

**OSCAR FERNANDO SANTOS AMAYA**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A Cry1Fa EM POPULAÇÕES  
BRASILEIRAS DE *Spodoptera frugiperda***

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  
2014

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

T

S237c  
2014 Santos Amaya, Oscar Fernando, 2014-  
CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A Cry1Fa EM  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Spodoptera frugiperda* /  
Oscar Fernando Santos Amaya. – VIÇOSA, MG, 2014.  
ix, 89 : il. ; 29 cm.

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

1. Lagarta-do-cartucho. 2. culturas transgênicas Bt.  
3. Dominância. 4. Estabilidade da resistência. 5. Frequência  
alélica de resistência. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Animal. Doutorado em Entomologia.  
II. Título.

T 595.781

OSCAR FERNANDO SANTOS AMAYA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA A Cry1Fa EM  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Spodoptera frugiperda***

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

APROVADA: 8 de Setembro de 2014.

---

Júlio Cláudio Martins

---

Eugênio Eduardo de Oliveira

---

Weyder Cristiano Santana

---

Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Coorientador)

---

Eliseu José Guedes Pereira  
(Orientador)

A meus pais e a minha avô, que com o exemplo de vida me apresentaram à importância da honestidade e persistência. A meus irmãos pelo apoio incondicional em todos os momentos. A minha namorada, por todo o incentivo, carinho e companheirismo.

Adeus por tudo.

Dedico

**A vida é igual andar de bicicleta.**

**Pra manter o equilíbrio é preciso se manter em movimento.**

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao seu Departamento de Entomologia, pela oportunidade de conclusão do doutorado neste programa de pós-graduação.

Ao Prof. Eliseu José Guedes Pereira pela orientação durante estes quatro anos de doutorado e ao Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes pela co-orientação e por facilitar meu recrutamento pelo Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG).

Aos colegas do Laboratório de Interação Inseto-Planta pela amizade e colaboração durante estes quatro anos de convivência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

À DuPont Pioneer pelo financiamento, auxílio na coleta de insetos e fornecimento de parte dos materiais para condução desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>Introdução</b> .....	1
<b>Objetivos da investigação</b> .....	3
Objetivo Geral.....	3
Objetivos específicos.....	3
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	4
<b>Capítulo 1: Base genética da resistência a Cry1Fa em duas populações brasileiras de <i>Spodoptera frugiperda</i></b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMO</b> .....	7
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	10
Origem e manutenção dos insetos.....	10
Seleção para resistência a Cry1Fa.....	11
Quantificação da resistência.....	13
Análise da herança.....	15
<b>RESULTADOS</b> .....	18
Seleção para resistência a Cry1Fa.....	18
Quantificação da resistência.....	18
Análise da herança da resistência.....	19
<b>DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>Capítulo 2: Custo adaptativo associado à resistência de Cry1Fa na lagarta-do- cartucho <i>Spodoptera frugiperda</i></b> .....	<b>37</b>
<b>RESUMO</b> .....	37
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	38
<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	40
Origem e manutenção dos insetos.....	40
Obtenção de linhagem resistente isogênica à população susceptível por introgressão.....	41
Tempo de desenvolvimento, peso de pupa e taxa de crescimento.....	43

Fecundidade e número de descendentes produzidos.....	43
Experimentos de tabela de vida.....	44
Taxa de respiração larval.....	44
Estabilidade da resistência.....	44
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
Obtenção de linhagem resistente isogênica à população susceptível por introgressão.....	46
Tempo de desenvolvimento, peso de pupa e taxa de crescimento.....	46
Fecundidade e número de descendentes produzidos.....	47
Taxa de respiração larval.....	48
Estabilidade da resistência.....	48
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo 3: F1 screen para detecção de alelos de resistência à toxina Cry1Fa em populações brasileiras da lagarta-do-cartucho <i>Spodoptera frugiperda</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>63</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
Origem e manutenção dos insetos.....	66
Suscetibilidade das populações a Cry1Fa.....	68
Concentração diagnóstica de Cry1Fa para uso no F1 <i>screen</i> .....	69
F1 <i>screen</i> .....	69
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
Suscetibilidade das populações a Cry1Fa.....	72
F1 <i>screen</i> .....	73
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>87</b>

## RESUMO

SANTOS AMAYA, Oscar Fernando, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2014. **Caracterização da resistência a Cry1Fa em populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda***. Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.

Para retardar a adaptação genética das pragas-alvo às culturas transgênicas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), é importante conhecer a base genética da resistência e o nível de suscetibilidade da espécie-alvo a determinada proteína. Portanto, para caracterizar a resposta evolutiva de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) à pressão de seleção exercida pela toxina Bt Cry1Fa, expressa em plantas de milho transgênico, e conhecer a frequência do alelo de resistência no campo, foram selecionadas para altos níveis de resistência a essa toxina duas populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões de Brasil. Com 11 gerações de seleção em laboratório, níveis de resistência superiores a 183 vezes evoluíram nas duas populações estudadas, os quais possibilitam aos insetos completarem o ciclo de vida em plantas de milho Cry1Fa. Bioensaios concentração-resposta com progênies geradas de cruzamentos recíprocos entre os insetos suscetíveis e resistentes indicaram que a herança da resistência a Cry1Fa é recessiva, autossômica e herdada sem efeito maternal. Além disso, bioensaios comparativos do retrocruzamento entre a progênie F1 e os pais resistentes revelaram que a resistência é conferida por um único *locus*. Esses resultados suportam alguns dos pressupostos da estratégia em uso para o manejo da resistência ao milho Cry1Fa. Entretanto, a sobrevivência dos heterozigotos nas plantas transgênicas foi superior a 5%, indicando que o milho Cry1Fa TC1507 parece não ser de alta dose para *S. frugiperda*. Além disso, as comparações de parâmetros do ciclo de vida e reprodutivos entre insetos suscetíveis e resistentes indicaram a ausência de forte custo adaptativo associado à resistência a Cry1Fa para essas duas linhagens resistentes de *S. frugiperda*, o que também foi evidenciado nos experimentos de taxa de respiração larval e estabilidade da resistência. Esses resultados junto com a alta frequência de alelos resistentes e baixa suscetibilidade das populações coletadas nas principais regiões produtoras de milho do país sugerem que populações de *S.*

*frugiperda* tem alto potencial para desenvolver resistência de campo ao milho Cry1Fa e outras culturas transgênicas Bt no Brasil.

## ABSTRACT

SANTOS AMAYA, Oscar Fernando, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2014. **Characterization of resistance to Cry1Fa in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda***. Advisor: Eliseu José Guedes Pereira. Co-advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes.

To delay genetic adaptation of target pests to transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins, it is important to know the genetic basis of resistance and the level of susceptibility of the target species to a given protein. Therefore, to characterize the evolutionary response of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to selection pressure exerted by the Bt Cry1Fa toxin expressed in transgenic maize plants and to estimate the frequency of the resistance allele in the field, two populations of *S. frugiperda* collected in different regions of Brazil were selected for high levels of resistance to Cry1Fa. After 11 generations of selection significant levels of resistance to Cry1Fa were obtained (> 183 fold) in the populations studied, which enabled the insects to complete their life cycle in Cry1Fa corn. Concentration-response bioassays with progenies generated from reciprocal crosses between resistant and susceptible insects indicated that the inheritance of Cry1Fa resistance is autosomal, recessive and without maternal effects, and backcross of the F<sub>1</sub> progeny with the parental resistant strain revealed that the resistance is conferred by a single locus. These results support some of the assumptions of the strategy in use for resistance management of Cry1Fa corn, but the survival of heterozygotes in the transgenic plants was higher than 5%, indicating that apparently the Cry1Fa corn (TC1507) is not high dose for *S. frugiperda*. Furthermore, comparison of life history traits and population growth rates for susceptible and resistant insects indicated absence of strong fitness costs associated with the resistance in these two resistant strains of *S. frugiperda*, which was also evident in experiments of larval respiration rate and stability of resistance. These results together with the high frequency of resistance alleles and the low susceptibility of fall armyworm populations collected in major corn producing regions in the country suggest that populations of *S. frugiperda* has high potential to develop field resistance to Cry1Fa corn and other transgenic Bt crops in Brazil.

## Introdução

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga do milho na região tropical das Américas (Buntin et al., 2004; Hardke et al., 2011), não somente pelos danos provocados, mas especialmente pela dificuldade de seu controle (Waquil, 2007) e adaptação a diversas classes de inseticidas (Omoto & Diez-Rodríguez, 2001; Siebert et al., 2008a). A partir de 2008/2009 no Brasil, híbridos de milho contendo o evento TC1507 que expressa a forma ativa da toxina Cry1Fa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) foram comercializados para controle da lagarta-do-cartucho (Céleres, 2012). Espera-se, que semelhante ao ocorrido em outros países, a adoção dessa nova ferramenta diminua o uso de inseticidas sintéticos de amplo espectro de ação (James, 2011), até recentemente a principal medida de controle dessa praga no Brasil (Costa et al., 2005), e conseqüentemente reduza os riscos para os agricultores e o meio ambiente (Cattaneo et al., 2006; Showalter et al., 2009). No entanto, a evolução da resistência em populações da lagarta-do-cartucho ameaça o sucesso da tecnologia, assim como já foi relatado em outras regiões e no Brasil (Storer et al., 2010; Tabashnik et al., 2013; Faria et al., 2014).

Para atrasar o desenvolvimento de resistência em cultivos Bt, as agências governamentais dos EUA e Canadá adotaram o plano de manejo da resistência, conhecido como a estratégia de “alta dose refugio” (Gould, 1998), sendo posteriormente complementado com a combinação (piramidação) de mais de uma toxina com diferentes sítios de ação às pragas alvos em algumas plantas (Zhao et al., 2003). Algumas pressuposições fundamentais para o sucesso dessa estratégia são: herança da resistência recessiva e monogênica, baixa frequência inicial de alelos de resistência ( $< 10^{-3}$ ), custos adaptativos associados à resistência e abundância de plantas não-Bt perto das culturas Bt, facilitando acasalamentos aleatórios entre indivíduos resistentes e suscetíveis (Tabashnik, 1994; Gould, 1998; Carrière & Tabashnik, 2001).

Recentemente no Brasil tem havido reclamações de falhas de controle de *S. frugiperda* em lavouras de alguns híbridos de milho transgênico Bt e já há algumas evidências de resistência no campo (Farias et al., 2014). Teoricamente, as falhas de controle nas diferentes regiões produtoras de milho podem estar ligadas ao fato de a base genética da herança da resistência de *S. frugiperda* a toxinas de Bt poderia não se ajustar a algumas das premissas da estratégia “alta dose refugio” (Tabashnik, 1994; Gould, 1998; Carrière & Tabashnik, 2001). Em vista disso, são necessários estudos que caracterizem a base genética da resistência em populações de *S. frugiperda*, que permitam o desenvolvimento e aprimoramento de estratégias de manejo da resistência desta espécie no país. Uma etapa-chave para avaliar algumas das premissas da estratégia “alta dose refugio” é ter disponíveis populações de laboratório com altos níveis de resistência a uma determinada toxina (Pereira et al., 2008a; Pereira et al., 2008b). A disponibilidade de populações resistentes permite análise da herança da resistência (Alves et al., 2006), determinação das bases bioquímicas e fisiológicas (Siqueira et al., 2006; Jurat-Fuentes et al., 2011), a avaliação de custos adaptativos associados à resistência (Velez et al., 2013; Jakka et al., 2014) e a obtenção de estimativas da frequência de alelos de resistência em populações de campo (Gould et al., 1997).

