

JACIARA GONÇALVES

**EFETIVIDADE DO REFÚGIO É AFETADA PELO COMPORTAMENTO DE
OVIPOSIÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* EM CULTIVOS DE MILHO Bt?**

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
2017

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

T

G635e
2017
Gonçalves, Jaciara, 1990-
Efetividade do refúgio é afetada pelo comportamento de
oviposição de *Spodoptera frugiperda* em cultivos de milho Bt? /
Jaciara Gonçalves. – Viçosa, MG, 2017.
25f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.23-25.

1. *Spodoptera frugiperda*. 2. Inseto - Comportamento.
3. Oviposição. 4. Milho - Resistência a doenças e pragas. 5.
Bacillus thuringiensis. 6. Oviposição. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de
Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

JACIARA GONÇALVES

EFETIVIDADE DO REFÚGIO É AFETADA PELO COMPORTAMENTO DE OVIPOSIÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* EM CULTIVOS DE MILHO Bt?

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: 17 de fevereiro de 2017.



Marcelo Coutinho Picanço




Felipe de Lemos



Silvana Vieira de Paula Moraes
(Coorientadora)



Oscar Fernando Santos Amaya
(Coorientador)



Eliseu José Guedes Pereira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por jamais me abandonar.

A meus pais, Joaquim e Nelci, pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem a seguir em frente e pelo exemplo de caráter e honestidade que são.

A minha amada irmã, por todo amor e amizade compartilhada, e por me amparar nos momentos difíceis.

Ao meu amigo e namorado, João Victor, pelo apoio durante estes dois anos, em todas as etapas do projeto, contribuindo com suas ideias e trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Interação Inseto-Planta, sem os quais essa experiência não teria sido completa, pelo acolhimento e carinho demonstrados, além do auxílio na condução e avaliação dos experimentos.

Aos professores do departamento de Entomologia, por todo conhecimento compartilhado, além de terem sido para mim, exemplo de dedicação e amor à profissão.

Em especial ao Professor Eliseu José Guedes Pereira, por receber-me tão bem seu laboratório, por me permitir fazer parte do seu time, pelos ensinamentos transmitidos e orientação durante o mestrado.

Ao coorientador e amigo, Oscar Fernando Santos Amaya, por todo suporte na elaboração do trabalho, além do conhecimento sempre compartilhado.

Aos membros da banca examinadora, Professora Silvana Vieira de Paula Moraes, Professor Marcelo Coutinho Picanço e Pós doutorando Felipe Lemos, por aceitarem contribuir com este trabalho enriquecendo-o com seus conhecimentos.

Ao Professor Márcio Henrique Pereira Barbosa, por ceder espaço para realização dos experimentos em casa de vegetação.

Ao grupo Horita, que permitiu a realização de um dos experimentos de campo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela excelente formação dedicada aos seus estudantes.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de estudo e aprendizado.

RESUMO

GONÇALVES, Jaciara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Efetividade do refúgio é afetada pelo comportamento de oviposição de *Spodoptera frugiperda* em cultivos de milho Bt?** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientadores: Oscar Fernando Santos Amaya e Silvana Vieira de Paula Moraes.

A alta dose refúgio é a principal estratégia para o manejo da resistência de insetos em cultivos que produzem toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Para que essa ferramenta seja eficaz, a escolha de oviposição pelo inseto-alvo em plantas Bt e plantas não-Bt do refúgio deve ser ao acaso. Estudos recentes com *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) demonstraram que mariposas podem ter preferência de oviposição por milho Bt em detrimento de plantas do refúgio, devido ao maior ataque de lagartas nestas plantas não-Bt, comportamento que pode contribuir para a seleção de populações resistentes. A hipótese de preferência de mariposas por plantas Bt foi testada em experimentos em casa de vegetação e em campo. Em casa de vegetação, avaliou-se a preferência de oviposição de *S. frugiperda* entre plantas de milho Cry1Fa e seu híbrido isogênico não-Bt, bem como, testou-se a hipótese de que adultos de *S. frugiperda* evitam ovipositar em plantas previamente infestadas por coespecíficos quando podem escolher entre plantas com e sem injúria. No primeiro experimento à campo, foram quantificados o número de ovos e de lagartas de *S. frugiperda* em nove híbridos de milho Bt e não-Bt, em campo comercial. No segundo experimento, foram avaliados o número de ovos e a injúria causada por lagartas em plantas de milho Bt piramidado Cry1A.105+Cry2Ab2, e sua área de refúgio (50%), em campo experimental. Os resultados dos experimentos em casa de vegetação e em campo indicam que mariposas de *S. frugiperda* não diferenciam plantas Bt de não-Bt para oviposição, e que a presença de injúria não interfere na escolha para oviposição. Os resultados obtidos suportam a conclusão de que não há preferência de oviposição em mariposas de *S. frugiperda* dentro dos cultivos de milho Bt. Portanto, esse fator não parece ser determinante na seleção de populações resistentes a cultivos Bt nesta espécie.

ABSTRACT

GONÇALVES, Jaciara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Is refuge effectiveness affected by the oviposition behavior of *Spodoptera frugiperda* in Bt maize crops?** Adviser: Eliseu José Guedes Pereira. Co-advisers: Oscar Fernando Santos Amaya and Silvana Vieira de Paula Moraes.

The high/dose refuge is the main insect resistance management strategy in crops that produce insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt). For this tool to be effective, the oviposition choice by the target insect on Bt and non-Bt refuge plants should be random. Recent studies with *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) have shown that the moth may prefer to oviposit on Bt maize rather than plants of the refuge due to the greater damage caused by caterpillars in these non-Bt plants. This behavior may contribute to the selection of resistant populations. The hypothesis of preference for Bt plants by *S. frugiperda* moths was tested in greenhouse and field experiments. In the greenhouse, it was evaluated the oviposition preference of *S. frugiperda* between Cry1Fa maize and its isoline hybrid non-Bt, as well as the hypothesis that adults of *S. frugiperda* avoid ovipositing in plants previously infested by conspecific when they can choose between clean and damaged plants. In the first field experiment, it was quantified the number of eggs and caterpillars of *S. frugiperda* in nine hybrids of Bt and non-Bt maize in a commercial field. In the second experiment, it was evaluated the number of eggs and the injury caused by caterpillars on plants in a pyramided Bt maize Cry1A.105 + Cry2Ab2, and its refuge area (50%). The results of both greenhouse and field experiments indicate that *S. frugiperda* moths do not differentiate non-Bt from Bt plants for oviposition and that the presence of plant injury does not interfere in moth choice for oviposition. The results support the conclusion that there is no preference for oviposition in *S. frugiperda* moths within Bt maize crops and therefore this factor does not seem to be determinant to the selection of resistant populations to Bt crops in this species.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. Experimentos de preferência de oviposição em casa de vegetação.....	3
2.1.1. Origem e manutenção dos insetos.....	3
2.1.2. Bioensaio concentração-resposta.....	4
2.1.3. Plantas de milho.....	5
2.1.4. Preparação de insetos para a liberação em gaiolas	5
2.1.5. Teste de preferência sem escolha: plantas sem injúria	6
2.1.6. Teste de preferência com escolha: plantas sem injúria.....	6
2.1.7. Teste de preferência com escolha: plantas com e sem injúria	6
2.1.8. Análise dos dados	7
2.2. Experimentos de preferência de oviposição de <i>S. frugiperda</i> em campo.....	7
2.2.1. Oviposição em híbridos de milho em cultivo comercial	7
2.2.2. Oviposição em híbridos de milho em campo experimental.....	8
2.2.3. Análise dos dados	10
3. RESULTADOS.....	11
3.1. Preferência de oviposição em casa de vegetação	11
3.1.1. Suscetibilidade da população Viçosa à toxina Cry1Fa	11
3.1.2. Teste de preferência sem escolha: plantas sem injúria	11
3.1.3. Teste de preferência com escolha: plantas com e sem injúria	11
3.2. Experimentos de preferência de oviposição de <i>S. frugiperda</i> em campo.....	12
3.2.1. Oviposição em híbridos de milho em cultivo comercial	12
3.2.2. Oviposição em híbridos de milho em campo experimental.....	13
4. DISCUSSÃO.....	14
5. CONCLUSÕES.....	18
6. REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

A mais moderna prática de manejo de insetos pragas é o uso de plantas transgênicas que produzem proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Contudo, como prognosticado desde o início do uso desta tecnologia (Gould, 1988), populações de pragas alvo rapidamente tem desenvolvido resistência às plantas Bt, reduzindo sua eficácia no manejo de pragas. Um exemplo destes casos de resistência tem ocorrido com a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho Bt Cry1F e Cry1Ab no Brasil (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016) e Estados Unidos (Huang et al., 2014) países com a maior área cultivada com plantas transgênicas Bt no mundo (James, 2015).

