milho com as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab e seu isogênico não-Bt.

A cada dois dias foram trocadas as seções foliares oferecidas para as larvas até a pupação, sendo anotada a mortalidade até o desenvolvimento dos adultos. A biomassa de todas as lagartas foi mensurada aos 13 dias e as pupas foram avaliadas no primeiro dia de observação com o uso de balança de precisão (0,1 mg). O período larval foi estimado somente para os insetos sobreviventes até a fase de pupa, contando-se o número de dias desde a eclosão das larvas até a observação da pupa.

Os dados da pesagem de biomassa pupal citada do experimento acima (2.3.1), da sobrevivência (razão) e do período de desenvolvimento larval (dias) foram usados para calcular um índice de desempenho biótico conforme [19-21] para avaliar o desempenho larval de *S. frugiperda* em híbridos de milho Bt e não Bt. Esse índice é baseado no índice de susceptibilidade de Pencoe [22] e assume que o

Biomassa da pupa se correlaciona positivamente com a fecundidade [23]. O cálculo do índice foi feito a partir da fórmula [sobrevivência larval (decimal) x peso pupal (mg) ] / tempo de desenvolvimento (dias)] [24]. Essa metodologia já foi usada em outros trabalhos [20, 21].

### **2.3.2. Casa de vegetação**

De junho a agosto de 2017 foi realizado experimento em casa de vegetação nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo. O cultivo do milho seguiu as recomendações técnicas, realizando semeadura escalonada em duas semanas, as irrigações foram feitas duas vezes por dia, como padrões usados na Embrapa. A adubação foi realizada semanalmente com o fertilizante BIOFERT plus® (Biofert, Contagem, Minas Gerais), que contém os macros e micronutrientes necessários para adequado desenvolvimento, floração e frutificação das plantas. O fertilizante foi aplicado em concentração de 1,5 ml/l em água, usando-se 0,5 litro da diluição em cada vaso. A unidade experimental constituiu-se de vasos (60 litros) com 3 plantas, as quais foram infestadas com 5 larvas/planta, totalizando 15 larvas por vaso. Os vasos foram envoltos com estrutura de vergalhão metálico e coberta com voil. Havia 4 vasos (repetições) por tratamento, totalizando 96 vasos para as seis diferentes populações (5 do MT e uma testemunha, ou seja sem infestação larval).

A injúria causada pelas lagartas foi avaliada aos 7, 14 e 21 dias. Usou-se uma escala de notas variando de 0 a 5 adaptada de Carvalho (1970) [25] sendo: 0) plantas com ausência de dano; 1) plantas apresentando folhas raspadas; 2) plantas apresentando folhas furadas; 3) planta com lesão nas folhas e no cartucho; 4) plantas com o cartucho destruído, e 5) plantas com muitas folhas e o cartucho completamente destruído.

## 2.4- Análises Estatísticas

Para todas as análises realizadas, as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias foram atendidas [26], não sendo necessária a transformação dos dados. Os dados da biomassa larval, pupal e do tempo de desenvolvimento foram submetidos à análise de variância multifatorial e teste de média (teste da mínima diferença significativa de Fisher ( $P < 0,05$ )) [26] quando pertinente. Nessas análises, cada indivíduo vivo na ocasião da avaliação do experimento foi considerado uma repetição tal que o número de graus de liberdade do resíduo foi diferente para cada uma dessas variáveis. Diferentemente, o número de repetições na análise das notas de injúria do experimento em casa de vegetação foi constante. Neste experimento foram obtidas as médias das notas das injúrias nas três datas de avaliação e esses dados submetidos à análise de variância semelhante ao descrito para o experimento de laboratório.