Assim, este trabalho de tese visou caracterizar a resistência à toxina Cry1Fa expressa no milho contendo o evento TC1507 em populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil. Os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento da resposta dessa espécie à pressão de seleção exercida pelas toxinas Bt expressas nas plantas transgênicas, fornecendo dados que auxiliarão na escolha de estratégias adequadas ao manejo da resistência dessa espécie-praga no Brasil.

## **Objetivos da investigação**

### **Objetivo Geral**

Selecionar populações de *S. frugiperda* com altos níveis de resistência à toxina Cry1Fa de *B. thuringiensis* que permitam caracterizar a base genética da resistência e monitorar a suscetibilidade em populações de *S. frugiperda* de diferentes regiões produtoras de milho no Brasil a Cry1Fa.

### **Objetivos específicos**

- 1) Selecionar em laboratório diferentes linhagens de *S. frugiperda* para altos níveis de resistência a Cry1Fa.
- 2) Quantificar o nível de resistência de *S. frugiperda* usando bioensaios com toxina purificada Cry1Fa em dieta artificial e plantas de milho transgênicas Cry1Fa.
- 3) Determinar a base genética da resistência de *S. frugiperda* (ou seja, se monogênica ou poligênica; autosomal ou ligada ao sexo; recessiva ou dominante).
- 4) Identificar potencial custo adaptativo da resistência no desempenho fisiológico e reprodutivo dos insetos heterozigotos e homozigotos resistentes.
- 5) Estimar a frequência de alelo (s) de resistência em populações de campo de *S. frugiperda* usando a população selecionada de laboratório (triagem de F1).

## REFERÊNCIAS

- Alves, A.P.; Spencer, T.A.; Tabashnik, B.E.; Siegfried, B.D. Inheritance of resistance to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 494-501, 2006.
- Buntin, G. D.; All, J. N.; Lee, R. D.; Wilson, D. M. Plant-incorporated *Bacillus thuringiensis* resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera:Noctuidae) in corn. **Journal Economic Entomology**, v. 97, p. 1603-1611, 2004.
- Carrière, Y.; Tabashnik, B.E. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 268, p. 1475-1480, 2001.
- Cattaneo, M.G.; Yafuso, C.; Schmidt, C.; Huang, C.Y.; Rahman, M.; Olson, C.; Eilers- Kirk, C.; Orr, B.J.; Marsh, S.E.; Antilla, L.; Dutilleul, P.; Carriere, Y. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 103, p. 7571-7576, 2006.
- Céleres. 2012. **2nd follow-up on agricultural biotechnology adoption for the 2012/13 crop**. Disponível em: <[http://www.celeres.com.br/post.php?p\\_65andlang\\_pt](http://www.celeres.com.br/post.php?p_65andlang_pt)>. Accessed:august 2014.
- Costa, M.A.G.; Grützmacher, A.D.; Martins, J.F. da S.; Costa, E.C.; Storch, G.; Stefanello Júnior, G.J. Eficácia de diferentes inseticidas e de volumes de calda no controle de *Spodoptera frugiperda* nas culturas do milho e sorgo cultivados em várzea. **Ciência Rural**, v. 35, p.1234-1242, 2005.
- Faria, J.R.; Andow, D.A.; Horikoshi, R.J.; Sorgatto, R.J.; Fresia, P.; Dos Santos, A.C.; Omoto, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p.150-158, 2014.
- Gould, F.; Anderson, A.; Jones, A.; Sumerford, D.; Heckel, D.G.; Lopez, J.; Micinski, S.; Leonard, R.; Laster, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 94, p. 3519-3523, 1997.
- Gould, F. 1998.Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annul Review Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- Hardke, J. T.; Leonard, B. R.; Huang, F.; Jackson, R. E. Damage and survivorship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic field corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. **Crop Protection**, v. 30, p. 168-172, 2011.
- James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA Brief No. 43. Ithaca, New York: ISAAA, 2011.

- Jakka, S.R.K.; Knight, V.R.; Jurat-Fuentes, J.L. Fitness Costs Associated with Field-Evolved Resistance to Bt Maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomology**, v. 107(1), p. 342-351, 2014.
- Jurat-Fuentes, J.L.; Karumbaiah, L.; Jakka, S.R.K.; Ning, C.; Liu, C.; Wu, K.; Jacson, J.; Gould, F.; Blanco, C.; Portilla, M.; Perera, O.; Adang, M. Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Plos One**, v. 6, p. 1-7, 2011.
- Omoto, C.; Diez-Rodríguez, G.I. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 311-316, 2001.
- Pereira, E.J.G.; Lang, B.A.; Storer, N.P.; Siegfried, B.D. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 126, p. 115-121, 2008a.
- Pereira, E.J.G.; Storer, N.P.; Siegfried, B.D. Inheritance of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, p. 621-629, 2008b.
- Showalter, A.M.; Heuberger, S.; Tabashnik, B.E.; Carriere, Y.; Coates, B. 2009. A primer for using transgenic insecticidal cotton in developing countries. **Journal of Insect Science**, v. 9, p. 22, 2009.
- Siebert, M.; Babcock, J. M.; Nolting, S.; Santos, A. C.; Adamczyk, J. J.; Neese, P. A.; King, J. E.; Jenkins, J. N.; McCarty, J.; Lorenz, G. M.; Fromme D. D.; Lassiter, R.B. Efficacy of Cry1F insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 91, p. 555-565, 2008a.
- Siqueira, H.A.A.; Gonzalez-Cabrera, J.; Ferré, J.; Flannagan, R.; Siegfried, B.D. Analyses of Cry1Ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5318-5324, 2006.
- Storer, N.P.; Babcock, J.M.; Schlenz, M.; Meade, T.; Thompson, G.D.; Bing, J.W.; Huchaba, R.M. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1031-1038, 2010.
- Tabashnik, B. E.1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.
- Tabashnik, B.E.; Brévault, T.; Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology**, v. 31 (6), p. 510-521, 2013.
- Velez, A.M.; Spencer, T.A.; Alves, A.P.; Crespo, A.L.B.; Siegfried, B.D. Fitness of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, doi: 10.1111/jen.12092, 2013.

Waquil, J.M. **Manejo fitossanitário e ambiental: milho transgênico *Bt* e resistência das plantas ao ataque da lagarta-do-cartucho.** 2007. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_1/manfito/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/manfito/index.htm)>. Acesso em: 22 agosto. 2014.

Zhao, J.Z.; Cao, J.; Li, Y.X.; Collins, H.L.; Roush, R.T.; Earle, E.D.; Shelton, A.M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1493-1497, 2003.

## Capítulo 1: Base genética da resistência a Cry1Fa em duas populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda*

### RESUMO

O milho transgênico que expressa a proteína inseticida Cry1Fa, derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), tornou-se numa ferramenta muito utilizada para manejo de *Spodoptera frugiperda* no Brasil. Para avaliar alguns dos pressupostos indicados para o uso da estratégia “alta dose/refugio”, duas populações de *S. frugiperda* derivadas de coletas em cinco locais no Brasil foram selecionadas para altos níveis de resistência a Cry1Fa usando folhas de milho TC1507. Após onze gerações de seleção, níveis de resistência superiores a 183 vezes foram conseguidos nas duas populações estudadas, os quais possibilitam aos insetos completarem o ciclo de vida em plantas de milho Cry1Fa. Bioensaios com a toxina purificada e expressa nas plantas transgênicas em casa de vegetação mostraram que a herança da resistência nas duas populações é recessiva, herdada de forma autossômica, sem efeito maternal e conferida por um único locus (monogênica). Além disto, em casa de vegetação o desempenho das populações resistentes em plantas de milho TC1507 indica que a resistência é completa e que mais 5% dos indivíduos heterozigotos sobrevivem nas plantas transgênicas. O padrão da herança da resistência recessiva suporta esse pressuposto da estratégia em uso para o manejo da resistência ao milho Cry1Fa. Porém nossos resultados indicam que o milho Cry1Fa não expressa alta dose para *S. frugiperda* como evidenciado pela sobrevivência de parte dos heterozigotos nas plantas transgênicas. Além disso, a rápida resposta à seleção indica que o alelo de resistência a Cry1Fa deve estar presente em populações de campo de *S. frugiperda* e, em conjunto, esses resultados sugerem que populações de *S. frugiperda* têm alto potencial para desenvolver resistência em campo ao milho Cry1Fa e outras culturas transgênicas Bt no Brasil.

**Palavras-chave:** lagarta-do-cartucho, *Bacillus thuringiensis*, manejo da resistência, culturas transgênicas Bt, herança, dominância.

## INTRODUÇÃO

Em 2009, o milho transgênico que expressa a proteína Cry1Fa de *B. thuringiensis* var *aizawai* (evento TC1507) foi pela primeira vez comercializado no Brasil para o controle de *Spodoptera frugiperda*, considerada sua principal praga (Cruz *et al.*, 1999). Essa tecnologia foi anteriormente liberada nos Estados Unidos, onde demonstrou controle satisfatório de *S. frugiperda* (Siebert *et al.*, 2008a; 2008b) e também maior eficácia do que os híbridos que expressam Cry1Ab (Buntin *et al.*, 2000; Buntin 2008, Hardke *et al.*, 2011). Devido à dificuldade de controle da lagarta do cartucho com inseticidas (Siebert *et al.*, 2008a; Yu, 1991; Omoto & Diez-Rodríguez, 2001), este e outros híbridos de milho Bt foram rapidamente adotados no Brasil (Galvão, 2012).

Desde a liberação comercial das culturas transgênicas, a preocupação tem sido que exposições prolongadas e extensivas às toxinas de *B. thuringiensis* nas plantas poderiam levar a resistência em populações de pragas-alvo, reduzindo a utilidade dessa tecnologia para manejo de pragas (Gould, 1988, 1994, 1998, Van Rie 1991, Mallet & Porter, 1992, Roush 1994). No caso de *S. frugiperda*, foi documentado um caso de resistência ao milho transgênico que expressa a proteína Cry1Fa em Porto Rico (Storer *et al.*, 2010). Isso aconteceu com apenas quatro anos de comercialização, tornando-se o caso mais rápido de evolução de resistência a uma cultura Bt, e o primeiro de resistência que levou à retirada de uma cultura Bt do mercado (Tabashnik *et al.*, 2009).

Assim, o desafio de implantar estratégias de manejo eficientes para reduzir o risco da evolução da resistência em populações de *S. frugiperda* surge como um componente importante do uso de culturas de milho Bt no Brasil. Nos Estados Unidos, o sucesso atual na preservação da susceptibilidade de algumas das principais pragas do algodão e milho é atribuída à implementação da estratégia "alta dose refugio" (Huang *et al.*, 2011). A estratégia baseia-se em que os raros indivíduos homocigotos resistentes que sobrevivem nas culturas Bt, acasalem-se com os indivíduos homocigotos susceptíveis advindos das áreas compostas por plantas não-Bt (refugio). Uma premissa fundamental para o sucesso dessa estratégia é que a

toxina expressa pela planta seja capaz de matar todos (mais do que o 95%) os descendentes (heterozigotos) gerados dos cruzamentos entre insetos resistentes e suscetíveis, impedindo assim que esses indivíduos heterozigotos repassem os alelos de resistência à seguinte geração (Gould, 1998; Tabashnik, 1994; Tabashnik et al., 2004). Outras condições para o sucesso dessa estratégia são: herança da resistência recessiva e monogênica, baixa frequência inicial de alelos resistentes, abundância de plantas não-Bt perto das culturas Bt, facilitando acasalamentos aleatórios entre indivíduos resistentes e suscetíveis, custos adaptativos e resistência incompleta (Tabashnik, 1994; Gould, 1998; Carrière & Tabashnik, 2001; Tabashnik et al., 2009).