A principal ferramenta empregada no manejo da resistência em cultivos Bt é a estratégia de alta dose e refúgio (Gould, 1988), a qual é recomendada para reduzir a pressão de seleção por fornecer indivíduos suscetíveis para o acasalamento com os raros indivíduos resistentes emergidos das culturas Bt e torna a resistência funcionalmente recessiva ao matar os indivíduos heterozigotos. Para que essa estratégia seja bem sucedida é necessário que o evento transgênico seja de alta dose (capaz de expressar proteína Bt suficiente para matar mais de 99% de insetos suscetíveis) e que o refúgio (uma área plantada com mesma espécie vegetal não-Bt) esteja em proximidade ao cultivo Bt (Gould, 1998). Além da distância da área de refúgio em relação à área Bt, aspectos relacionados com a biologia dos insetos-praga podem influenciar a funcionalidade do refúgio em fornecer indivíduos suscetíveis (Glaser e Matten, 2003). Entre eles está a escolha do local de oviposição pelas mariposas. Se as fêmeas ovipositarem com maior frequência nas plantas Bt do que nas plantas do refúgio, esse comportamento poderia aumentar a pressão de seleção ao aumentar o número de indivíduos resistentes emergidos dos campos Bt.

Estudos reportaram que algumas espécies de lepidópteros, alvo da tecnologia Bt, não discriminam plantas Bt de não-Bt (Kumar, 2004; Van Den Berg e Van Wyk, 2007; Hardke et al., 2012; Sun et al., 2013). Contudo, Téllez-Rodríguez et al. (2014) observaram que *S. frugiperda* em condições de campo apresenta uma forte preferência de oviposição por plantas de milho Bt em detrimento de milho não-Bt, o que pode comprometer a eficácia da estratégia alta dose e refúgio e, portanto, acelerar o surgimento de populações resistentes. Este comportamento de evitar plantas não-Bt para a oviposição, foi atribuído a presença de injúria foliar nestas plantas, pois em laboratório esta espécie demonstrou discriminar compostos orgânicos voláteis emitidos por plantas de milho previamente atacadas por coespecíficos (Pinto-Zevallos et al., 2016) e evitá-los em teste de olfatômetro (Signoretti et al., 2012). Este comportamento de evitar ovipositar em plantas previamente infestadas por coespecíficos, foi também verificado em casa de vegetação em *Tricoplusia ni* (Coapio et al., 2016) e *Heliothis virescens* (De Moraes et al., 2001), espécies estas pertencentes à mesma família de *S. frugiperda*.

Torna-se relevante investigar fatores comportamentais intrínsecos das espécies alvos da tecnologia Bt, especialmente de *S. frugiperda*, a qual é uma espécie polífaga (Casmuz et al., 2010), com alta capacidade migratória e de dispersão (Vilarinho et al., 2011) e, também, com rápida resposta à pressão de seleção exercida pelas toxinas Bt (Santos-Amaya et al., 2015; Leite et al., 2016; Santos-Amaya et al., 2016). Para tanto, estudamos o comportamento de oviposição dessa espécie em casa de vegetação e em condições de campo, investigando se existe preferência de oviposição entre milhos Bt e não-Bt, bem como se a injúria pode influenciar na escolha do local de oviposição pela mariposa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Experimentos de preferência de oviposição em casa de vegetação

2.1.1. Origem e manutenção dos insetos

Os insetos utilizados nos experimentos em casa de vegetação foram provenientes de uma população de *S. frugiperda* coletada em milho não-Bt em Viçosa, Minas Gerais, em dezembro de 2015. As lagartas coletadas nos cartuchos das plantas de milho foram levadas ao Laboratório de Interação Inseto-Planta, sendo mantidas apenas as que não apresentavam sintomas de infecção por entomopatógenos e/ou parasitoides. Aproximadamente 200 larvas foram individualizadas em bandejas de PVC com 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP) e mantidas sob condições controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (14h de luz e 10h de escuro) e umidade relativa ($70 \pm 10\%$). Nesta fase, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial à base de feijão (Kasten Jr. et al., 1978) até empuparem. Os adultos foram alimentados com dieta líquida à base de água (10% açúcar e 5% de ácido ascórbico), embebida em algodão e mantidos em gaiolas de PVC (40 cm de altura x 30 cm de diâmetro). As gaiolas foram recobertas internamente com papel sulfite e na parte superior com jornal, ambos como substrato para oviposição. As massas de ovos foram coletadas a cada dois dias e armazenadas em sacos plásticos até a eclosão das neonatas, as quais eram transferidas para potes plásticos (500 ml) contendo dieta artificial até atingirem o segundo instar. Posteriormente as lagartas eram individualizadas em bandejas de PVC (16 células) contendo dieta, onde eram mantidas até estágio de pupa. Esta população passou a ser denominada de Viçosa.

Uma segunda população, proveniente da Embrapa Milho & Sorgo (Sete Lagoas, MG) e aqui denominada de Lab foi utilizada como referência suscetível para o cálculo da razão de resistência da população Viçosa, por estar sendo mantida por mais de 15 anos em laboratório, sem nenhum contato com inseticidas (convencionais ou Bt).

2.1.2 Bioensaio concentração-resposta

Para conhecer a suscetibilidade da população Viçosa à toxina Cry1Fa e poder planejar os experimentos de preferência em casa de vegetação e campo, foram realizados bioensaios concentração-reposta (Marçon et al., 1999). A toxina Cry1Fa foi obtida do laboratório da Dra. Marianne P. Carey (Case Western Reserve University, OH), na forma liofilizada, sendo ativada com tripsina e purificada (96%) em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). A toxina foi mantida a -80°C até a sua utilização no bioensaio, sendo então utilizado uma solução tampão pH 11 de 50 mM de CAPS e 2 mM de DDT para solubilizar a proteína.

O bioensaio foi realizado de acordo com a metodologia de Marçon et al. (1999), expondo lagartas com menos de 24 horas (neonatas) a sete concentrações da toxina e um controle. Para obter uma distribuição uniforme sobre a superfície, cada concentração da toxina foi diluída em Triton-X 100 (0,1%). Um mililitro de dieta artificial foi adicionado à cada célula em bandejas de 128 células (16 mm de diâmetro e 16 mm de profundidade cada célula; CD

International Pitman, NJ) e mantidas em temperatura ambiente até que solidificassem (aproximadamente 30 minutos). Trinta microlitros de solução contendo toxina foi aplicada na superfície da dieta de cada célula. O controle consistiu em células tratadas apenas com 30 μL do espalhante. Aproximadamente 60 minutos após a aplicação, quando as células já estavam secas, foi adicionado uma neonata em cada célula, as quais foram em seguida cobertas com tampas ventiladas (CD International, Pitman, NJ). As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento com escotofase de 24h, temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.