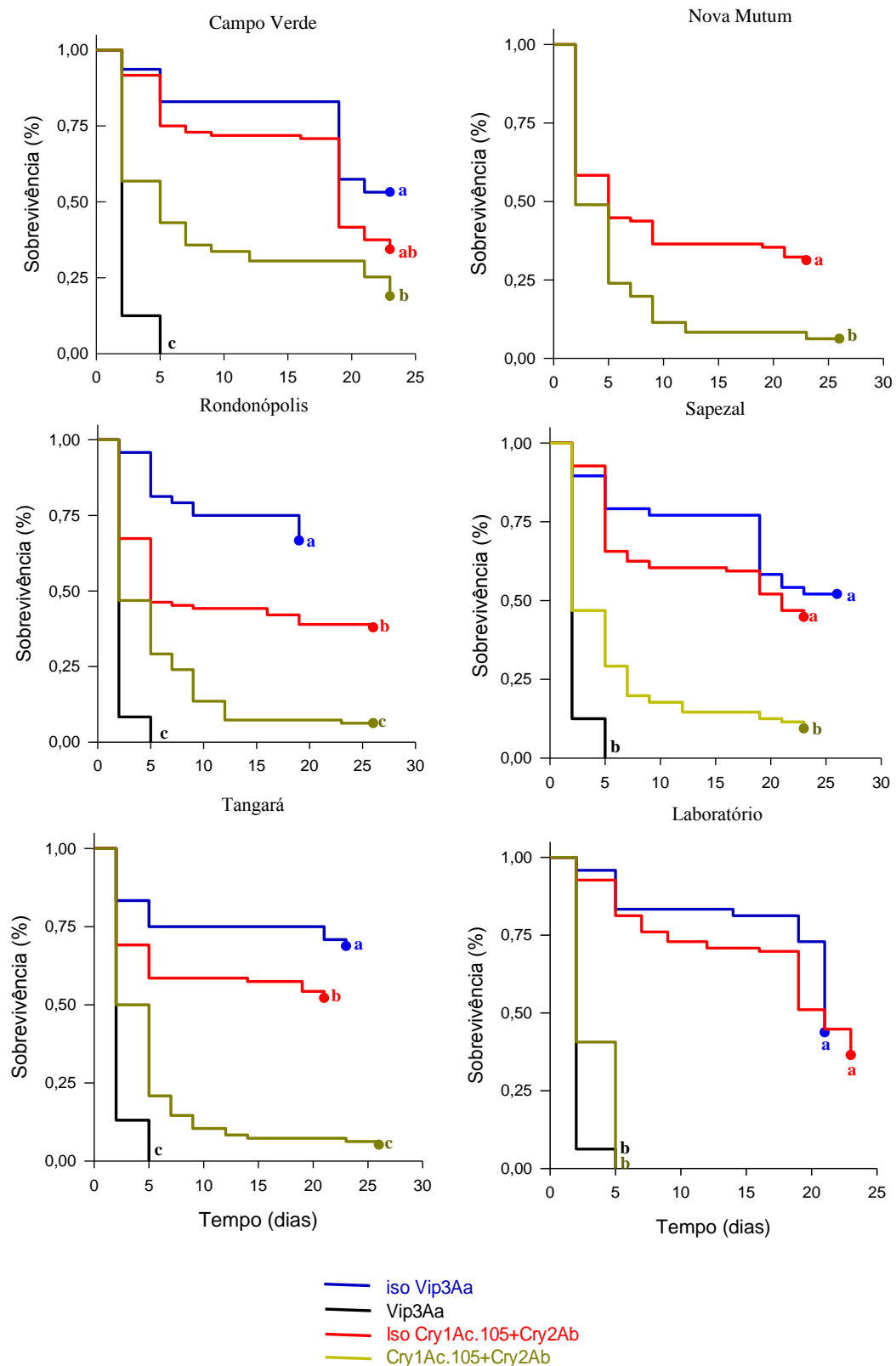
Os dados de sobrevivência de larvas foram analisados usando o procedimento não paramétrico que utiliza estimadores de Kaplan-Meier [27] para obter as curvas de sobrevivência. Esse procedimento fornece testes de qui-quadrado ( $\alpha = 0,05$ ) para a hipótese de igualdade entre as curvas de sobrevivência e para comparações múltiplas, que foram realizados usando ajuste de Holm-Sidak para não aumentar o valor de  $\alpha$  [28].