Embora Tabashnik et al., (2003) destacaram que a resistência desenvolvida em laboratório não poderia necessariamente prever a resistência de campo, os modelos da estratégia "alta dose refugio" foram baseados em linhagens de pragas selecionadas em laboratório sob pressuposto de uma herança da resistência uniformemente recessiva. Esse pressuposto foi observado na população de *S. frugiperda* que desenvolveu altos níveis de resistência em condições de campo em Porto Rico (Storer et al., 2010). Contudo, em algumas das outras espécies de lepidópteros que desenvolveram resistência em campo, o padrão de resistência recessiva não se cumpriu (Tabashnik et al., 2009; Nair et al., 2010; Campagne et al., 2013). O anterior demonstra que a resposta à pressão de seleção em cada praga é diferente, sendo que em alguns casos pode até variar dentro da mesma espécie (Bourguet et al., 1997), dependendo das condições ambientais (Bourguet et al., 2000). Assim se faz necessário, para manejo da resistência a realização de estudos que avaliem a diversidade potencial da resposta adaptativa de cada espécie praga alvo (Tabashnik et al., 1998; Baxter et al., 2005; Heckel et al., 2007) em seu lugar de ocorrência.

No Brasil tem havido reclamações de falhas de controle de *S. frugiperda* em lavouras de milho transgênico. Teoricamente, as falhas de controle nas diferentes regiões produtoras de milho poderiam estar ligadas a que a base genética da herança da resistência de *S. frugiperda* não se ajusta a algumas das premissas indicadas para o uso da estratégia "alta dose refugio". Desta forma, são necessários estudos que caracterizem a base genética da resistência em populações de *S. frugiperda*, e assim,

poder conceber estratégias robustas que lidem com a diversidade potencial da resposta evolutiva dessa praga no Brasil.

Neste estudo reportamos resultados da seleção de duas linhagens de *S. frugiperda* de diferentes localidades do Brasil, selecionadas para altos níveis de resistência a Cry1Fa e a caracterização da base genética da resistência. Os resultados mostram que o padrão recessivo de herança da resistência nas duas linhagens de *S. frugiperda* suporta este importante pressuposto da estratégia em uso para o manejo da resistência no milho Cry1Fa. Porém, a rápida resposta à seleção indica que o alelo de resistência a Cry1Fa deve estar presente nas populações de campo e, que o milho Cry1Fa comercializado não é de alta dose para *S. frugiperda* como indicado pela sobrevivência dos heterozigotos em plantas. Esses resultados apresentam implicações diretas para o manejo da resistência de *S. frugiperda* no milho que expressa Cry1Fa e outras culturas transgênicas Bt no Brasil.

## MATERIAL E METODOS

### Origem e manutenção dos insetos

Em abril de 2011, aproximadamente 200 larvas de *S. frugiperda* foram coletadas por técnicos da DuPont Pioneer em campos de milho não-Bt em quatro municípios produtores de milho no Brasil: Cascavel (Paraná) (24°57'20"S, 53°27'19"W), Sorriso (Mato Grosso) (12°32'43"S, 55°42'41"W), Morrinhos (Goiás) (17°43'55"S, 49°06'03"W) e Brasília (Distrito Federal). (15°46'47"S, 47°55'47"W). Em Morrinhos, também foram coletadas larvas em milho Bt TC1507. Os insetos coletados em cada localidade foram colocados em bandejas com dieta artificial, acondicionados em caixa de isopor e levados ao laboratório da DuPont Pioneer em Brasília, Distrito Federal. Após triagem dos indivíduos sadios, estes foram mantidos por duas gerações separados por localidade e posteriormente enviados à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os insetos foram mantidos usando métodos adaptados de Kasten Jr. et al., (1978). Mariposas foram colocadas em gaiolas de PVC de 40 cm de altura x 30 cm Ø

com papel sulfite nas paredes internas para oviposição e com solução a base de 10% açúcar e 5% ácido ascórbico embebida em algodão para alimentação. Os ovos foram coletados a cada dois dias, durante quatro dias, e armazenados em sacolas plásticas até eclosão. Grupos de neonatas foram transferidos para dieta artificial (Kasten Jr. et al., 1978) em copos plásticos de 500 ml até o 2º instar e depois individualizadas em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP) até pupação. As criações foram mantidas em ambiente controlado com temperatura de  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 15$  % e fotoperíodo de 14L: 10E.

### **Seleção para resistência a Cry1Fa**

O experimento foi realizado de julho de 2011 a dezembro de 2012 usando folhas de milho Cry1Fa do evento TC1507 (híbrido 30F35H, Pioneer Sementes, Brasil). O milho foi semeado quinzenalmente em vasos de 4 L no campo experimental da UFV a partir de junho de 2011. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes, mantendo-se quatro plantas por vaso após desbaste. As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas aos 10 e 35 dias com 40 g de NPK 08-28-16 por vaso. Os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para o cultivo de milho (Cruz, 2010), sem aplicação de pesticidas sendo o controle de plantas daninhas realizado manualmente.

Duas populações base de *S. frugiperda* foram utilizadas nos experimentos de seleção para resistência. Uma delas, denominada MR, foi proveniente de larvas sobreviventes em plantas de milho TC1507 em Morrinhos, Goiás, e a outra, denominada Mista ou MT, foi derivada do cruzamento dos insetos provenientes das demais localidades. A população MT foi obtida por uma série de cruzamentos recíprocos como se segue. Na terceira geração, após recebimento dos insetos na UFV, indivíduos de Cascavel e Sorriso foram cruzados originando a progênie denominada CS, e o mesmo foi feito com os insetos de Brasília e Morrinhos, que originou a progênie BM. As larvas desses cruzamentos foram criadas usando métodos padronizados e mariposas BM foram cruzadas com mariposas de Morrinhos Hx originando a progênie BMH. Finalmente, os adultos dessa progênie foram cruzados com os adultos CS, após uma geração de acasalamento ao acaso,

originando a progênie CSBMH, que foi denominada de população MT e que constituiu um pool genético derivado de cinco populações de campo de *S. frugiperda*. Em cada cruzamento recíproco, pupas foram separadas por sexo com base nas diferenças morfológicas dos últimos segmentos abdominais (Heinrich, 1919; Capinera, 2000). Após a emergência, um mínimo 30 adultos de cada sexo foram transferidos para gaiolas de PVC descritas acima.

Cada uma das duas populações (MR e MT) antes de serem selecionadas para resistência foi dividida em duas sub-populações ou linhagens: uma controle (denominadas MTC e MRC), mantidas na ausência de pressão de seleção a Cry1Fa, e outra destinada à seleção para resistência a Cry1Fa (denominadas MTH e MRH). Ambas as populações foram submetidas a pressão de seleção com folhas de milho Cry1Fa, estágio V4-V9, em duas fases. Nas três primeiras gerações de seleção, as neonatas foram expostas ao milho Cry1Fa por três dias, e da 4ª à 11ª geração de seleção, a exposição crônica à toxina foi aplicada de neonata até pupa. Esse regime de exposição foi usado para diminuir a mortalidade na fase inicial durante o processo de seleção.

Durante o processo de seleção inicial (exposição de 3 dias), grupos de dez neonatas foram transferidos para copos plásticos de 110 mL contendo aproximadamente 340 mg de pedaços folha de milho P30F35H (TC1507) para a seleção ou P30F35 (não Bt) para o controle. No mínimo de 35 repetições (copos) foram usadas, totalizando 350 indivíduos expostos por geração. Após 72 h, os sobreviventes foram transferidos individualmente para bandejas de criação com dieta artificial, sendo realizados procedimentos padrão de criação dos indivíduos, incluindo sexagem, transferência para gaiolas de adultos e coletas de massas de ovos como descrito acima. Durante o processo de exposição crônica, as larvas foram individualizadas após 3 dias, conforme metodologia, porém foram alimentadas com pedaços de folhas de milho P30F35H até a fase de pupa. As folhas de milho foram substituídas a cada dois dias. Durante todo o processo de seleção, um mínimo de 240 neonatas foram expostas à folhas de milho Cry1Fa. As folhas ofertadas aos insetos a cada geração foram submetidas ao teste de imunodeteção de Cry1Fa usando tiras

ImmunoStrip STX 10301/0050 (Agdia Inc., Elkhart, IN, EUA) conforme instruções do fabricante.

Para cada geração de seleção foram comparadas entre as duas versões de milho (Bt e não Bt) a sobrevivência de neonata até pupa, biomassa de pupa e o tempo de desenvolvimento (neonata até pupa). Os dados foram submetidos à análise de variância e posteriormente ao teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD ou teste t,  $P < 0.05$ ) (PROC GLM) (SAS Institute, 2011). A significância da resposta à seleção nas duas linhagens foi testada usando o procedimento PROC REG (SAS Institute, 2011), pelo qual se correlacionou sobrevivência de neonata até pupa das progênes com a sobrevivência dos pais.

### **Quantificação da resistência**

O nível de resistência foi quantificado para as linhagens selecionadas depois da 11ª geração de seleção usando como referência uma população (Lab) mantida sem exposição a inseticidas por mais de dez anos na Embrapa Milho & Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

**Bioensaios com toxina purificada.** A toxina Cry1Fa utilizada nos bioensaios foi obtida do laboratório da Dra. Marianne P. Carey, (Case Western Reserve University, OH). A proteína foi ativada com tripsina e purificada em HPLC, sendo fornecida na forma liofilizada. A toxicidade da Cry1Fa do estoque utilizado nos bioensaios para *S. frugiperda* é semelhante àquela obtida em outros laboratórios tais como da University of Nebraska-Lincoln (dados não publicados).

A susceptibilidade das neonatas foi determinada por exposição a várias concentrações da toxina usando a metodologia descrita por Marçon et al., (1999). Os bioensaios foram realizados utilizando bandejas de 128 células (cada célula com 16 mm de diâmetro, 16 mm de altura; CD International, Pitman, NJ). Um mililitro de dieta foi disposto dentro de cada célula, deixando-se solidificar. Para estabelecer a concentração da toxina que causa 50% de mortalidade ( $CL_{50}$ ) e de inibição de crescimento ( $CE_{50}$ ), utilizaram-se sete concentrações da toxina purificada mais o

controle. As diluições foram feitas em Triton-X-100 a 0,1% para obter espalhamento uniforme na superfície da dieta. Cada célula foi tratada superficialmente com 30 µL da concentração indicada. O controle consistiu em células tratadas com 30 µL de Triton-X-100 a 0,1%.

As células tratadas foram deixadas secar ao ar para, posteriormente, com ajuda de um pincel fino colocar uma neonata (> 24 horas de eclosão) dentro de cada célula. As células foram cobertas com tampas ventiladas (CD International, Pitman, NJ). A mortalidade foi avaliada aos sete dias de exposição. As larvas que não conseguiram passar ao segundo ínstar de desenvolvimento ou seu peso foi inferior a 0,1 mg foram consideradas como mortas (Marçon et al., 1999). Portanto, neste estudo a avaliação de mortalidade também incluiu severa inibição de crescimento. O peso das larvas sobreviventes foi registrado para determinar a porcentagem de inibição do crescimento como função da concentração da toxina. As bandejas dos bioensaios foram mantidas em câmara de crescimento com escotofase de 24 h, 27 °C e 70 % de umidade relativa. Para cada população, os bioensaios foram repetidos duas vezes em duas datas diferentes, usando 16 neonatas em cada concentração.

Os dados de mortalidade foram analisados por análise próbite (Finney, 1971) usando PoloPlus (Robertson et al., 2007). O peso larval foi transformado em porcentagem de inibição de crescimento em relação ao controle. Os dados foram analisados por regressão não-linear (Marçon et al., 1999) usando PROC REG (SAS Institute, 2011). O fator de resistência foi calculado com base na mortalidade e inibição de crescimento para a linhagem suscetível (Robertson et al., 1995, 2007) usando PoloPlus.