A mortalidade foi avaliada após sete dias de exposição, sendo consideradas mortas também lagartas que não conseguiram passar para o segundo instar ou seu peso foi inferior a 0,1 mg (Marçon et al., 1999). Os bioensaios foram feitos com neonatas provenientes das populações Viçosa e Lab, sendo repetidos quatro vezes em diferentes datas e cada repetição constituída por 16 neonatas.

Os dados de mortalidade foram submetidos a análise de Probit (Finney, 1971) usando o programa PoloPlus (Robertson et al., 2007). A razão de resistência foi calculada com base na mortalidade da população suscetível (Lab) (Robertson et al., 1995; Robertson et al., 2007).

2.13. Plantas de milho

O milho Bt utilizado foi o híbrido transgênico 30F53H (Pioneer Sementes, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil), evento TC1507, o qual expressa a endotoxina Cry1Fa de Bt. Como milho não-Bt foi utilizado seu isogênico 30F53 (Pioneer Sementes, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil), o qual possui o mesmo material genético que o milho Bt.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação no campo experimental Diogo Alves de Mello, da Universidade Federal de Viçosa. Duas sementes foram semeadas em vasos de polietileno com volume de 3 L (15 cm de altura x 18 cm de diâmetro) contendo mistura de substrato (Bioplant Agrícola Ltda., Nova Ponte, MG, Brasil) e solo na proporção de 2:1. Após emergência, apenas uma plântula foi mantida em cada vaso. As plantas foram adubadas com NPK 4-14-8 uma semana após o plantio e irrigadas duas vezes ao dia via gotejamento.

Os vasos foram alocados dentro de gaiolas recobertas com tecido voil (1,5 x 3 x 2 m), sendo 0,25 m o espaçamento entre plantas e 0,70 m entre linhas. O espaço entre os vasos da superfície inferior da gaiola foi coberto com solo, simulando condições de campo. Os experimentos foram conduzidos aproximadamente 20 dias após a semeadura do milho, no estágio fenológico V4.

2.14. Preparação de insetos para a liberação em gaiolas

Após a sexagem das pupas (Capinera, 1999), fêmeas e machos da população Viçosa foram separadamente colocados em gaiolas de PVC (30 cm altura x 20 cm diâmetro) até a emergência dos adultos. Em seguida, 20 fêmeas e 20 machos de aproximadamente 3 dias de idade foram colocados em uma mesma gaiola para acasalamento no laboratório. Após 48 horas,

os vinte casais de cada tratamento eram liberados dentro de cada gaiola na casa de vegetação. Em todos os experimentos a liberação foi realizada entre as 17 h e 18 h, quando a temperatura era mais amena, para que as mariposas se aclimatassem ao ambiente. Após 48 horas da liberação, as mariposas (machos e fêmeas) foram coletadas da gaiola. Para a contagem de posturas, cada planta foi retirada cuidadosamente da gaiola e disposta sobre a bancada da casa de vegetação onde cada folha foi inspecionada separadamente. Todos os experimentos de preferência de oviposição foram realizados entre fevereiro e junho de 2016 e repetidos 8 vezes.

2.15. Teste de preferência sem escolha: plantas sem injúria

Com intuito de investigar se há diferença na aceitação de plantas Bt e não-Bt por mariposas acasaladas de *S. frugiperda*, foi realizado o teste de preferência sem escolha. Para tanto, nove plantas Bt foram dispostas dentro de uma gaiola e nove plantas não-Bt foram dispostas dentro de outra gaiola, de forma que a mariposa não pode escolher entre as duas.

2.16. Teste de preferência com escolha: plantas sem injúria

A fim de verificar se as fêmeas acasaladas de *S. frugiperda* são capazes de distinguir milho Bt de milho não-Bt na busca pelo local de oviposição, foi realizado um teste de preferência com chance de escolha entre os dois tipos de plantas. Neste teste, quatro plantas Bt e quatro plantas não-Bt foram alternadamente colocadas dentro de cada gaiola, permitindo que a mariposa escolhesse entre os dois híbridos.

2.17. Teste de preferência com escolha: plantas com e sem injúria

Este terceiro experimento com chance de escolha para oviposição entre plantas Bt e não-Bt, com e sem injúria de lagartas de *S. frugiperda*, permitiu identificar se essa espécie apresenta alguma preferência por plantas sem injúria. O experimento consistiu de três tratamentos, todos com metade das plantas Bt (quatro plantas) e a outra metade com plantas não-Bt (quatro plantas)

dispostas em uma mesma gaiola. No primeiro tratamento apenas as plantas Bt foram previamente infestadas com lagartas de *S. frugiperda*. No segundo tratamento apenas as plantas não-Bt foram infestadas e no terceiro, tanto plantas Bt quanto não-Bt foram infestadas.

Todas as infestações foram realizadas com lagartas de terceiro instar da população Viçosa, a qual mostrou ser resistente à toxina Cry1Fa nos bioensaios concentração-resposta. A infestação foi realizada 24 horas antes da liberação das mariposas acasaladas, colocando uma lagarta por planta dentro do cartucho. A contagem de posturas foi realizada 48 horas depois da liberação dos adultos, retirando-se lagartas e os adultos das gaiolas.

2.1.8. Análise dos dados

O número de massas de ovos em plantas sem dano, Bt e não-Bt do teste de preferência sem escolha foram comparados pelo teste F ao nível de significância de 5% (PROC MIXED). Já os dados dos experimentos com escolha, com e sem dano, foram submetidos ao teste de Qui-quadrado, sob a hipótese de uma proporção de 50% de escolha de um dos tratamentos (PROC FREQ). A normalidade e homogeneidade das variáveis foram checadas através da análise dos resíduos (PROC MIXED, PROC UNIVARIATE, PROC GPLOT) (SAS Inc, 2011).

2.2. Experimentos de preferência de oviposição de *S. frugiperda* em campo

2.2.1. Oviposição em híbridos de milho em cultivo comercial

Com objetivo de investigar o comportamento de oviposição de *S. frugiperda* em nove diferentes híbridos Bt e não-Bt em campo, realizou-se este experimento em cultivo comercial, na fazenda Querubim, situada em São Desidério, Bahia (12°21'8" S, 44°59'3" W) na safra 2013-2014. Foram semeados sete híbridos de milho Bt e dois híbridos não-Bt (Tabela 1), em 23 de novembro de 2013. Como práticas de cultivo, foram realizados correção do solo e adubação padrão com NPK no plantio, além de adubação de cobertura com nitrogênio no início do cultivo. Para o controle de plantas daninhas e pragas de solo iniciais, foi realizado uma única

aplicação de herbicida e inseticida no estágio V6: metomil [Lannate (Dupont, Barueri, SP, Brasil)], mesotriona [Callisto (Syngenta, São Paulo, SP, Brasil)] e atrazina [Primóleo (Syngenta, São Paulo, SP, Brasil)]. Após esse estágio nenhum inseticida foi aplicado na área experimental.

O experimento foi realizado em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. Os blocos foram espaçados entre si em 4,2 m. Cada bloco foi constituído por nove parcelas experimentais, sendo cada parcela um híbrido de milho (Bt ou não-Bt). Cada parcela teve seis linhas de plantio com 20 m de comprimento cada. O espaçamento foi de 0,76 x 0,10 m.

As avaliações foram realizadas a campo quando as plantas de milho estavam nos estádios fenológicos V6/V7, V10, polinização e R2. Para tanto, foram selecionadas dez plantas ao acaso nas duas linhas centrais de cada parcela. Em cada uma destas plantas foram avaliados o número de lagartas e de massas de ovos *S. frugiperda*, inspecionando-as inteiramente (folhas do cartucho, folhas adjacentes e colmo).