### **3.Resultados**

#### **3.1. Reposta das populações à exposição a Vip3Aa e Cry1A.105 + Cry2Ab em laboratório**

A Figura 1 apresenta a dinâmica de mortalidade ao longo do desenvolvimento larval das populações dos cinco locais de coletas e da população suscetível padrão de laboratório expostas às toxinas Bt Cry1A.105+Cry2Ab e Vip3Aa nos milhos Bt e seus respectivos isogênicos não-Bt (DKB390 e Impacto). Em todos os locais de coletas (Campo verde, Nova Mutum, Rondonópolis, Sapezal e Tangará), as mortalidades larvais foram significativamente diferentes entre os tratamentos, mesmo quando as larvas foram submetidas as folhas Bt e não Bt. Os insetos de todas as populações, conseguiram sobreviver por no máximo cinco dias quando expostos à toxina Vip3Aa.

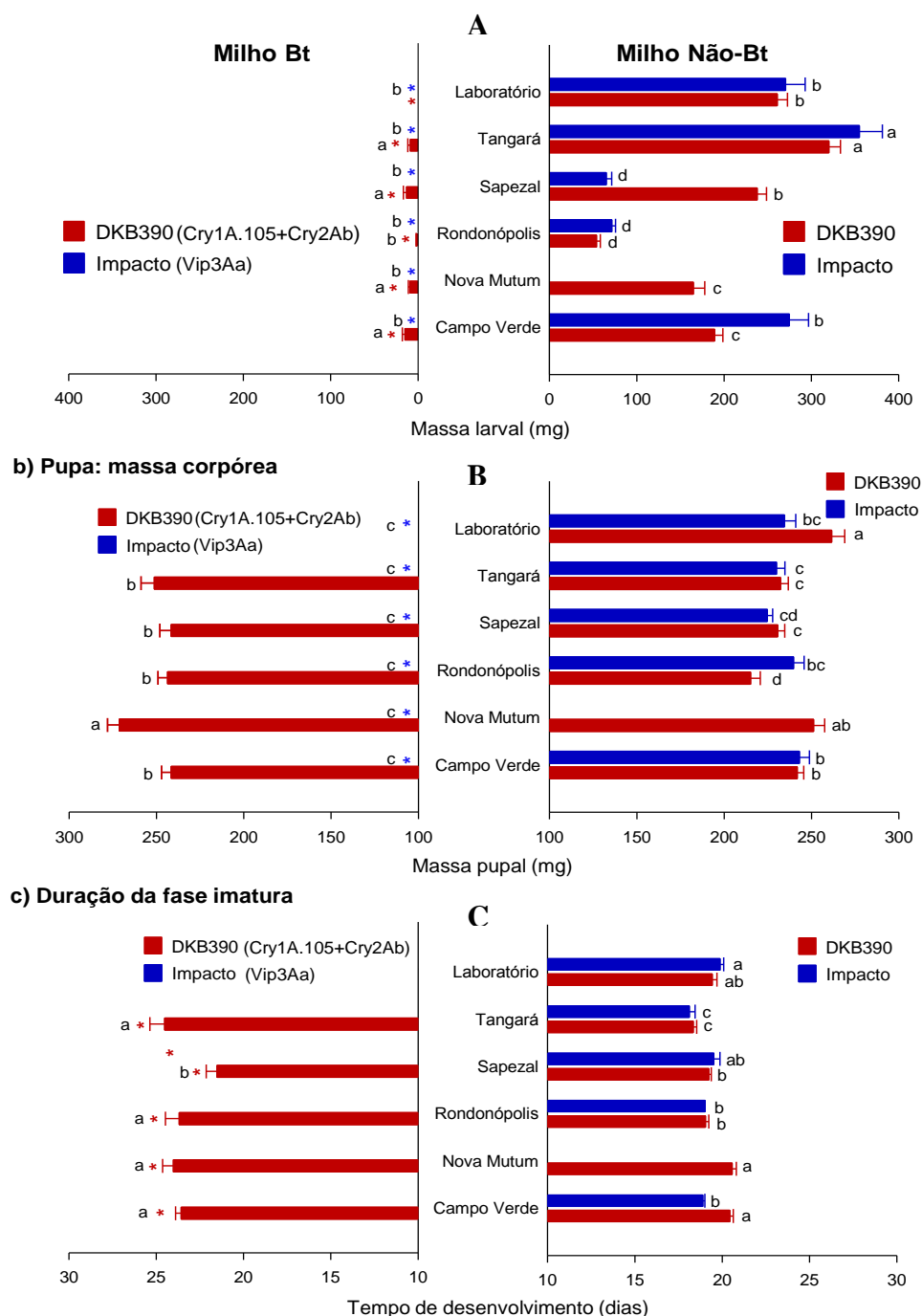
As características do histórico de vida das cinco populações de campo e de laboratório, variaram com a população, o híbrido de milho e a presença ou não de toxina Bt em seus tecidos, havendo interações entre alguns destes fatores, principalmente entre população × milho ( $F > 4,38$ ;  $P < 0,01$ ). O desdobramento dos resultados das variáveis-resposta analisadas são apresentados na Figura 2.