**Bioensaios com plantas em casa de vegetação.** Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na UFV usando os híbridos de milho P30F35H e seu isogênico P30F35. Vinte e sete plantas de cada híbrido foram cultivadas em vasos de 10 L (1 planta/vaso) e colocadas aleatoriamente em gaiolas de 1.5 x 3 x 2 m revestidas com tecido *voil* para reduzir o risco de dispersão de larvas entre os tratamentos. Em cada gaiola foram arranjadas nove plantas, espaçadas 0.25 m na

linha e 0.70 m entre linhas. A adubação, os tratos culturais, e a confirmação da presença de proteína Cry1Fa foram os mesmos descritos anteriormente.

Ao atingir o estágio V4, as plantas foram infestadas individualmente com 10 neonatas por planta, totalizando 90 larvas por tratamento e 180 por linhagem de *S. frugiperda* (MTH, MRH e Lab). Quatorze dias após a infestação, as plantas foram dissecadas e as larvas sobreviventes foram contadas e criadas em laboratório em folhas do híbrido de milho correspondente (Bt e não-Bt) até pupação. Os dados de sobrevivência de neonata até adulto foram submetidos a análise de variância em esquema fatorial (três linhagens de *S. frugiperda* x dois híbridos milho) e posteriormente ao teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD ou teste t,  $P < 0.05$ ) (PROC GLM) (SAS Institute, 2011).

### **Análise da herança**

**Experimentos com toxina purificada.** Foi testada a suscetibilidade a Cry1Fa da progênie F1 resultante de cruzamentos recíprocos entre as linhagens resistente e suscetível (resistente ♀ × suscetível ♂ e resistente ♂ × suscetível ♀). Pupas foram sexadas (Heinrich, 1919; Capinera, 2000) para realizar os cruzamentos recíprocos, os quais foram estabelecidos com 80 indivíduos (40♀ × 40♂). Bioensaios de concentração-resposta para determinar a suscetibilidade das progênies e das linhagens parentais foram realizados como descrito anteriormente (Marçon et al., 1999).

A ligação da resistência ao sexo foi testada por meio de testes de hipóteses para comparar a diferença na inclinação e no intercepto das regressões de próbite da progênie dos cruzamentos recíprocos usando o software PoloPlus (Robertson et al., 2007). O nível de dominância da resistência foi calculado usando a fórmula  $D_x = (X_{RS} - X_{SS}) / (X_{RR} - X_{SS})$ , onde  $X_{RR}$ ,  $X_{RS}$  e  $X_{SS}$  são os valores quantitativos para uma característica (i.e. LogCL<sub>50</sub>) para homozigoto resistente, heterozigoto e homozigoto susceptível, respectivamente (Bourguet et al., 2000). Como as populações resistentes não apresentaram mortalidade significativa nas altas concentrações de Cry1Fa testadas, um limite inferior da CL<sub>50</sub> foi usado para os cálculos da dominância

baseados na maior concentração testada (10000 ng.cm<sup>-2</sup>). Os valores de  $D_x$  podem variar de 0 (resistência completamente recessiva) a 1 (resistência completamente dominante). Quando  $D_x$  é 0.5, a resistência é referida como codominante ou aditiva (Bourguet et al., 2000). As características utilizadas para o cálculo da dominância foram mortalidade ( $D_M$ ) e inibição de crescimento ( $D_{IC}$ ).

Para estimar o número de loci envolvidos na resistência, a progênie F1 dos cruzamentos recíprocos foi retrocruzada com a linhagem resistente (Roush & Daly 1990, Tabashnik 1991). O modelo de herança monogênica foi testado diretamente comparando a mortalidade observada e a esperada da progênie dos retrocruzamentos a diferentes concentrações de Cry1Fa usando o teste de  $\chi^2$  (Preisler et al., 1990; Tabashnik, 1991; Tabashnik et al., 1992). Se a resistência é monogênica, a F1 do retrocruzamento produz uma progênie que é 50% RS e 50% RR. Para testar essa hipótese, a mortalidade esperada na progênie do retrocruzamento a uma concentração  $x$  foi calculada usando a formula  $Y_x = 0.50(M_{RS} + M_{RR})$ , onde  $M_{RS}$  e  $M_{RR}$  são as mortalidades para os genótipos RS (F1) e RR (linhagem parental) a uma concentração  $x$ , respectivamente.

**Experimentos com plantas.** Experimentos em delineamento inteiramente casualizado foram realizados em casa de vegetação na UFV com os híbridos de milho 30F35H e seu isogênico P30F35. As plantas foram semeadas e adubadas como descrito nos itens de quantificação da resistência e seleção para resistência, respectivamente. Seis combinações de tratamentos foram testadas em esquema fatorial de dois híbridos de milho (Bt e não-Bt) e três genótipos de *S. frugiperda* (resistente RR, suscetível SS e heterozigoto RS). Os heterozigotos F1 foram obtidos por cruzamentos recíprocos de cada linhagem resistente (MTH e MRH) com a suscetível (Lab) usando 50 pupas por sexo. Como os dados de análises de herança indicaram que a resistência é autossômica, a progenitora dos cruzamentos recíprocos foi misturada através da combinação das massas de ovos produzidas em cada gaiola de acasalamento.

Para cada tratamento foram usadas nove plantas distribuídas aleatoriamente dentro de uma gaiola (uma gaiola por tratamento). Cada planta em estágio V4 foi

infestada com dez neonatas ( $9 \times 10 = 90$  neonatas por tratamento). Os híbridos de milho Bt foram testados para expressão da toxina Cry1Fa como citado anteriormente. Após 14 dias de infestação, a sobrevivência e o peso larval foram avaliados. As larvas sobreviventes foram transferidas individualmente para folhas dos respectivos híbridos de origem e mantidas em recipientes plásticos até pupação. As pupas foram pesadas individualmente dentro de 24 h após empupararem. O tempo de desenvolvimento até adulto foi calculado do dia de eclosão do ovo até emergência do adulto. Para considerar conjuntamente algumas características fenotípicas avaliadas, foi calculado o Índice de Adaptação pela fórmula: [(sobrevivência larval  $\times$  biomassa pupal)/tempo de desenvolvimento larval] (Boregas, 2009). Esse índice é baseado no Índice de Susceptibilidade de Penco & Martins, (1982) e pressupõe que biomassa de pupa se correlaciona com fecundidade (Leuck & Perkins, 1972). Os dados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial (3 genótipos de *S. frugiperda*  $\times$  2 híbridos milho) e posteriormente ao teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD ou teste t,  $P < 0,05$ ) (PROC GLM) (SAS Institute, 2011).

A dominância efetiva ou funcional da resistência ( $D_x$ ) foi calculada com base nas características ou resposta das linhagens/cruzamentos após exposição ao evento TC1507, usando a fórmula descrita acima nos experimentos com proteína purificada (Bourguet et al., 2000). As características utilizadas foram sobrevivência e ganho de peso aos 14 dias e índice de adaptação relativo, as quais foram representativas da resposta fenotípica dos insetos quando expostos ao evento TC1507. O custo adaptativo dos indivíduos homozigotos resistentes no milho Bt foi definido como 1. O custo adaptativo dos homozigotos suscetíveis foi estimado como o valor fenotípico de uma característica para os indivíduos selecionados dividido pelo valor fenotípico da característica para os indivíduos controle. Da mesma forma, este parâmetro nos indivíduos híbridos ( $F_1$ ) foi estimado como o valor fenotípico de uma característica para a progênie  $F_1$  dividida pelo valor fenotípico da característica para indivíduos selecionados (resistentes). Para cada genótipo de *S. frugiperda* (RR, RS e SS), a estimativa de sobrevivência no milho Cry1Fa foi ajustada pela sobrevivência no milho controle usando a correção de Abbott, (1925).

## RESULTADOS

### Seleção para resistência a Cry1Fa

No regime de seleção com três dias de exposição, o ganho em sobrevivência não foi significativo em três gerações ( $P > 0.05$ ), porém quando a exposição foi crônica (i.e., durante toda a fase larval), ambas as linhagens sob exposição ao evento TC1507 responderam à seleção para resistência a Cry1Fa, como indicado pelos dados sobrevivência, biomassa de pupa e tempo de desenvolvimento (Figura 1). A resposta à seleção foi mais evidente a partir da sexta geração, sendo que a partir da nona geração, as duas linhagens apresentaram níveis de sobrevivência semelhantes nos dois genótipos de milho, níveis que a partir dessa geração se mantiveram constantes (Figuras 1). Resultados semelhantes foram obtidos para o tempo de desenvolvimento e biomassa de pupa, os quais evidenciaram que o efeito subletal de Cry1Fa nas duas linhagens não mais foi observado nas duas linhagens a partir da nona geração de seleção, como evidenciado pela semelhança no tempo de desenvolvimento e biomassa de pupa nos dois genótipos de milho (Figura 1). O sucesso na seleção para resistência também é evidenciado pela significativa resposta à seleção observada para as duas linhagens, que apresentaram ganho significativo de sobrevivência a exposição à toxina Cry1Fa no decorrer do experimento (Figura 2).

### Quantificação da resistência

**Bioensaios com toxina purificada.** Os resultados mostram que as duas linhagens de *S. frugiperda* selecionadas (MTH e MRH) desenvolveram altos níveis de resistência Cry1Fa (Tabela 1). A maior concentração de Cry1Fa testada (10000 ng.cm<sup>-2</sup>) não causou mortalidade nem inibição de crescimento significativo às neonatas em sete dias de exposição. Assim, com base nesta concentração foi possível estimar o limite inferior da razão de resistência, a qual foi superior a 183 vezes a concentração necessária para matar 50% das larvas (CL<sub>50</sub>) e 1517 vezes superior àquela para causar 50% de inibição de crescimento (CE<sub>50</sub>) da população suscetível (Tabela 1).

**Bioensaios com plantas em casa de vegetação.** A sobrevivência até adulto das linhagens MTH, MRH e Lab avaliadas no milho Cry1Fa e seu isogênico não-*Bt* são apresentadas na Figura 3. No milho não-*Bt*, a linhagem Lab., apresentou sobrevivência semelhante às linhagens resistentes, contudo, esta não sobreviveu no milho Cry1Fa, diferenciando-se significativamente das linhagens resistentes ( $F_{5, 48} = 11,58$ ;  $P < 0.001$ ) (Figura 3). As linhagens MTH e MRH apresentaram sobrevivência semelhante nos dois genótipos de milho, indicando que o nível de resistência a Cry1Fa possibilita aos insetos desenvolverem-se sobre plantas expressando a toxina em pleno crescimento.

### **Análise da herança da resistência**

**Experimentos com toxina purificada.** Os valores de  $CL_{50}$  para a F1 dos cruzamentos recíprocos MTH  $\times$  Lab e MRH  $\times$  Lab foram semelhantes, considerando o intervalo de confiança a 95% para o fator de resistência (Tabela 1). Para os dois grupos de cruzamentos recíprocos, a inclinação e o intercepto da regressão concentração-mortalidade foram semelhantes (MTH  $\times$  Lab:  $\chi^2 = 2.32$ ,  $gl = 2$ ,  $P = 0.31$ ; MRH  $\times$  Lab:  $\chi^2 = 5.73$ ,  $gl = 2$ ,  $P = 0.057$ ). Portanto, nas duas populações selecionadas, a herança da resistência é autossômica sem efeito maternal. Além disso, a resposta da geração F1 foi similar à população parental susceptível, indicando que a resistência é um caracter recessivo (Tabela 1). As curvas concentração-mortalidade da F1 e da população susceptível foram paralelas (MTH:  $\chi^2 = 0.07$ ,  $gl = 2$ ,  $P = 0.96$ ; MRH:  $\chi^2 = 1.01$ ,  $gl = 2$ ,  $P = 0.60$ ), indicando que a distância fenotípica entre os indivíduos heterozigotos e homozigotos susceptíveis foi constante ao longo do intervalo das concentrações de Cry1Fa testadas. Os valores de dominância da resistência obtidos pelo método de Bourguet et al., (2000) confirmaram que a herança nas duas populações selecionadas é recessiva, com estimativas de  $D$  entre 0.12 e 0.25.