2.2.2 Oviposição em híbridos de milho em campo experimental

Com intuito de avaliar o comportamento de oviposição de *S. frugiperda* em milho Bt em relação ao refúgio (não-Bt), realizou-se este experimento no campo experimental Diogo Alves de Mello, em Viçosa, Minas Gerais (20°45'14"S, 42°52'55"W), entre outubro e dezembro de 2016. Neste experimento, utilizou-se apenas um híbrido Bt e a simulação de refúgio de 50%, afim de que a escolha da mariposa fosse apenas limitada pelo tipo de milho e pela diferença entre eles quanto ao dano causado por infestação natural de lagartas de *S. frugiperda*.

O híbrido Bt utilizado foi o RB9110Pro, evento piramidado MON89034 (Riber KWS Sementes AS, Patos de Minas, MG, Brasil), o qual expressa as toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab2. Como refúgio, foi utilizado seu híbrido isolinha, RB9110. Neste experimento optou-se por este evento piramidado, porque a população de campo coletada na estação experimental apresentou

resistência à toxina Cry1Fa em biosensaio concentração-resposta, portanto este não poderia ser utilizado, pois não seria observado diferença entre o nível de dano do refúgio e do cultivo Bt.

A semeadura foi realizada em 23 de outubro de 2016, logo após adubação de plantio com NPK 8-28-16. As sementes foram comercialmente tratadas visando controle de pragas de solo com os inseticidas: clothianidin [Poncho (Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil)] e fipronil [Standak (BASF S.A., São Paulo, SP, Brasil)]. Os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para o cultivo de milho (Cruz, 2010), sem aplicação de pesticidas e com controle de plantas daninhas por capina manual.

O experimento foi realizado em delineamento de blocos ao acaso com cinco repetições. Os blocos foram espaçados entre si em 5 m. Cada bloco foi constituído por dois tratamentos, uma parcela com plantas Bt e a outra parcela com plantas não-Bt, distantes entre si em 1 m. Cada parcela teve cinco linhas de plantio com 5 m de comprimento cada, e o espaçamento foi de 0,90 m x 0,25 m.

Quando os primeiros danos causados por infestação natural de *S. frugiperda* foram observados nas plantas de milho, [(15 DAS (dias após a semeadura))], iniciaram-se as avaliações, no estágio vegetativo V3, as quais foram repetidas a cada três dias, avaliando-se as mesmas plantas em cada avaliação. O dano nas plantas foi estimado através da escala Davis (Davis et al., 1989) que varia de zero a nove, onde zero corresponde a ausência total de dano e nove corresponde à total destruição do cartucho e folhas adjacentes. A contagem das posturas foi executada revisando-se inteiramente (folhas do cartucho, folhas adjacentes e colmo) todas as plantas das três linhas centrais de cada parcela (aproximadamente 60 plantas por tratamento por repetição). Os dados da contagem de ovos e dano das plantas foram agrupados por estágio fenológico do milho. As avaliações encerraram-se quando o dano observado nos dois tratamentos foi estatisticamente igual em duas avaliações consecutivas, pois não havendo mais diferença na injúria entre plantas Bt e não-Bt a hipótese de preferência já não poderia ser testada.

2.2.3. Análise dos dados

A estimativa do dano, número de lagartas e número de massas de ovos foram analisados com o procedimento PROC MIXED para medidas repetidas do SAS (SAS Inc, 2011). A matriz de covariância utilizada em cada modelo foi determinada através da comparação entre os índices AICC (*corrected Akaike's Information Criterion*), sendo escolhida a matriz que apresentou menor índice, o que significa ser o modelo de covariância que melhor se ajusta aos dados (Gbur et al., 2012). A normalidade e homogeneidade foram checadas através de análise dos resíduos (PROC MIXED, PROC UNIVARIATE, PROC GPLOT) (Inc, 2011). Quando necessário, os dados foram transformados para $\sqrt{y+1}$ (número de massas de ovos e de lagartas) e para $\log(y+1)$ (nível de dano).

3. RESULTADOS

3.1. Preferência de oviposição em casa de vegetação

3.1.1. Suscetibilidade da população Viçosa à toxina Cry1Fa

Como indicado por valores de P superiores a 0,05, o modelo de Probit se ajustou satisfatoriamente aos resultados dos bioensaios, permitindo estimativas dos parâmetros que descrevem a suscetibilidade da população Viçosa à proteína Cry1Fa (Tabela 2). A maior concentração testada (10.000 ng.cm⁻²) não causou mortalidade após 7 dias de exposição na população de Viçosa. Contudo, com base nessa concentração foi calculado o limite inferior da razão de resistência da população Viçosa, o qual foi superior a 111,27 vezes à concentração necessária para matar 50% da população suscetível (Lab) (Tabela 2). Este valor indica que população Viçosa possui alto de nível de resistência a Cry1Fa.

3.1.2. Teste de preferência sem escolha: plantas sem injúria

Não foi observada diferença significativa na taxa de oviposição de mariposas acasaladas de *S. frugiperda* quando lhes foi oferecido plantas de milho Bt Cry1Fa ou milho não-Bt ($F = 3,37$; $gl = 1, 7$; $P = 0,109$), quando as mesmas não apresentavam injúria e as mariposas não tiveram chance de escolha (Figura 1).

3.1.3. Teste de preferência com escolha: plantas com e sem injúria

Não se observou diferença significativa no número de massas de ovos depositados quando as mariposas tiveram a chance de escolha entre plantas Bt e não-Bt sem injúrias ($P > 0,05$), ou seja, as mariposas acasaladas não fazem distinção entre plantas de milho Bt e não-Bt quando confinadas em um mesmo ambiente. Além disso, os experimentos com plantas Bt e não-Bt com injúria e sem injúria indicaram que esse fator não influenciou a escolha na oviposição em *S. frugiperda* ($P > 0,05$) (Figura 2).

3.2. Experimentos de preferência de oviposição de *S. frugiperda* em campo

3.2.1. Oviposição em híbridos de milho em cultivo comercial

Observa-se que houve infestação por *S. frugiperda* em todos os estádios fenológicos do milho (Figura 3). Entretanto, os híbridos apresentaram diferente grau de susceptibilidade em função do estágio fenológico em que as plantas se encontravam. Isso ficou constatado com uma interação altamente significativa entre os tratamentos (híbridos) e os estádios fenológicos avaliados ($F = 3,37$; $gl = 24, 81$; $P < 0,0001$). No início do cultivo (V6/V7), as maiores médias foram observadas nos híbridos não-Bt⁽¹⁾, não-Bt⁽²⁾ e Cry1Fa+Cry1Ab.

Já os híbridos Cry1A.105+Cry2Ab2⁽¹⁾ e Cry1Ab+VIP3Aa20 apresentaram as menores médias de número de lagartas por planta, enquanto que os demais híbridos apresentaram valores intermediários de infestação. Já em estágio mais avançado do período vegetativo (V10), os híbridos Cry1A.105+Cry2Ab2⁽¹⁾ e Cry1Ab+VIP3Aa20, juntamente com Cry1A.105+Cry2Ab2+Cry1Fa apresentaram menor densidade de lagartas que os demais ($P < 0,05$). Porém, no início do estágio reprodutivo (polinização), onde a infestação foi significativamente maior do que os demais estádios ($F = 33,21$; $gl = 3, 81$; $P < 0,0001$), apenas Cry1Ab+VIP3Aa20 apresentou baixa densidade de lagartas, em média 0,08 ($\pm 0,048$) lagartas por planta. No último estágio avaliado, na fase R2, Cry1Ab+VIP3Aa20 diferiu apenas do híbrido não-Bt⁽¹⁾, o qual apresentou número de lagartas por planta significativamente superior, porém os demais híbridos apresentaram a mesma infestação (Figura 3).