**Figura 1:** Curvas de sobrevivência larval das populações de *Spodoptera frugiperda*. O experimento foi iniciado com 48 indivíduos para a toxina Vip3Aa e 96 para

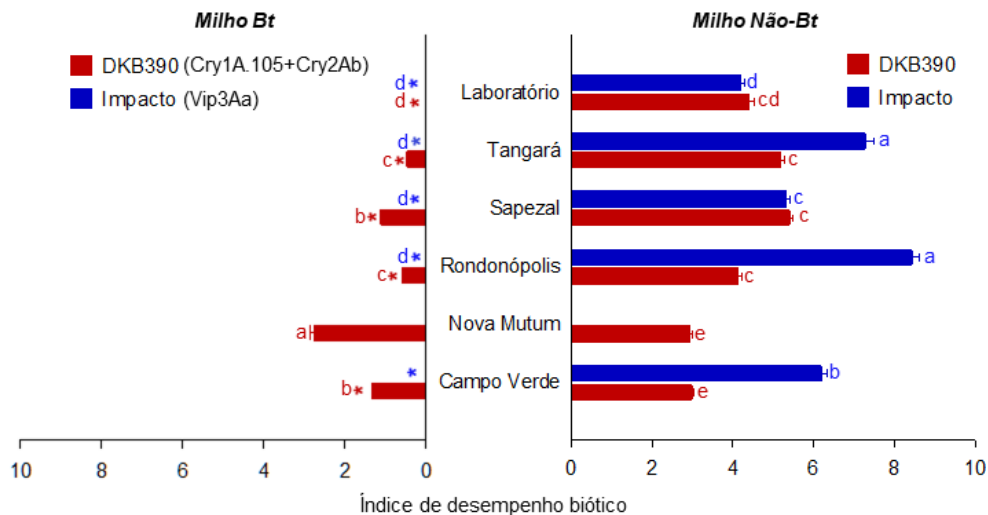
folhagem do milho expressando as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab. Curvas marcadas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Holm-Sidak ( $P > 0,05$ ).

A biomassa larval de todas as populações estudadas, foi significativamente menor quando os insetos foram expostos ao milho Bt comparando-se ao não-Bt. Porém, no estágio de pupa, todas as populações conseguiram adquirir uma biomassa da pupa semelhante com a biomassa larval em ambos os tratamentos. Para essa compensação, os insetos de todas as populações expostas ao milho Bt apresentaram um tempo maior no seu desenvolvimento até pupa. É importante ressaltar que a população de Nova Mutum e Sapezal no milho Bt, tiveram uma baixa biomassa larval, semelhante biomassa pupal e gastando aproximadamente o mesmo tempo de desenvolvimento sob exposição ou não ao milho Bt Cry1A.105+Cry2Ab, em relação as demais populações.



**Figura 2.** Características do histórico de vida de populações de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes regiões do Mato Grosso. As barras são médias  $\pm$  erro padrão. Asterisco (\*) indica efeito significativo ( $P < 0,05$ ) de determinado milho Bt (em relação ao seu isogênico não-Bt) na população do inseto. Para cada característica e dentro de um mesmo tipo de milho (Bt ou não-Bt), barras contendo mesma letra não diferem entre populações pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ( $P > 0,05$ ).