Para as duas linhagens selecionadas foi testado o modelo de herança monogênica contra poligênica pelo retrocruzamento da geração F1 com a linhagem resistente (RS  $\times$  RR) e comparando a resposta de sua progênie com a de seus pais. As curvas de concentração resposta dos retrocruzamentos mostraram um patamar de

50% de mortalidade, que é esperado se a resistência é conferida por um único fator genético. Esse patamar sugere que a metade da prole do retrocruzamento responde a concentrações de Cry1Fa que matam heterozigotos, enquanto a outra metade não, mostrando uma reação 1:1 de genótipos RS e RR (Figura 4). Além disso, o teste direto para um único fator de herança (monogênica) não mostrou nenhum desvio significativo entre os valores de mortalidade observada e a esperada (MTH:  $\chi^2 = 6.90$ , gl = 6,  $P = 0.33$ ; MRH:  $\chi^2 = 4.83$ , gl = 6,  $P = 0.56$ ). Portanto, o padrão de resposta obtida no retrocruzamento é consistente com o padrão simples de resistência monogênica.

**Experimentos com plantas.** A sobrevivência de neonata até adulto das linhagens resistentes, suscetível e a progênie dos cruzamentos para determinar a herança estão apresentados na Figura 5. A análise de variância indicou que houve interação significativa entre as linhagens de *S. frugiperda* e os genótipos de milho para a sobrevivência (MTH:  $F_{2,40} = 19.06$ ,  $P < 0.001$ ; MRH:  $F_{2,40} = 9.22$ ,  $P < 0.001$ ). A sobrevivência das progênies (F1) dos cruzamentos foi significativamente menor no híbrido de milho que expressa Cry1Fa (Bt) em relação à isolinha (não-Bt) (MTH:  $F_{5,48} = 26.42$ ,  $P < 0.001$ ; MRH:  $F_{5,48} = 8.86$ ,  $P < 0.001$ ). No entanto, a sobrevivência das progênies foi superior a 5% (F1: MTH x Lab =  $8,9 \pm 3,1$ ; F1: MRH x Lab =  $5.6 \pm 2.9$ ), indicando que o milho Cry1Fa não atingiu mortalidade de 95% dos indivíduos heterozigotos (RS). A sobrevivência de neonata até adulto e o índice de adaptação foram utilizadas como características fenotípicas no cálculo da dominância funcional da resistência (Tabela 2). Os valores de dominância funcional, que são baseados na concentração de toxina presente na planta de milho Cry1Fa, mostram que a resistência é parcialmente recessiva para as duas populações selecionadas (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Os resultados mostram que as duas linhagens de *S. frugiperda* que são representativas de populações brasileiras desta espécie-praga responderam à pressão de seleção com Cry1Fa expressa em folhas de milho P30F35H quando a exposição ao evento foi crônica (i.e., por todo tempo de desenvolvimento larval). Isto foi evidenciado pelo aumento da sobrevivência, biomassa larval e diminuição no tempo

de desenvolvimento, apresentada depois da sexta geração, e à semelhança registrada quando comparados estes três parâmetros nos dois híbridos de milho, após da nona geração de seleção (Figura 1). Nos testes de casa de vegetação, as duas linhagens selecionadas conseguiram colonizar e completar seu ciclo de vida em plantas de milho Cry1Fa, demonstrando o significativo nível de resistência desenvolvido. Nos bioensaios com proteína purificada Cry1Fa, ambas as linhagens não apresentaram suscetibilidade a doses inferiores de 10000 ng.cm<sup>-2</sup> de proteína. Esses resultados são similares aos reportados para a linhagem de *S. frugiperda* resistente ao milho Cry1Fa detectada em Porto Rico em condições de campo (Storer et al., 2010) e aos relatados por Tabashnik et al., (2009) para determinar populações com altos níveis de resistência.

A resposta significativa à seleção observada nas duas linhagens (MTH e MRH) no decorrer do experimento (Figura 2), sugere que o alelo de resistência a Cry1Fa estava presente em algumas das populações de campo que deram origem às linhagens selecionadas. Esses resultados enfatizam a importância de implementação adequada de áreas de refúgio como prática de manejo de resistência de insetos a proteínas Bt. Isto porque a ausência de refúgio pode aumentar a frequência alélica de resistência pela predominância de acasalamento entre indivíduos portadores desses alelos, favorecendo assim o surgimento de indivíduos homozigotos resistentes e, portanto, acelerando o desenvolvimento de resistência na população do inseto (Peck et al., 1999; Storer et al., 2003; Sisterson et al., 2004). Contudo, é importante ressaltar que não se espera que a rapidez na evolução da resistência em campo seja semelhante à registrada em condições de laboratório, principalmente porque os indivíduos sob pressão de seleção em laboratório são mantidos em isolamento para cruzamentos subsequentes, sem a introdução de indivíduos susceptíveis, condições que fazem com que a herdabilidade seja constante e acelere a resposta à seleção (Falconer, 1989).

Os resultados de tempo de desenvolvimento e biomassa de pupa evidenciaram efeitos subletais de Cry1Fa nos insetos das duas linhagens selecionadas (MRH e MTH) no início do processo de seleção (Figura 1). Atraso no desenvolvimento larval, após intoxicação com proteínas Bt também tem sido

reportado em outros experimentos (Siegfried et al., 2001; Storer et al., 2001; Costa et al., 2000; Eizaguirre et al., 2005; Sedaratian et al., 2013), à semelhança da diminuição no peso da pupa (Pedersen et al., 1997; Erb et al., 2001; Moreau & Bauce, 2003). É possível que esses efeitos subletais sejam causados por interferência na função de proteínas que interagem com proteínas Cry, tais como caderina, fosfatase-alcálica, aminopeptidase e outras proteases (Martinez-Ramirez et al., 1999; Gujar et al., 2001; Carrière et al., 2010; Jurat-Fuentes et al., 2011). Importaneamente, se esse atraso no desenvolvimento larval, que foi observado em laboratório ocorrer em condições de campo, ele pode favorecer o acasalamento assortativo de indivíduos carreadores de alelos de resistência ao milho TC107 em campos deste milho e assim acelerar a taxa de evolução de resistência.

Os resultados dos bioensaios concentração-resposta com Cry1Fa na superfície da dieta artificial indicam que a herança da resistência à proteína nas linhagens MTH e MRH é recessiva, autossômica e sem efeito maternal. Além disso, as análises dos bioensaios nos cruzamentos entre a progênie F1 e os parentais resistentes mostraram que a resistência é conferida por um único *locus*. Estes resultados são consistentes com os reportados para a população de *S. frugiperda* que desenvolveu altos níveis de resistência a Cry1Fa em condições de campo em Porto Rico (Storer et al., 2010) e com outros resultados de análises genéticas de outras populações de insetos selecionada para resistência a toxinas de *B. thuringiensis* em condições de laboratório (Gahan et al., 2001; Morin et al., 2003; Yang et al., 2007; Pereira et al., 2008; Zhang et al 2009). Esse tipo de herança e o alto nível de resistência aqui observados são comuns em mecanismos de resistência categorizados como “modo 1”, que envolvem mutações pontuais em proteínas receptoras na membrana das microvilosidades no intestino médio do inseto, reduzindo a ligação da proteína Bt e aumentando a sobrevivência dos indivíduos em plantas transgênicas que expressam a proteína (Tabashnik et al., 1998; 2003; Carrière et al., 2010). Em *S. frugiperda*, a resistência a Cry1Fa parece estar ligada à redução da expressão de fosfatase alcalina (ALP), uma proteína do intestino médio dos insetos envolvida no mecanismo de ação de toxinas Cry (Jurat-Fuentes et al., 2011).

A sobrevivência de neonatas até adulto e o índice de adaptação dos heterozigotos quando expostos à plantas de milho Cry1Fa indicaram que a resistência é funcionalmente recessiva nas duas linhagens selecionadas (Tabela 2). Esses resultados são consistentes com o baixo nível de dominância da resistência a Cry1Fa obtido nos experimentos com a toxina na dieta artificial. Os valores do custo adaptativo dos heterozigotos baseados na sobrevivência até adulto e no índice de adaptação foram próximos a zero para as duas linhagens. Esses resultados sugerem que os heterozigotos apresentam fitness muito próximo de zero na dose expressa na planta de milho Bt Cry1Fa. Estes padrões de resistência funcionalmente recessiva obtidos para as duas linhagens de *S. frugiperda* validam parte dos pressupostos da estratégia de manejo da resistência recomendada para o milho Cry1Fa (Roush, 1997). Contudo, a mortalidade dos heterozigotos no milho TC1507 não foi superior a 95%, indicando que tal evento não atende ao critério de alta dose para *S. frugiperda*.

De outro modo, este é um dos poucos estudos que mostram que heterozigotos de *S. frugiperda* podem desenvolver-se de lagarta neonata até adulto em plantas de milho transgênico com níveis de sobrevivência superiores a 5% (Figura 5). Esse resultado indica que o milho P30F35H não é de alta dose para *S. frugiperda*, confirmando para o Brasil os dados reportados pela USEPA, (2005) no Estados Unidos, onde concluíram que o milho Cry1Fa alcançou alto nível de eficácia para *S. frugiperda* e não alta dose, como foi observado para *Ostrinia nubilalis*.

Em termos de manejo da resistência, as taxas de sobrevivência de indivíduos heterozigotos superiores às estimadas em estudos de modelagem para determinação do tamanho das áreas de refúgio (Gould, 1998; Tabashnik, 1994; Tabashnik et al., 2004) pode aumentar a frequência do alelo de resistência em cultivos Bt mais rapidamente do que era antecipado. Além disso, a dispersão desses indivíduos resistentes dos campos Bt para os refúgios pode aumentar a frequência alélica de resistência nos refúgios (Sisterson et al., 2004), especialmente quando custos adaptativos estão ausentes (Carriere & Tabashnik, 2001; Gould et al., 2006), como foi observado para *S. frugiperda* (Velez et al., 2013; Jakka et al., 2014). Estas condições aumentam a herdabilidade da resistência (Gould, 1998; Tabashnik & Carrière, 2009), o que poderia junto com a baixa adoção do refugio, explicar em

parte, a alta frequência de alelos resistentes em populações de diferentes regiões do Brasil (dados não publicados) e reclamações de falha no controle em lavouras de milho Bt.

Em resumo, os resultados deste estudo mostram que populações de *S. frugiperda* de diferentes regiões do Brasil responderam à pressão de seleção com Cry1Fa expressa em plantas de milho Bt disponíveis comercialmente no país. O modo de herança da resistência observado (i.e., resistência recessiva e controlada por um locus ou loci ligados) é consistente com um dos pressupostos da estratégia de manejo de resistência atualmente em uso. Entretanto, pela rápida resposta à pressão de seleção nas duas linhagens selecionadas, infere-se que a frequência do alelo(s) de resistência a Cry1Fa deva ser relativamente alta em campo, o que poderá ser averiguado com estudos de monitoramento da frequência do gene de resistência. Além disso, nossos resultados de sobrevivência dos heterozigotos em plantas de milho TC1507 em casa de vegetação indicam que tal evento parece não ser de alta dose para *S. frugiperda*. Isso, somado à baixa adoção de refúgio pelos agricultores, pode resultar em rápido aumento na proporção de indivíduos resistentes no campo, o que pode levar a falhas de controle, como já reportado em outros agroecossistemas (Tabashnik et al., 2013). A disponibilidade destas linhagens selecionadas oferece oportunidade para a realização de bioensaios de resistência cruzada a outras proteínas Bt, o que auxiliará na escolha de algumas delas para piramidação em híbridos de milho Bt. Além disso, essas linhagens permitirão a caracterização genética, bioquímica e molecular da resistência, o que poderá também auxiliar no refinamento de recomendações para manejo da resistência de *S. frugiperda* a toxinas de Bt.