Apesar das diferentes densidades de lagartas observadas entre os híbridos, o número de massas de ovos foi estatisticamente semelhante entre eles ($F = 1,36$; $gl = 8, 24$; $P = 0,2630$). Apenas o estágio fenológico da planta influenciou na quantidade de massas de ovos encontrados, sendo V6/V7 o estágio com maior oviposição ($F = 4,19$; $gl = 3, 81$; $P = 0,0083$), inclusive o único em que os híbridos não-Bt receberam posturas (Figura 4).

3.2.2 Oviposição em híbridos de milho em campo experimental

Apesar da baixa infestação de lagartas de *S. frugiperda*, as plantas não-Bt sofreram maior ataque do que as plantas Bt do estágio V4 até V6 ($F = 13,06$; $gl = 1, 4$; $P = 0,0225$), após esse estágio o dano nos dois híbridos foi igual (Figura 5). No entanto, essa diferença na quantidade de injúria não ocasionou diferença na oviposição, pois o número de massas de ovos encontrados nos dois tipos de plantas ao longo do período vegetativo foi estatisticamente igual ($F = 0,6$; $gl = 1, 4$; $P = 0,4834$) (Figura 6), assim como não houve diferença entre os estágios fenológicos ($F = 2,10$; $gl = 5, 40$; $P = 0,0860$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos de preferência de oviposição com *S. frugiperda* neste estudo, permitiu compreender melhor o comportamento desta espécie em cultivos de milho Bt no Brasil, e seus efeitos na estratégia de alta dose e refúgio.

Em casa de vegetação, as mariposas dentro das gaiolas não preferiram ovipositar em plantas Bt ou não-Bt. Os experimentos com plantas livres de injúrias, com e sem chance de escolha, demonstraram que as mariposas não diferenciam estes dois genótipos de milho. Este resultado, evidencia o fato de que possíveis pistas olfativas utilizadas por estas mariposas, não tenham sido alteradas no milho Cry1Fa em relação a sua linhagem isogênica não-Bt, o que concorda com o Hardke et al. (2012), os quais não detectaram diferença na quantidade e distribuição de massas de ovos de *S. frugiperda* em algodão Bt e algodão não-Bt. Estudos com *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: Noctuidae), demonstram que essa mariposa não apresentou qualquer tendência em ovipositar mais em plantas Bt ou não-Bt em experimentos com escolha (Van Den Berg e Van Wyk, 2007)

Mediante a não preferência de oviposição, investigamos se a presença de larvas de *S. frugiperda* e seus excrementos, além da injúria causada por elas no cartucho do milho, poderiam resultar em deterrência em mariposas acasaladas, em um cenário de escolha para oviposição (Renwick e Radke, 1980; Hilker e Klein, 1989; De Moraes et al., 2001; Coopio et al., 2016). Tal comportamento não foi observado, pois as posturas foram depositadas igualmente em plantas livres de injúrias ou atacadas por coespecíficos, Bt ou não-Bt. Poucos trabalhos de preferência de oviposição de *S. frugiperda* foram conduzidos com a presença de plantas com injúrias, com exceção da pesquisa realizada por Téllez-Rodríguez et al. (2014), os quais encontraram uma forte preferência por plantas Bt Cry1Fa em infestações naturais de *S. frugiperda* à campo, comportamento atribuído à menor injúria observada em plantas Bt em relação ao seu respectivo refúgio (não-Bt).

Apesar das diferenças no perfil de voláteis emitidos por plantas de milho sob herbivoria e esta diferença ser detectada por mariposas acasaladas de *S. frugiperda* em laboratório (Pinto-Zevallos et al., 2016), é importante ressaltar que *S. frugiperda* é uma espécie altamente polífaga (Casmuz et al., 2010), e de acordo com Ramaswamy (1988), adequa-se ao modelo de procura pelo hospedeiro como não seletiva, em que a orientação se dá por pistas olfativas não específicas e a oviposição deve ser dispersa, podendo ainda ser os ovos depositados em outros substratos que não plantas. Tal comportamento foi observado nos experimentos em gaiola, onde posturas foram encontradas nas paredes da gaiola e mesmo nos vasos. Essa deposição de ovos em substratos diferentes de plantas, já foi reportada em populações de *S. frugiperda* nos Estados Unidos (Sparks, 1979).

No estudo de campo realizado no cerrado brasileiro (Oeste da Bahia), com os híbridos comercializados na safra de 2013-2014, dos quais dois eram isolinhas (30F53 e AG 7088) de dois híbridos Bt (*Cry1Fa+Cry1Ab* e *Cry1A.105+Cry2Ab2*), respectivamente, detectou-se diferença entre híbridos quanto a presença de lagartas, porém, o híbrido piramidado *Cry1Ab+VIP3Aa20* foi o único híbrido Bt que apresentou menor número de lagartas por planta do que os híbridos não-Bt e dos demais híbrido Bt em todos os estádios fenológicos avaliados, mesmo na polinização, estágio em que foi detectado o maior número de lagartas por planta. Diante disso, esperaríamos que um menor número de massas de ovos fosse detectado nesse híbrido, caso a hipótese de preferência de oviposição por plantas sem injúria fosse constada, o que não foi observado mesmo no estágio V6/V7 onde foi encontrado o maior número de massas de ovos.

No segundo experimento à campo, realizado em região de mata atlântica (Minas Gerais), em que os dois híbridos utilizados eram isolinhas Bt e não-Bt do mesmo híbrido, e ofertados na mesma proporção, o mesmo padrão foi observado, não houve diferença estatística entre o número de massas de ovos de *S. frugiperda* encontrados nesses dois genótipos de milho,

mesmo nos estádios em que se observou maior injúria em plantas não-Bt (de V4 a V6). Este resultado confirma a não seletividade observada no experimento em campo realizado na Bahia. Vale ressaltar que estes dois experimentos independentes no tempo e realizados em duas ecorregiões com diferenças marcantes quanto ao clima, relevo e vegetação, contaram com infestações naturais de diferentes populações de campo, indicando que este comportamento de não preferência de oviposição deve ser relacionado a espécie e não a populações específicas.

Não preferência também foi reportada em mariposas de *Plutella xylostella* a plantas de repolho que expressam a toxina Cry1Ab (Kumar, 2004) e de canola que expressam Cry1Ac (Ramachandran et al., 1998). Além desses lepidópteros, a espécie *Cnaphalocrocis medinalis* não apresentou nenhuma diferença no número de ovos depositados em arroz expressando o gene cry2a em relação ao seu parental não-Bt (Sun et al., 2013).

Entre os fatores que podem explicar essa não preferência por plantas Bt ou não-Bt, com ou sem injúria, é o fato de *S. frugiperda* depositar um grande número de massas de ovos, com elevado número de ovos, podendo chegar a 1500 ovos por fêmea durante sua vida (Capinera, 1999). Esta relação entre alta fecundidade e menor seletividade foi recentemente demonstrada em borboletas da família Pieridae (Jaumann e Snell-Rood, 2017), onde fêmeas acasaladas de *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), apresentaram uma redução no número de ovos produzidos quando foram mais seletivas na escolha do local de oviposição, evitando coespecíficos adultos presentes em folhas de repolho. Portanto, é possível que fêmeas de *S. frugiperda* sejam menos seletivas quanto ao local de oviposição, por depositarem um grande número de ovos ao longo de seu ciclo de vida.

Um outro fator que pode explicar a não seletividade maternal nesta espécie é a capacidade de dispersão das lagartas após a eclosão, que pode chegar em média a 1,1 m distante do local da postura em milho (Pannuti et al., 2016) e até 2,4 plantas distantes da planta infestada em algodão (Ali et al., 1990), o que facilitaria a busca por hospedeiro adequado pelas lagartas,

sendo que a escolha do local de oviposição pela mariposa não seria crucial no desenvolvimento larval.