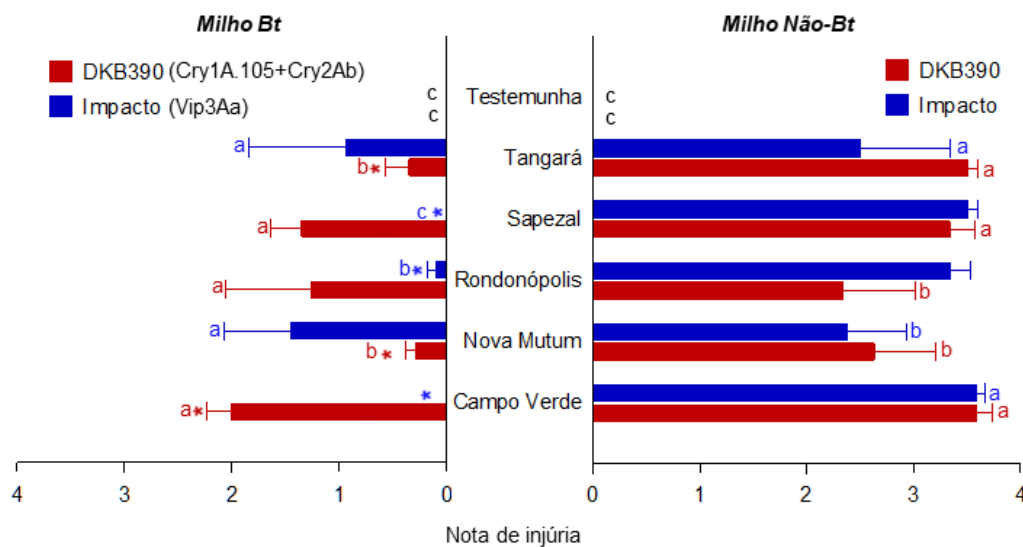
O índice de desempenho biótico de todas as populações expostas aos milhos Bt aparentou menor valor quando comparado ao índice de desempenho das respectivas populações no milho não Bt (Figura 3). Quando observamos os resultados do desempenho dos insetos nos milhos não-Bt, notamos que aqueles de Tangará, Rondonópolis e Campo Verde tiveram melhor desempenho no milho Impacto que no milho DKB390. Considerando o desempenho dos insetos nos milhos Bt e não-Bt, observa-se que os insetos de Nova Mutum apresentaram desempenho semelhante no milho Cry1A.105+Cry2Ab e em seu isogênico não-Bt. Além disso, esses insetos apresentaram o melhor desempenho em relação àqueles das demais localidades, indicando apresentarem certo nível resistência ao milho Cry1A.105+Cry2Ab. Em milho não-Bt, os insetos de Campo Verde e Nova Mutum apresentaram os piores desempenhos, indicando que a resistência ao milho Cry1A.105+Cry2Ab na população de Nova Mutum parece vir com um custo adaptativo aos insetos.



**Figura 3:** Índice de desempenho biótico de populações de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes regiões do Mato Grosso. As barras são médias  $\pm$  erro padrão. Asterisco (\*) indica menor desempenho da população em milho Bt em relação ao milho não-Bt ( $P < 0,05$ ). Para cada tipo de milho (Bt ou não-Bt), barras contendo mesma letra não diferem pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ( $P > 0,05$ ).

### 3.2. Reposta das populações à exposição a Vip3Aa e Cry1A.105 + Cry2Ab em ensaio em casa de vegetação

A avaliação em casa de vegetação das injúrias causadas pelas larvas das populações de *S. frugiperda*, demonstrou que essas causaram maiores danos as folhas de milho não Bt, o que já era de se esperar dado que a toxina Bt é causadora de mortalidade larval. Ainda assim, a população de Nova Mutum ocasionou menores danos no milho Cry1A.105+Cry2Ab ( $P < 0,05$ ), obtendo uma das menores notas de injúria quando comparadas com as demais populações. A testemunha obteve nota igual a zero, pois as plantas não foram infestadas, sendo esse resultado coerente com o esperado.