**Tabela 1.** Resposta à exposição a Cry1Fa das progênies dos cruzamentos recíprocos das linhagens resistentes MTH e MRH da lagarta do cartucho com a população suscetível (Lab)

Strain or Cross	N	Mortalidade				Inibição de crescimento			
		Slope ± SE	LC <sub>50</sub> (95% CL) <sup>a</sup>	RR (95% CL) <sup>b</sup>	χ <sup>2</sup>	Slope ± SE	EC <sub>50</sub> (95% IC) <sup>a</sup>	RR (95% CL) <sup>b</sup>	χ <sup>2</sup>
<b>MTH × Lab</b>									
MTH	508	nc <sup>c</sup>	>10.000	>183.04	nc	nc	nc	> 1517	nc
MTH♀ x Lab♂	510	2.2 ± 0.26	203.4 (164.1 – 266.8)	3.4 (2.6 - 4.6)	1.51*	1.12 ± 0.13	30.9 (12.7 – 68.8)	4.6 (2.9 – 7.3)	17.11
MTH♂ x Lab♀	506	1.7 ± 0.20	214.6 (169.6 – 288.8)	3.6 (2.6 - 5.0)	1.23*	1.57 ± 0.16	22.9 (17.3 – 28.9)	3.4 (2.2 – 5.3)	3.72*
<b>MRH x Lab</b>									
MRH	507	nc <sup>c</sup>	>10.000	>183.04	nc	nc	Nc	> 1517	nc
MRH♀ x Lab♂	511	1.7 ± 0.18	162.5 (111.4 - 272.7)	2.7 (2.0 - 3.8)	7.03*	1.44 ± 0.10	21.1 (15.9 – 26.9)	3.20 (2.1 – 4.7)	5.99*
MRH♂ x Lab♀	512	1.9 ± 0.20	211.1 (170.8 - 273.7)	3.6 (2.7 - 4.8)	4.10*	1.40 ± 0.13	22.7 (17.6 - 28.6)	3.45 (2.2 – 5.2)	4.21*
Lab-F18	505	2.0 ± 0.15	58.2 (49.9 - 69.0)	.	4.06*	1.63 ± 0.19	6.5 (4.3 - 8.8)		1.84*

<sup>a</sup>concentração letal em ng (nanogramas)/cm<sup>2</sup> de Cry1Fa na superfície da dieta.

<sup>b</sup> Fator de resistência, CL<sub>50</sub>/CL<sub>50</sub> Lab., com respectivo intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Robertson et al., 2007).

<sup>c</sup>Não calculado devido a insuficiente concentração – resposta.

\*Falta de ajuste não significativo ( $P > 0.05$ ), indica que modelo de próbite se ajustou aos dados.

**Tabela 2.** Dominância efetiva da resistência a Cry1Fa em duas linhagens de *Spodoptera frugiperda* selecionadas em laboratório.

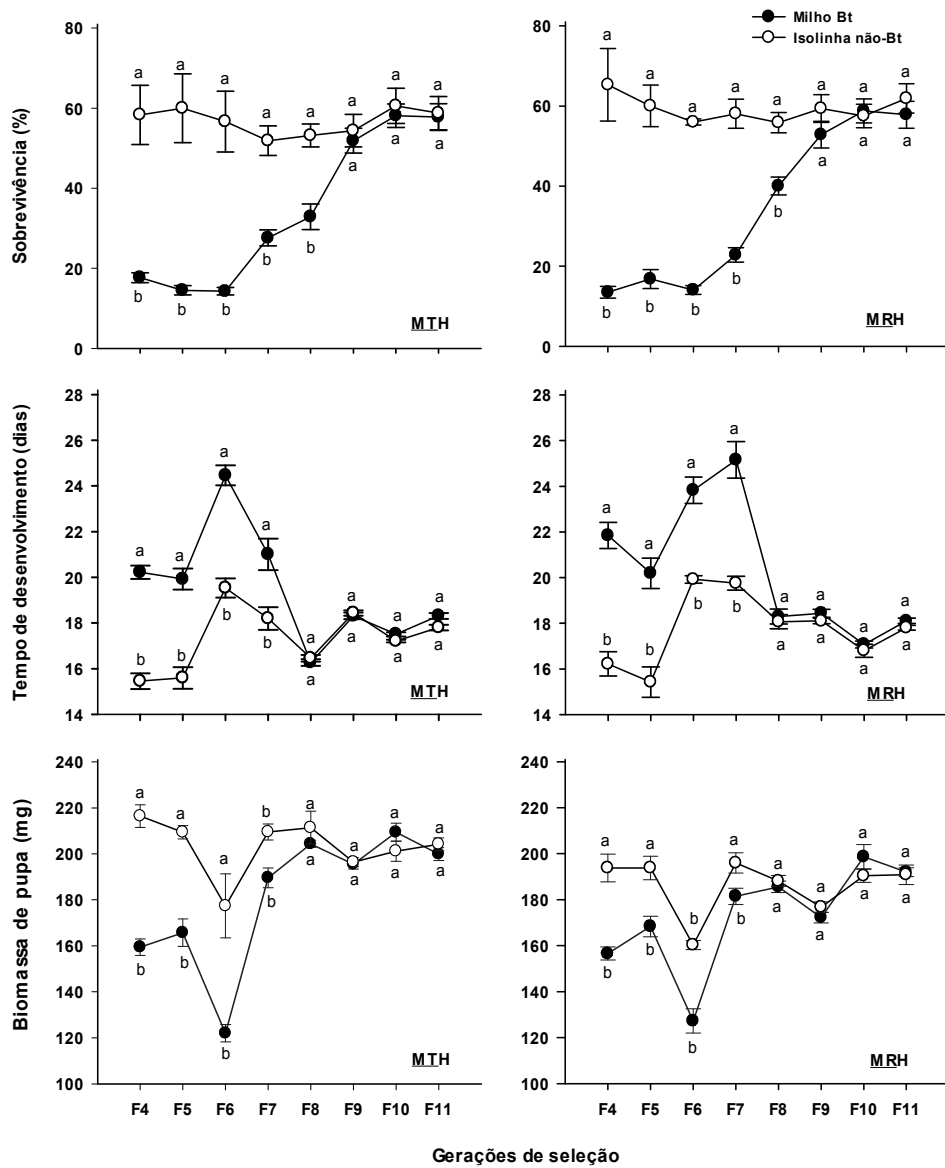
Response variable	Strain or cross	Phenotypic value	Relative fitness <sup>a</sup>	Effective dominance <sup>b</sup>
Survivorship to adulthood	Lab	0	0	
	F1 (MTH × Lab)	16.1	0.16	0.16
	F1 (MRH × Lab)	14.7	0.15	0.15
	MTH	100.0	1	
	MRH	96.9	1	
Fitness index (= survival rate × pupa weight ÷ development time)	Lab	0	0	
	F1 (MTH × Lab)	0.2	0.11	0.12
	F1 (MRH × Lab)	0.3	0.14	0.17
	MTH	2	0.94	
	MRH	2	0.82	

F<sub>1</sub> é a progênie híbrida conjunta (RR<sub>♀</sub> × SS<sub>♂</sub> + RR<sub>♂</sub> × SS<sub>♀</sub>) dos dois cruzamentos massais entre as duas linhagens parentais, resistente e susceptível.

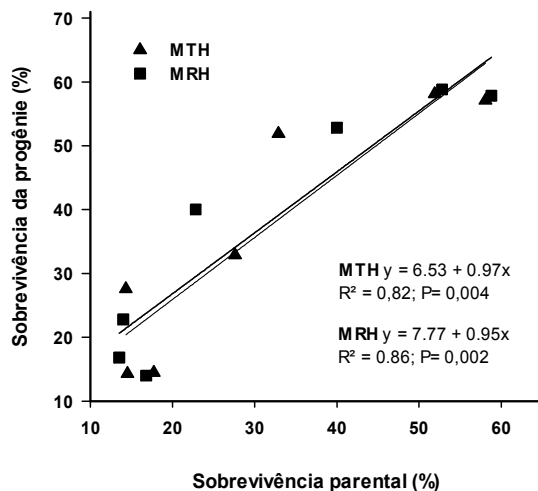
Para cada linhagem de *S. frugiperda*, a estimativa de sobrevivência no milho CryF foi ajustada pela sobrevivência no milho isogênico não-Bt (controle), usando a correção de Abbott (1925). O índice de adaptação relativo foi calculado em relação ao índice de adaptação de cada linhagem no milho controle.

<sup>a</sup>*Fitness* é o valor fenotípico de uma característica (sobrevivência, ganho de peso, índice de adaptação) dos indivíduos de cada linhagem, dividido pelo valor fenotípico da característica dos indivíduos das linhagens selecionadas (resistentes), com o milho P30F35 (ver Material e Métodos).

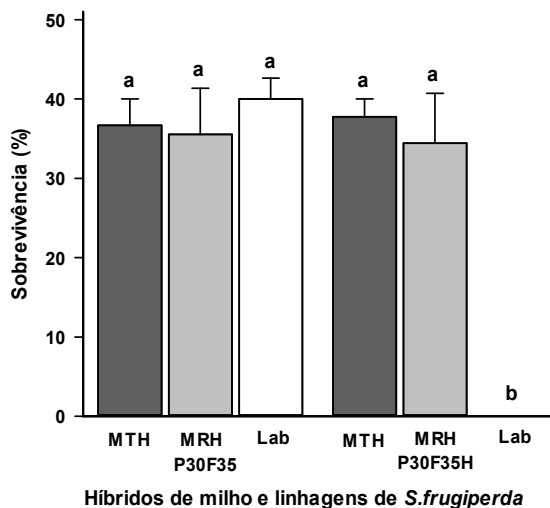
<sup>b</sup>A dominância pode variar de 0 (resistência completamente recessiva) a 1 (resistência completamente dominante) (ver Material e Métodos).



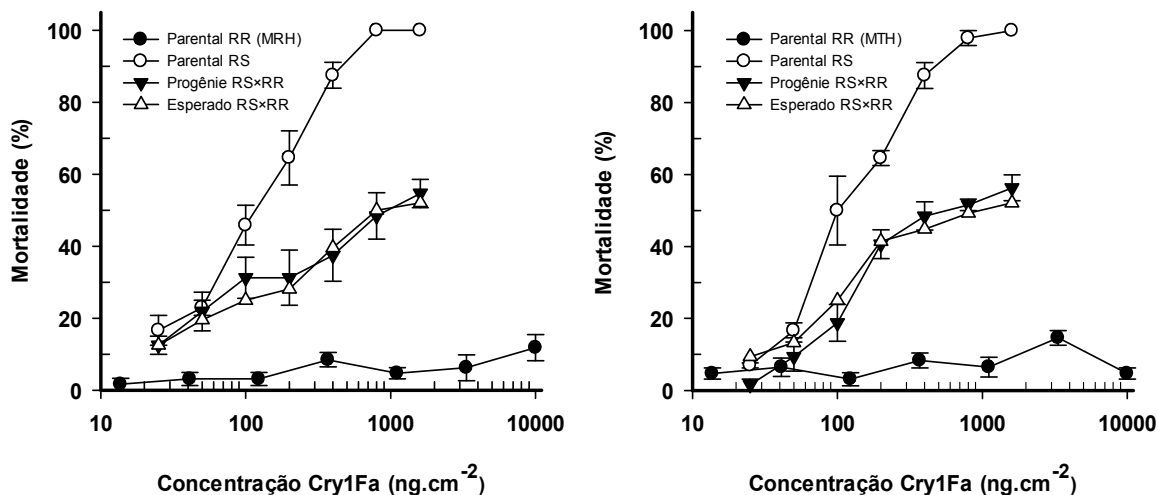
**Figura 1.** Sobrevivência, biomassa de pupa e tempo de desenvolvimento de neonata até pupa das linhagens MTH e MRH em oito gerações de seleção para resistência à toxina Cry1Fa. A linhagem foi mantida com exposição crônica à toxina Cry1Fa (—○—, isolinha não-Bt; —●—, milho Bt). Para cada geração de seleção, médias ( $\pm$  erro padrão) com mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD protegido por ANOVA,  $P > 0,05$ , sob comparação entre genótipos de milho.