Em resumo os experimentos em casa de vegetação e campo demonstraram que *S. frugiperda* não discrimina milhos Bt de não-Bt para a oviposição. Além disso, que as injúrias ou presença de coespecíficos nas plantas não interferem na escolha para a oviposição. Este resultado é importante porque uma possível preferência de oviposição em plantas Bt comprometeria fortemente a estratégia alta dose e refúgio, por aumentar a pressão de seleção da população a uma determinada cultura Bt, aumentando o número de indivíduos resistentes campos Bt, reduzindo a efetividade do refúgio.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os experimentos em casa de vegetação neste trabalho demonstraram que mariposas de uma população de campo de *S. frugiperda* não diferenciam milho que expressa a toxina Bt de seu híbrido isogênico para escolha do local de oviposição. Além disso, as mariposas não evitam milho previamente infestado por coespecíficos como substrato para oviposição. Os experimentos conduzidos a campo em duas ecorregiões brasileiras evidenciam que não há preferência de oviposição em populações de campo do inseto em estudo. Estes resultados são positivos do ponto de vista do manejo da resistência, pois se a escolha do local para oviposição é aleatória, a pressão de seleção exercida pela cultura Bt não será aumentada com a presença da área de refúgio.

Tabela 1 - Híbridos de milho utilizados no experimento de preferência de oviposição em campo. São Desidério, Bahia.

Nome comercial	Proteína Bt
30F53	não-Bt ⁽¹⁾
AG 7088	não-Bt ⁽²⁾
BG 7037 HX	Cry1Fa
FORMULA TL	Cry1Ab
30F53 YH	Cry1Fa+Cry1Ab
AG 7088 VT PRO2	Cry1A.105+Cry2Ab2 ⁽¹⁾
DKB 340 PRO	Cry1A.105+Cry2Ab2 ⁽²⁾
IMPACTO VIPTERA	Cry1Ab+VIP3Aa20
MG 562 PW	Cry1A.105+Cry2Ab2+Cry1Fa

Tabela 2 – Mortalidade de *Spodoptera frugiperda* em função da concentração-resposta à toxina Cry1Fa.

População	N ^c	Inclinação	CL ₅₀ ^a (IC 95%)	χ^2	P	RR ^b
Lab	478	2,33 ± 0,26	89,87 (58,9-122,7)	17,66	0,09	-
Viçosa	476	0,12 ± 0,93	>10.000	4,87	0,43	>111,27

^a concentração letal em ng (nanogramas)/cm² de Cry1Fa na superfície da dieta, com respectivo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

^b RR – Razão de resistência, CL₅₀ Viçosa/CL₅₀ Lab.

^c número de indivíduos testados.

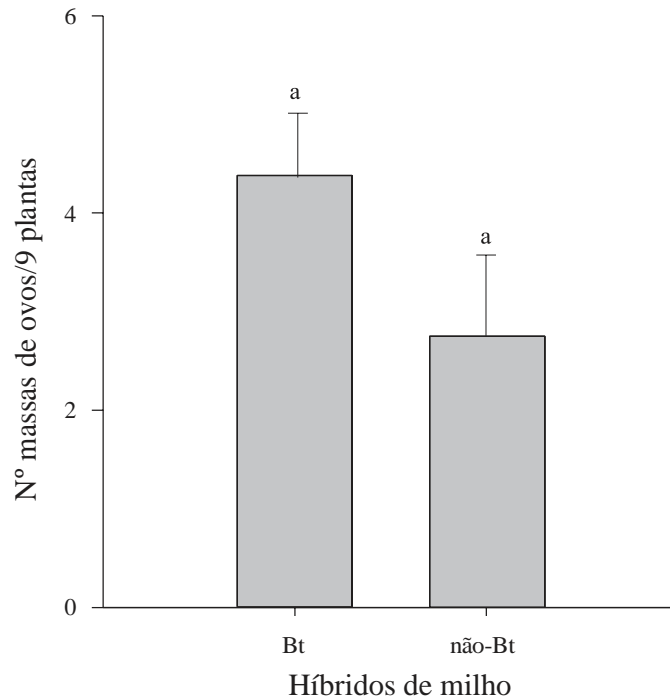


Figura 1 – Oviposição de fêmeas acasaladas de *S. frugiperda* sem chance de escolha em plantas Bt e não-Bt em casa de vegetação. O número de massas de ovos foram comparados pelo teste F ($n = 8$; $P = 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

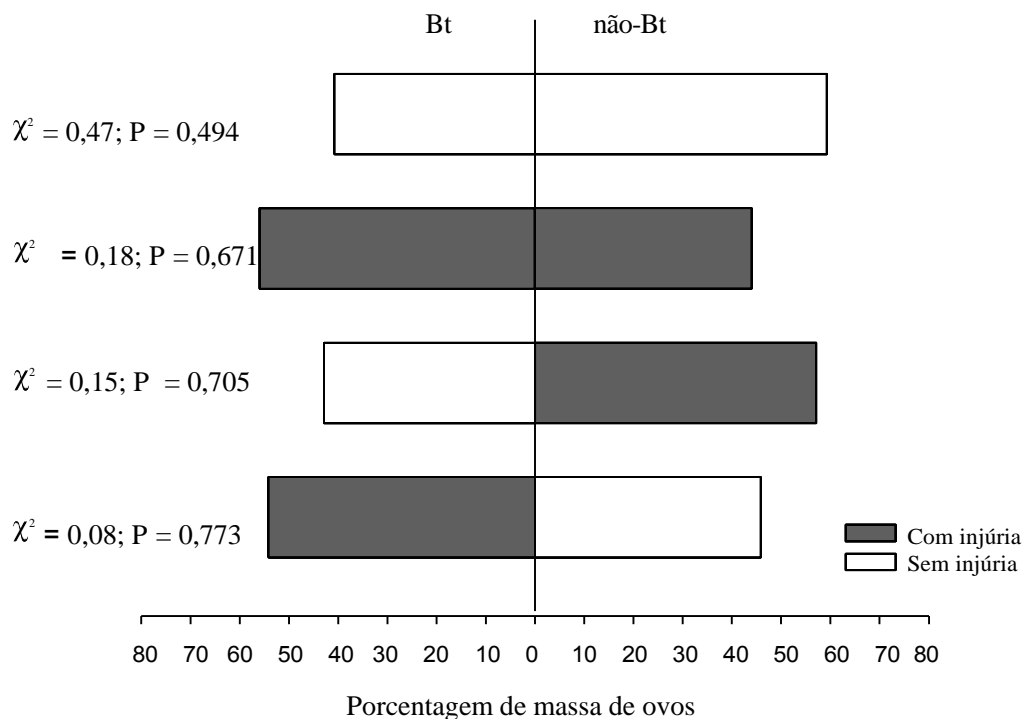


Figura 2 – Oviposição de fêmeas acasaladas de *S. frugiperda* com chance de escolha em plantas milho Bt e não-Bt, sem e com injúria causada por coespecíficos em casa de vegetação. O número de massas de ovos foram comparados pelo teste de Qui-quadrado ($n=8$; $p=0,05$). Dados mostrados são porcentagens de ovos em cada tipo de milho.