**Figura 4:** Resultados do ensaio em casa de vegetação mostrando a injúria causada por larvas de populações de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes regiões do Mato Grosso. As barras são médias  $\pm$  erro padrão. Asterisco (\*) indica menor injúria da população em milho Bt em relação ao milho não-Bt ( $P < 0,05$ ). Barras contendo mesma letra dentro de cada tipo milho não diferem entre populações pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ( $P > 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

As toxinas Bt Cry1A.105 + Cry2Ab reduziram o desempenho das larvas de *S. frugiperda*, porém esse efeito foi variável entre as populações estudadas. A toxina Vip3Aa causou 100% de mortalidade larval em todas populações, confirmando a eficácia dela contra larvas de noctuídeos, principalmente a lagarta do cartucho. Esta variação da resposta entre os híbridos, podem ser explicadas pelas diferenças estruturais das toxinas Cry e Vip que interagem com diferentes sítios de ligação no intestino médio larval.

A sobrevivência até pupa em folhas de milho Bt DKB390 (Cry1A.105 + Cry2Ab) variou entre as populações, sendo este inferior a 50%. A sobrevivência larval também foi menor no milho DK390 não-Bt em relação ao Impacto não-Bt. Mesmo com baixa sobrevivência no Cry1A.105 + Cry2Ab, os índices populacionais da lagarta do cartucho nesse milho Bt devem ser monitorados, tomando-se decisão de controle curativo se for necessário. Para isso deve-se fazer amostragens nas lavouras e aplicar táticas adequadas de MIP, tais como uso de inseticidas seletivos e controle biológico. Em contrapartida, todas as populações expostas à toxina Vip3Aa apresentaram 100% de mortalidade, não conseguindo completar seu estágio larval, atingindo tempo máximo de sobrevivência de apenas 5 dias. Portanto, esses resultados sugerem que os insetos dessas regiões possuem alta susceptibilidade milho Bt com a toxina Vip3Aa.

Os resultados no milho DKB390 Bt e não-Bt para a região de Nova Mutum de população de *S. frugiperda*, apresenta resistência a Cry1A.105 + Cry2Ab, sendo essa uma área que demanda maior atenção, para que futuramente não ocorra total perda da eficácia do milho Bt que produz essas toxinas. Um fator favorável ao

manejo de resistência *S. frugiperda* a Cry1A.105 + Cry2Ab é que parece haver custo adaptativo associado à resistência [12, 29]. Isso tem sido observado em nosso laboratório na UFV (dados ainda não publicados) e também foi evidenciado pelo resultado de menor desempenho dos insetos dessa população na ausência das toxinas Bt (milho não-Bt DKB390, Figura 3). Além disso, os insetos de Nova Mutum apresentaram o baixo vigor, tanto que morreram em altas taxas, impossibilitando montagem dos experimentos com o milho Impacto não-Bt.

Apesar das variações na biomassa larval dos insetos alimentados com folhas de milho Bt e não-Bt, os valores de biomassa pupal para os indivíduos expostos em milho Bt DKB390 foram semelhantes em todas as populações coletadas a campo. Isso indica que todos os indivíduos conseguiram atingir um peso adequado para possivelmente chegar a fase adulta e reproduzir normalmente, deixando descendentes. Além disso, o desempenho das larvas no milho DKB390 em relação ao milho Impacto foi maior, aparentando ser este um alimento de melhor qualidade. Sendo assim, há uma resistência natural no campo desses híbridos nas regiões de Rondonópolis e Tangará.