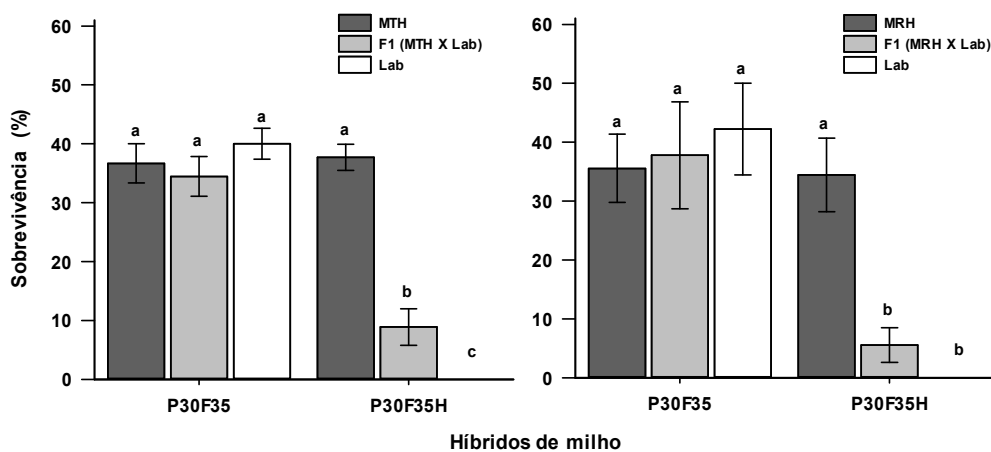
**Figura 2.** Resposta à seleção das linhagens MTH e MRH para resistência a Cry1Fa após oito gerações de exposição crônica ao milho P30F35H (Cry1Fa).



**Figura 3.** Sobrevivência de neonata até adulto das linhagens MRH, MTH e Lab em plantas dos híbridos de milho P30F35 (não-Bt) e P30F35H (Cry1Fa) após onze gerações de seleção em laboratório para resistência a Cry1Fa. Médias ( $\pm$  erro padrão) com mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD protegido por ANOVA,  $P > 0,05$ , sob comparação dentro e entre genótipos de milho e linhagens de *S. frugiperda*. O número de indivíduos avaliados foi de 180 para cada linhagem, distribuídos em dezoito repetições de 10 indivíduos.



**Figura 4.** Curvas de concentração mortalidade da progenie do retrocruzamento em comparacao com seu parental heterozigoto F1 (RS) e homozigoto resistente (RR). As barras de erro representam o erro padrão da média de mortalidade obtida em cada uma das concentrações de Cry1Fa aplicada.



**Figura 5.** Sobrevivência de neonata até adulto sobre de tres genótipos de *S. frugiperda* plantas de milho transgenico (P30F35) e convencional (P30F35H). MTH e MRH homozigotos resistente para Cry1Fa; F1, heterozigoto para resistencia a Cry1Fa; Lab, homozigoto suscetivel para resistencia a Cry1Fa. As médias ( $\pm$  erro padrão) como mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD protegido por ANOVA,  $P > 0,05$ . O número de indivíduos de cada genótipo de *S. frugiperda* avaliados foi de 90 para cada híbrido de milho, distribuídos em nove repetições de 10 indivíduos.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.
- Baxter, S.W.; Zhao, J.Z.; Gahan, L.J.; Shelton, A.M.; Tabashnik, B.E.; Heckel, D.G. Novel genetic basis of field-evolved resistance to *Bt* toxins in *Plutella xylostella*. **insect molecular biology**, v. 14, p. 327-334, 2005.
- Boregas, K.G.B. Performance diferencial de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. Belo Horizonte, 2009. 83p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Bourguet, D.; Lenormand, T.; Guillemaud, T.; Marcel, V.; Fournier, D.; Raymond, M. Variation of dominance of newly arisen adaptive genes. **Genetics**, v. 147, p. 1225-1234, 1997.
- Bourguet, D.; Genissel, A.; Raymond, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 1588-1595, 2000.
- Buntin, G. D.; Lee, R. D.; Wilson, D. M.; McPherson, M. Evaluation of Yieldgard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. **Florida Entomologist**, v. 84, p. 37-42, 2000.
- Buntin, G.D. Corn expressing Cry1Ab or Cry1Fa endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. **Florida Entomologist**, v. 91, p. 523-530, 2008.
- Campane, P.; Kruger, M.; Pasquet, R.; Le Ru, B.; Van den Berg, J. Dominant Inheritance of Field-Evolved Resistance to Bt Corn in *Busseola fusca*. **PlosOne**, v. 8, (7), p.e69675, 2013.
- Capinera, J. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). The University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. (UF/IFAS), 2000.
- Carrière, Y.; Tabashnik, B.E. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 268, p. 1475-1480, 2001.
- Carrière, Y.; David, W.; Crowder, W.; Tabashnik, B.E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, v. 3, p. 561-573, 2010.
- Costa, S.D.; Barbercheck, M.E.; Kennedy, G.G. Sublethal Acute and Chronic Exposure of Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the d-Endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology**, v. 93, (3), p. 680-689, 2000.

- Cruz, I.; Figueiredo, M.C.L.; Oliveira, A.C.; Vasconcelos, C.A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 45, p. 293-296, 1999.
- Cruz, J.C. (Ed.). Cultivo do Milho. 6.ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2010. (Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de produção, 1). Disponível em: [http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/index.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm). Acessado em 19/08/2011.
- Eizaguirre, M.; Tort, S.; Lopez, C.; Albajes, R. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagroides*. **Journal Economic Entomology**, v 98, p. 464-470, 2005.
- Erb, S.L.; Bouchier, R.S.; van Frankenhuyzen, K.; Smith, S.M. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. kurstaki on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the Tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). **Environmental Entomology**, v. 30, p. 1174– 1181, 2001.
- Falconer, D.S. 1989. Introduction to quantitative genetics, 3rd edn. John Wiley & Son, New York, USA.
- Finney, D. J. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press. 350 p, 1971.
- Gahan, L. J.; Gould, F.; Heckel, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, v. 293, p. 857-860, 2001.
- Galvão, A. Relatório de biotecnologia. Céleres. Dezembro de 2013. p. 1-7, 2013.
- Gould, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **Bioscience**, v.38, p. 26-33, 1988.
- Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- Gould, F. Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. **Biocontrol Science Technology**, v. 4, p. 451-461, 1994.
- Gould, F.; Cohen, M. B.; Bentur, J.S; Kennedy, G.G.; Van Duyn, J. Impact of small fitness costs on pest adaptation to crop varieties with multiple toxins: a heuristic model. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 2091-2099, 2006.
- Gujar, G.T.; Kalia, V.; Kumari, A. Effect of sublethal concentration of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki on food and developmental needs of the american

- bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 1130-1135, 2001.
- Heckel, D.G.; Gahan, L.J.; Baxter, S.W.; Zhao, J.Z.; Shelton, A.M.; Gould, F.; Tabashnik, B.E. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal Invertebrate Pathology**, v.95, p. 192–197, 2007.
- Hardke, J. T.; Leonard, B. R.; Huang, F.; Jackson, R.E. Damage and survivorship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic field corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. **Crop Protection**, v. 30, p. 168-172, 2011.
- Heinrich, C. Note on the European corn borer (*Pyrausta nubilalis* Hübner) and its nearest American allies, with description of larvae, pupae and new specie. **Journal of Agricultural Research**, v. 18, p. 171-184, 1919.
- Huang, F.N.; Andow, D.A.; Buschman, L.L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of *Bt* crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 140, p. 1–16, 2011.
- Jakka, S.R.K.; Knight, V.R.; Jurat-Fuentes, J.L. Fitness Costs Associated with Field-Evolved Resistance to Bt Maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomology**, v. 107(1), p. 342-351, 2014.
- Jurat-Fuentes, J.L.; Karumbaiah, L.; Jakka, S.R.K.; Ning, C.; Liu, C.; Wu, K.; Jacson, J.; Gould, F.; Blanco, C.; Portilla, M.; Perera, O.; Adang, M. Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Plos One**, v. 6, p. 1-7, 2011.
- Kasten-Junior, 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**, v.53, (2), p. 68-78, 1978.
- Leuck, D.B.; Perkins, W.D. A method of estimating fall armyworm progeny reduction when evaluating control achieved host-plant resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 65, p. 482-483, 1972.
- Marçon, P.C.R.G.; Young, L.J.; Steffey, K.L.; Siegfried, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 279-285, 1999.
- Mallet, J.; Porter, P. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? **Proceedings of the Royal Society B**, v. 250, p. 165-169, 1992.
- Martinez-Ramirez, A.C.; Gould, F.; Ferre, J. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal

- proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 9, p. 239–246, 1999.
- Moreau, G.; Bauce, E. Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. **Journal Economic Entomology**, v. 96, p. 280-286, 2003.
- Morin, S.; Biggs, R. W.; Sisterson, M. S.; Shriver, L.; Ellers-Kirk, C.; Higginson, D.; Holle, D. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 5004-5009, 2003.
- Nair, R.; Kalia, V.; Aggarwal, K.K.; Gujar, G.T. Inheritance of Cry1Ac resistance and associated biological traits in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Invertebrate Pathology**, v.104, p. 31-38, 2010.
- Omoto, C.; Diez-Rodríguez, G.I. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 311-316, 2001.
- Pedersen, A.; Dedes, J.; Gauthier, D.; van Frankenhuyzen, K. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 83, p. 253–262, 1997.
- Pencoe, N.L.; Martins, P.B. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development and adult fecundity on five grass hosts. **Environmental Entomology**, v. 11, p. 720-723, 1982.
- Peck, S.; Gould, F.; Ellner, S. P. Spread of resistance in spatially extended regions of transgenic cotton, implications for management of *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 1-16, 1999.
- Pereira, E.J.G.; Storer, N.P.; Siegfried, B.D. Inheritance of Cry1Fa resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1Fa toxin. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, p. 621-629, 2008.
- Preisler, H.K.; Hoy, M.A.; Robertson, J.L. Statistical analysis of modes of inheritance for pesticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 1649-1655, 1990.
- Robertson, J. L.; Preisler, H. K.; Ng, S. S.; Hickle, L. A.; Gelernter, W.D. Natural variation a complication factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 1-10, 1995.