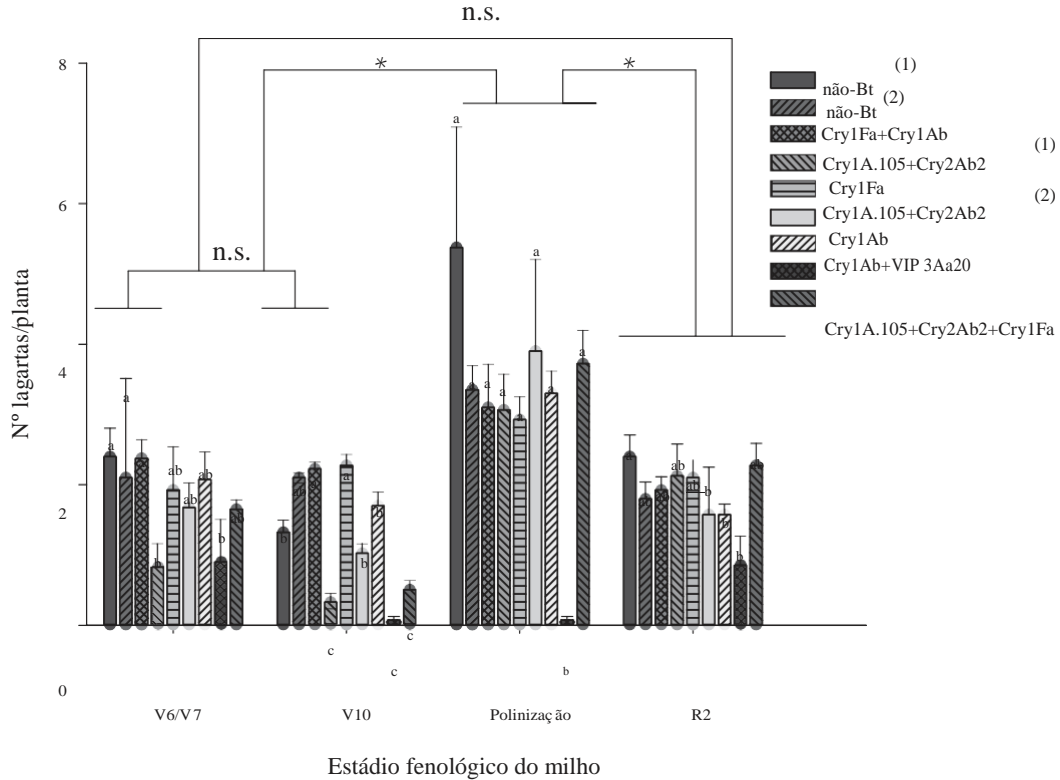


Figura 3 – Infestação por lagartas de *S. frugiperda* em quatro estádios fenológicos de híbridos de milho Bt e não-Bt. Dados são médias ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo estádio fenológico não diferem entre si segundo teste t e $P > 0,05$. Barras com asterisco indicam diferença significativa entre os estádios fenológicos. N.S.= não significativo.

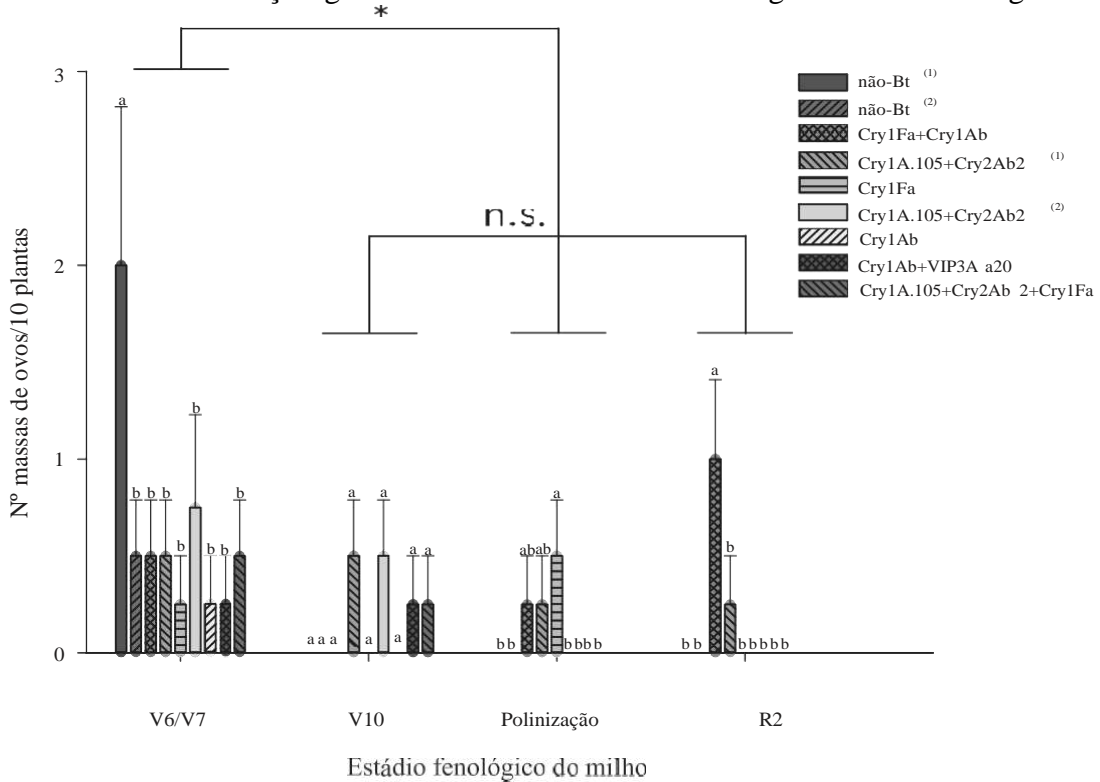


Figura 4 – Oviposição de mariposas de *S. frugiperda* em quatro estádios fenológicos de híbridos de milho Bt e não-Bt. Dados são médias ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo estádio fenológico não diferem entre si segundo teste t e $P > 0,05$. Barras com asterisco indicam diferença significativa entre os estádios fenológicos. N.S.= não significativo.

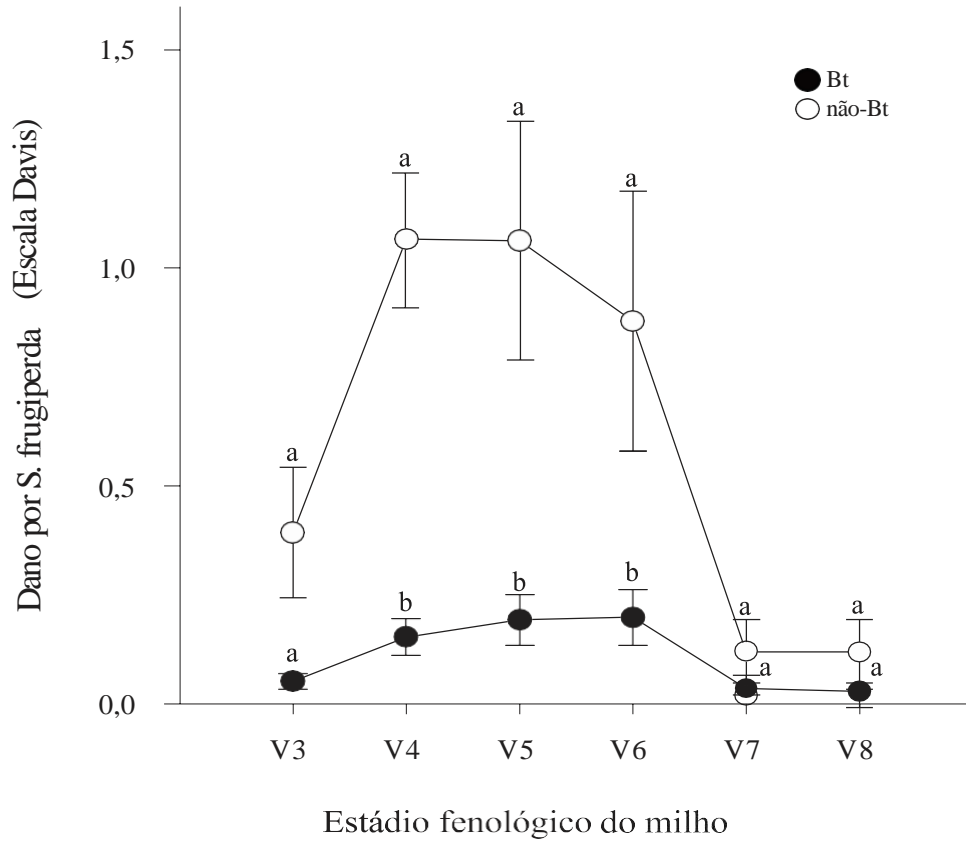


Figura 5 – Dano causado por *S. frugiperda* em plantas Bt e não-Bt durante a fase vegetativa de crescimento de milho. Dados são médias \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra dentro do mesmo estágio fenológico não diferem entre si segundo o teste t e $P < 0,05$.