Neste trabalho, foi documentado que há atraso no desenvolvimento das larvas expostas a toxinas Bt comparadas a tratadas com milho não-Bt. Esse atraso pode levar à assincronia no desenvolvimento de insetos do refúgio e da área Bt, o que pode aumentar a probabilidade de acasalamentos entre indivíduos oriundos de plantas Bt. Sendo assim, este cenário pode contribuir para acelerar o surgimento de populações resistentes [12, 30]. Atualmente, o refúgio é uma das principais estratégias para retardar a evolução da resistência de insetos às plantas Bt [8], porém, , essa estratégia considera que os acasalamentos são ao acaso. Em

contrapartida, o atraso no tempo de desenvolvimento e permanência dos indivíduos no campo, aumenta o tempo de exposição aos seus inimigos naturais, tendendo a aumentar a taxa de mortalidade natural. Em estudos futuros, é importante investigar a taxa de parasitismo e predação larval populações de *S. frugiperda* no campo quando em milho Bt e não-Bt para conhecer se o controle biológico natural pode auxiliar a reduzir sobrevivência natural de indivíduos resistentes à planta Bt.

Pelo cálculo do índice de adaptação, que possui similaridade com os valores da taxa intrínseca de crescimento populacional, foi possível conhecer o desempenho das populações quando criadas nos milhos Bt com as toxinas Cry e Vip e seus respectivos milhos isogênicos não-Bt. Entre os milhos não-Bt, o híbrido DKB390 parece apresentar uma resistência natural maior que a do híbrido Impacto, demonstrada pelo melhor desempenho dos insetos neste último híbrido. Assim, o milho não-Bt Impacto parece ser um alimento de melhor qualidade para os insetos e talvez possa utilizado como área de refúgio por tender a produzir mais insetos suscetíveis para ‘diluir’ a resistência no campo. No entanto, é de grande importância expandir as investigações para avaliar o desempenho de *S. frugiperda* de milhos não-Bt

No entanto, é de grande importância expandir as investigações para avaliar o desempenho de *S. frugiperda* em milhos Bt, pois esses resultados indicam que o milho Vip3Aa continua eficiente para controle de *S. frugiperda* e que uma população apresentou resistência ao milho Cry1A.105 + Cry2Ab, embora tal característica pareça carregar um custo adaptativo aos insetos resistentes. Para lidar adequadamente com a lagarta do cartucho é preciso realizar manejo integrado das

populações dessa praga no campo visando retardar possível desenvolvimento de resistência aos milhos Bt disponíveis aos produtores.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shelton AM, Zhao J-Z, Roush RT: **Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants**. Annual Review of Entomology 2002, **47**(1):845-881.
2. Romeis J, Shelton A, Kennedy G: **Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops Within IPM Programs: Progress in Biological Control**: Springer; 2008.
3. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P: **Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications**. Plant Biotechnology Journal 2011, **9**(3):283-300.
4. Tabashnik BE: **Evolution of resistance to Bacillus thuringiensis**. Annual Review of Entomology 1994, **39**:47-79.
5. Ferré J, Van Rie J, MacIntosh SC: **Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM)**. In: Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops Within IPM Programs. Springer; 2008: 41-85.
6. Santos-Amaya OF, Rodrigues JVC, Souza TC, Tavares CS, Campos SO, Guedes RNC, Pereira EJJ: **Resistance to dual-gene Bt maize in Spodoptera frugiperda: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events**. Scientific Reports 2015, **5**:10.
7. Bernardi O, Bernardi D, Horikoshi RJ, Okuma DM, Miraldo LL, Faretto J, Medeiros FC, Burd T, Omoto C: **Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from Bacillus thuringiensis in Spodoptera frugiperda**. Pest Management Science 2016, **72**(9):1794-1802.
8. Bernardi O, Bernardi D, Amado D, Sousa RS, Faretto J, Medeiros FCL, Conville J, Burd T, Omoto C: **Resistance risk assessment of Spodoptera frugiperda (lepidoptera: Noctuidae) and Diatraea saccharalis (lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn**. Journal of Economic Entomology 2015, **108**(6):2711-2719.
9. Corrêa AS, Orlando de Oliveira L, Braga LS, Guedes RNC: **Distribution of the related weevil species Sitophilus oryzae and S. zeamais in Brazil**. Insect Science 2013, **20**(6):763-770.
10. Leite NA, Alves-Pereira A, Corrêa AS, Zucchi MI, Omoto C: **Demographics and genetic variability of the new world bollworm (Helicoverpa zea) and the old world bollworm (Helicoverpa armigera) in Brazil**. PloS One 2014, **9**(11):e113286.
11. Malaquias JB, Godoy WA, Garcia AG, Ramalho FdS, Omoto C: **Larval Dispersal of Spodoptera frugiperda Strains on Bt Cotton: A Model for Understanding Resistance Evolution and Consequences for its Management**. Scientific Reports 2017, **7**(1):16109.
12. Gassmann AJ, Carriere Y, Tabashnik BE: **Fitness Costs of Insect Resistance to Bacillus thuringiensis**. In: Annual Review of Entomology. vol. 54. Palo Alto: Annual Reviews; 2009: 147-163.