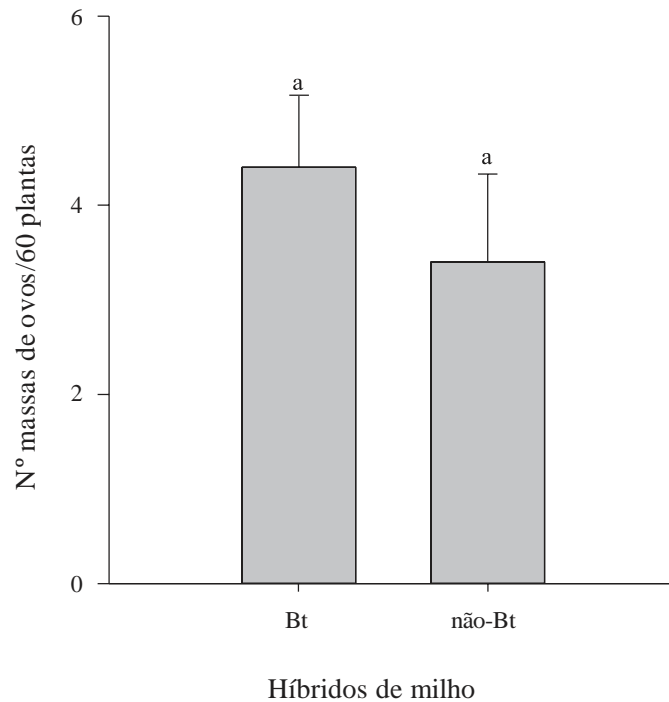


Figura 6 – Oviposição de *S. frugiperda* em milho Bt e não-Bt do início ao final do período vegetativo de milho. Dados são médias \pm erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si segundo o teste t e $P < 0,05$.

6. REFERÊNCIAS

- ALI, A.; LUTTRELL, R. G.; PITRE, H. N. Feeding sites and distribution of Fall armyworm. **Environmental Entomology**, v. 19, n. 4, p. 1060–1067, 1990.
- CAPINERA, J. L. **Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. Gainesville, FL: 1-6 p. 1999.
- CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 69, n. 3-4, p. 209-231, 2010.
- COAPIO, G. G. et al. Herbivore damage and prior egg deposition on host plants influence the oviposition of the generalist moth *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 6, p. 2364-2372, 2016.
- CRUZ, J. C. Cultivo do Milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. Disponível em: < http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm >. Acesso em: Dezembro de 2016.
- DAVIS, F. M.; WILLIAMS, W. P.; WISEMAN, B. R. Methods used to screen maize for and to determine mechanisms of resistance to the Southwestern Corn Borer and Fall Armyworm. Proceedings, toward insect resistant maize for the third world. **International Symposium on methodologies for developing host plant resistance to maize insects**, Mexico. p.101-108, 1989.
- DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C.; TUMLINSON, J. H. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 577-580, 2001.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150-158, 2014.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
- GBUR, E. E. et al. **Analysis of generalized linear mixed models in the agricultural and natural resources sciences**. Madison, WI, USA: 2012.
- GLASER, J. A.; MATTEN, S. R. Sustainability of insect resistance management strategies for transgenic Bt corn. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1-2, p. 45-69, 2003.
- GOULD, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **Bioscience**, v. 38, n. 1, p. 26-33, 1988.
- _____. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- HARDKE, J. T.; LEONARD, B. R.; TEMPLE, J. H. Fall Armyworm oviposition on cotton plants expressing Wide Strike (TM) Bollgard (R), and Bollgard II (R) Cry Proteins. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 3, p. 295-303, 2012.

HILKER, M.; KLEIN, B. Investigation of oviposition deterrent in larval frass of *Spodoptera littoralis* (Boisd). **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 3, p. 929-938, 1989.

HUANG, F. et al. Cry1F resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. 10, 2014.

JAMES, C. **20th Anniversary (1996 to 2015) of the global commercialization of biotech crops and biotech crop highlights in 2015. ISAAA Brief No. 51.** Ithaca, NY 2015.

JAUMANN, S.; SNELL-ROOD, E. C. Trade-offs between fecundity and choosiness in ovipositing butterflies. **Animal Behaviour**, v. 123, p. 433-440, 2017.

KASTEN JR., P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**. 53: 68-78 p. 1978.

KUMAR, H. Orientation, feeding, and ovipositional behavior of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), on transgenic cabbage expressing Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Environmental Entomology**, v. 33, n. 4, p. 1025-1031, 2004.

LEITE, N. A. et al. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in a Brazilian strain of Fall Armyworm. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v. 158, n. 3, p. 236- 247, 2016.

MARÇON, P. et al. Baseline susceptibility of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 2, p. 279-285, 1999.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.

PANNUTI, L. E. R. et al. Plant-to-plant movement of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize (*Zea mays*). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 3, p. 1125-1131, 2016.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; STRAPASSON, P.; ZARBIN, P. H. G. Herbivore-induced volatile organic compounds emitted by maize: Electrophysiological responses in *Spodoptera frugiperda* females. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 70-74, 2016.

RAMACHANDRAN, S. et al. Survival, development, and oviposition of resistant Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 6, p. 1239-1244, 1998.

RAMASWAMY, S. B. Host finding by moths: Sensory modalities and behaviours. **Journal of Insect Physiology**, Great Britain, v. 34, n. 3, p. 235-249, 1988.

RENWICK, J. A. A.; RADKE, C. D. An oviposition deterrent associated with frass from feeding larvae of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 9, n. 3, p. 318-320, 1980.

ROBERTSON, J. L. et al. Natural variation a complication factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 1-10, 1995.

_____. **Bioassays with Arthropods**. 2nd. CRC Press, 2007.

SANTOS-AMAYA, O. F. et al. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10, 2015.

_____. Genetic basis of Cry1F resistance in two Brazilian populations of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Crop Protection**, v. 81, p. 154-162, 2016.

SAS INC, S. I. **Base SAS® 9.3 Procedures Guide: Statistical Procedures**. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2011.

SIGNORETTI, A. G. C.; PENAFLORES, M.; BENTO, J. M. S. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), female moths respond to herbivore-induced corn volatiles. **Neotropical Entomology**, v. 41, n. 1, p. 22-26, 2012.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the Fall Armyworm. **The Florida Entomologist**, Tifton, GA, v. 62, n. 2, p. 82-87, 1979.

SUN, X. et al. Transgenic Bt rice does not challenge host preference of the target pest of Rice Leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 9, 2013.

TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P. et al. Strong oviposition preference for Bt over non-Bt maize in *Spodoptera frugiperda* and its implications for the evolution of resistance. **BMC Biol**, v. 12, p. 48, 2014.

VAN DEN BERG, J.; VAN WYK, A. The effect of Bt maize on *Sesamia calamistis* in South Africa. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v. 122, n. 1, p. 45-51, 2007.

VILARINHO, E. C. et al. Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in maize in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 94, n. 3, p. 480-488, 2011.