13. Tabashnik BE, Mota-Sanchez D, Whalon ME, Hollingworth RM, Carrière Y: **Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides**. Journal of Economic Entomology 2014, **107**(2):496-507.
14. Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carriere Y: **Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data**. Journal of Economic Entomology 2009, **102**(6):2011-2025.
15. Tabashnik BE, Brevault T, Carriere Y: **Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres**. Nature Biotechnology 2013, **31**(6):510-521.
16. Sousa FF, Mendes SM, Santos-Amaya OF, Araujo OG, Oliveira EE, Pereira EJG: **Life-History Traits of Spodoptera frugiperda Populations Exposed to Low-Dose Bt Maize**. PloS One 2016, **11**(5):18.
17. Gould F: **Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology**. Annual review of entomology 1998, **43**:701-726.
18. Bernardi O, Sorgatto RJ, Barbosa AD, Domingues FA, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C: **Low susceptibility of Spodoptera cosmioides, Spodoptera eridania and Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein**. Crop Protection 2014, **58**:33-40.
19. Brasil Boregas KG, Martins Mendes S, Magid Waquil J, Wilson Fernandes G: **Estádio de adaptação de Spodoptera frugiperda (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos**. Bragantia 2013, **72**(1).
20. Leite NA, Mendes SM, Santos-Amaya OF, Santos CA, Teixeira TP, Guedes RN, Pereira EJ: **Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in a Brazilian strain of fall armyworm**. Entomologia Experimentalis et Applicata 2016, **158**(3):236-247.
21. Waquil MS, Pereira EJG, de Sousa Carvalho SS, Pitta RM, Waquil JM, Mendes SM: **Índice de adaptação e tempo letal da lagarta-do-cartucho em milho Bt**. Pesquisa Agropecuária Brasileira 2016, **51**(5):563-570.
22. Pencoe N, Martin P: **Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development and adult fecundity on five grass hosts**. Environmental Entomology 1982, **11**(3):720-723.
23. Leuck DB, Perkins WD: **A Method of Estimating Fall Armyworm Progeny Reduction When Evaluating Control Achieved by Host-Plant Resistance 1 2**. Journal of Economic Entomology 1972, **65**(2):482-483.
24. Jallow MF, Zalucki MP: **Relationship between oviposition preference and offspring performance in Australian Helicoverpa armigera (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae)**. Austral Entomology 2003, **42**(4):343-348.
25. CARVALHO R: **Danos, flutuações da população, controle e comportamento de Spodoptera frugiperda (JE Smith 1797), e sua suscetibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo**. Danos, flutuações da população, controle e comportamento de Spodoptera frugiperda (JE Smith 1797), e sua suscetibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo 1970.
26. SAS Institute: **SAS/GRAPH 9.1 Reference**: SAS institute; ,2004.

27. Kaplan EL, Meier P: **Nonparametric estimation from incomplete observations**. Journal of the American statistical association 1958, **53**(282):457-481.
28. Allison PD: **Survival analysis using SAS: a practical guide**: Sas Institute; 2010.
29. Santos-Amaya OF, Tavares CS, Rodrigues JV, Campos SO, Guedes RN, Alves AP, Pereira EJ: **Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of Spodoptera frugiperda**. Pest Management Science 2017, **73**(1):35-43.
30. Andow DA: **The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops**. Collection of Biosafety Reviews 2008, **4**:142-199.