- Robertson, J. L.; Russel, R. M.; Preisler, H. K.; Savin, N. E. Bioassays with Arthropods. Second Edition. CRC Press. 2007.
- Roush, R. T.; Daly, J.C. 1990. The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97-152. In R.T. Roush & B. E. Tabashnik [eds.], Pesticide resistance in arthropods. Chapman & Hall, New York.
- Roush, R. T. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays?. **Biocontrol Science and technology**, v. 4, p. 501-516, 1994.
- Roush, R.T. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? **Pesticide Science**, v. 51, p. 328-334, 1997.
- SAS Institute. 2011. SAS user's manual, version 9.3. SAS Institute, Cary NC.
- Sedaratian, A.; Fathipour, Y.; Talaei-Hassanloui, R.; Jurat-Fuentes, J. L. Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology**, v. 137 (7), p. 540-549, 2013.
- Siebert, M.; Babock, J. M.; Nolting, S.; Santos, A. C.; Adamczyk, J. J.; Neese, P. A.; King, J. E.; Jenkins, J. N.; McCarty, J.; Lorenz, G. M.; Fromme D. D.; Lassiter, R.B. Efficacy of Cry1Fa insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 91, p. 555-565, 2008a.
- Siebert, M. W.; Tindall, K. V.; Leonard, B. R.; Van Duyn, J. W.; Babcock, J.M. Evaluation of corn hybrids expressing Cry1Fa (Herculex® I Insect Protection) against Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern United States. **Journal of Entomological Science**, v. 43, p. 41-51, 2008b.
- Siegfried, B.D.; Zoerb, A.C.; Spencer, T. Development of European corn borer larvae on Event 176 Bt corn: influence on survival and fitness. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 100, p. 15-20, 2001.
- Sisterson, M. S.; Antilla, L.; Carrière, Y.; Ellers-Kirk, C.; Tabashnik, B.E. Effects of insect population size on evolution of resistance to transgenic crops. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, p. 1413–1424, 2004.
- Storer, N.P.; van Duyn, J.W.; Kennedy, G.G. Life history traits of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt transgenic corn hybrids in eastern North Carolina. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 5, p. 1268-1279, 2001.

- Storer, N. P.; Peck, S. L.; Gould, F.; Van Duyn, J. W.; Kennedy, G.G. Spatial processes in the evolution of resistance in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt transgenic corn and cotton in a mixed agroecosystem: a biology-rich stochastic simulation model. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 156–172, 2003.
- Storer, N.P.; Babcock, J.M.; Schlenz, M.; Meade, T.; Thompson, G.D.; Bing, J.W.; Huchaba, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1031-1038, 2010.
- Tabashnik, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, p. 703–712, 1991.
- Tabashnik, B.E.; Schwartz, J.M.; Finson, N.; Johnson, M.W. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 1046–1055, 1992.
- Tabashnik, B. E.1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, v. 39, p. 47–79, 1994.
- Tabashnik, B.E.; Liu, Y.; Malvar, T.; Heckel, D.G.;Masson, L.; Ferré, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: Uniform or diverse?. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 353, p. 1751-1756, 1998.
- Tabashnik, B.E.; Carriere, Y.; Timothy, J.D; Morin, S.; Sisterson, M.S.; Roush, T.R.; Shelton, M.A.; Zhao, J. Insect resistance to transgenic Bt crops: Lessons from the laboratory and field. **Journal Economic Entomology**, v. 96, p. 1031-1038, 2003.
- Tabashnik, B.E.; Gould, F.; Carrière, Y. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 17, p. 904-912, 2004.
- Tabashnik, B.E.; Van Rensburg, J.B.J.; Carrière, Y. Field-evolved insect resistance to Btcrops: definition, theory, and data. **Journal Economic Entomology**, v.102, p. 2011-2025, 2009.
- Tabashnik, B. E.; Carrière, Y. 2009. Insect resistance to genetically modified crops. In A. Gatehouse, and N. Ferry, eds. *Environmental Impact of Genetically Modified and Novel Crops*, pp. 74–100. CABI, Wallingford, UK.
- Tabashnik, B.E.; Brévault, T.; Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology**, v. 31 (6), p. 510-521, 2013.
- Van Rie, J. Insect control with transgenic plants: resistance proof? *Trends*

**Biotechnology**, v. 9, p. 177-179, 1991.

Velez, A.M.; Spencer, T.A.; Alves, A.P.; Crespo, A.L.B.; Siegfried, B.D. Fitness of Cry1Fa resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, doi: 10.1111/jen.12092, 2013.

Yang, Y.; Chen, H.; Wu, Y.; Yang, Y.; Wu, S. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6939-6944, 2007.

Yu, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 84-91, 1991.

Zhang, S.; Cheng, H.; Gao, Y.; Wang, G.; Liang, G.; Wu, K. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 421-429, 2009.

## Capítulo 2: Custo adaptativo associado à resistência de Cry1Fa na lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*

### RESUMO

Custo adaptativo em insetos resistentes a toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) pode retardar ou mesmo reverter a evolução local de resistência a culturas transgênicas Bt e, portanto, seu estudo em pragas-alvo de plantas Bt é importante para delinear estratégias de manejo da resistência. Neste estudo foram avaliados custos adaptativos associados à resistência em duas linhagens da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas em diferentes regiões do Brasil e selecionadas em laboratório para altos níveis de resistência a Cry1Fa, usando folhas de milho do evento TC1507. As comparações foram feitas entre linhagens resistentes e suscetíveis com base genética semelhante e entre F1 de cruzamentos recíprocos usando fragmentos de folhas de milho não transgênico. Não foi observado custo adaptativo aparente na taxa de crescimento populacional e características de história de vida na fase larval. Além disso, a resistência se manteve estável durante sete gerações sem decréscimo na proporção de indivíduos resistentes. Também a taxa de respiração entre os homozigotos resistentes e suscetíveis foi semelhante, o que conjuntamente indica ausência de custo adaptativo associado à resistência a Cry1Fa nas linhagens de *S. frugiperda* estudadas. Finalmente, nos componentes de *fitness* nos quais foram detectadas pequenas desvantagens em indivíduos homozigotos resistentes, os heterozigotos apresentaram desempenho igual ou superior ao dos homozigotos suscetíveis, indicando que esses pequenos custos, se existentes, são recessivos. A falta de custo adaptativo da resistência a Cry1Fa em populações de *S. frugiperda* deve explicar em parte a alta frequência do alelo de resistência a Cry1Fa em algumas regiões produtoras de milho no Brasil.

**Palavras chave:** lagarta-do-cartucho, *fitness*, manejo da resistência, taxa neta reprodutiva, estabilidade da resistência.

## INTRODUÇÃO

A resistência de espécies pragas a xenobióticos compartilham a premissa central de que a resistência está associada a um custo fisiológico (Coustau et al., 2000). Essa suposição é baseada no pressuposto de que a aquisição de algumas adaptações a novos ambientes, tais como a resistência a inseticidas, poderia resultar em modificações fenotípicas deletérias quando o organismo se encontra na ausência do xenobiótico (Coustau et al., 2000; Arnaud & Haubruge, 2002; Foster et al., 2003; Oliveira et al., 2007). De acordo com essa premissa, custos adaptativos associados à resistência a toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) expressas em plantas seriam expressos em ambientes livres de toxinas Bt (i.e., refúgios) (Gould 1998; Raymond et al., 2005). Contudo, custos associados à resistência nem sempre estão presentes em pragas resistentes a toxinas Bt (Gassmann et al., 2009). Teoricamente, a ausência de custo adaptativos deve-se aos os alelos de resistência não produzirem efeitos pleiotrópicos negativos (Guillemaud et al., 1998; Guedes et al., 2006) ou a evidência de modificadores do custo adaptativo presente em outro *loci* (Liu et al., 1996; Ribeiro et al., 2007).

Custos adaptativos das pragas resistentes a toxinas Cry de *B. thuringiensis* são requeridos para retardar ou reverter a evolução de resistência local a culturas transgênicas Bt (Gould, 1998; Carrière & Tabashnik, 2001; Carrière et al., 2010). Essa afirmativa é justificada porque o custo adaptativo reduz o coeficiente de seleção, favorecendo indivíduos suscetíveis em relação a indivíduos resistentes nos refúgios (Carrière et al., 2010). Nessas condições, o refúgio e outros ambientes sem exposição a toxinas Bt selecionam contra a resistência (Gassmann et al., 2009), o qual ajuda a diminuir a dispersão e a frequência de genes resistentes em campo (Carrière & Tabashnik, 2001; Tabashnik et al., 2005; Gassmann et al., 2009). Um fator chave que ajuda a modular a evolução da resistência em campo é o nível de dominância do custo adaptativo (Carrière & Tabashnik, 2001; Gould et al., 2006; Gassmann et al., 2009; Carrière et al., 2010). Custo adaptativo recessivo pode retardar e/ou reverter a evolução da resistência nos insetos pragas com resistência recessiva, e, semelhantemente, custo adaptativo dominante pode retardar e/ou reverter a evolução da resistência nos insetos

pragas com resistência dominante (Gassmann et al., 2009). Desta forma, estimativas precisas do custo adaptativo associado à resistência e seu nível de dominância são importantes para a compreensão da evolução da resistência, assim como para avaliar as práticas de manejo da resistência implementadas para mitigar a resistência em plantas transgênicas no campo (Gould, 1998; Carrière & Tabashnik, 2001; Tabashnik et al., 2005; Gould et al., 2006; Gassmann et al., 2009; Carrière et al., 2010).

Custos adaptativos são detectados quando um ou mais componentes de desempenho são significativamente inferiores nos insetos resistentes do que nos insetos suscetíveis ou quando a frequência do alelo resistente decai significativamente com o tempo (Gassmann et al., 2009). Portanto, a existência de custos associados à resistência tem sido avaliada por meio de comparações do ciclo de vida dos insetos, tais como sobrevivência, tempo de desenvolvimento, massa de larvas e pupas e parâmetros de fertilidade (Pereira et al., 2009; Crespo et al., 2010; Velez et al., 2013; Jakka et al., 2014). Isso também pode ser estudado monitorando-se a estabilidade da resistência na ausência da toxina Bt (Velez et al., 2013; Jakka et al., 2014). Além disso, o incremento na taxa metabólica poderia indicar redução na capacidade adaptativa do indivíduo, pois mais energia estaria sendo requerida para a destoxificação de pesticidas [(i.e., produção de enzimas proteolíticas que degradam a proteína Bt) (Li et al., 2004)] ou para a substituição de células intestinais danificadas (minimização de desajustes na permeabilidade seletiva da membrana do epitélio intestinal) em detrimento da reprodução e do crescimento (Soderlund & Bloomquist, 1990). Por tanto, mecanismos de resistência à toxina Bt podem ser associados a custo energético que pode ser medido como um aumento na taxa metabólica nos insetos resistentes e relação aos suscetíveis a Bt (Dingha et al., 2004).

Entre os casos de evolução da resistência em culturas transgênicas em campo é bem conhecido aquele de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em plantas de milho expressando Cyl1Fa em Porto Rico (Storer et al., 2010). No Brasil, tem havido reclamações de falhas de controle desta praga em culturas de milho Cry1Fa e recentemente foi documentado um caso de resistência em campo (Farias et al., 2014).

Esses casos alertam sobre o risco da possível perda do mais recente método de controle para o manejo de *S. frugiperda* em milho. Como o conhecimento do custo adaptativo associado à resistência é de suma importância para delinear estratégias visando retardar e/ou reverter a evolução da resistência e a resposta à pressão de seleção a inseticidas em cada praga é diferente (Bourguet et al., 1997), nós avaliamos os custos adaptativos em duas linhagens de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do Brasil. As linhagens foram previamente selecionadas para altos níveis de resistência a Cry1Fa usando folhas de milho do evento TC1507 (dados não publicados). Os resultados indicam ausência de diferenças significativas entre os parâmetros avaliados em linhagens resistente e suscetíveis a Bt, e dos híbridos originados dos cruzamentos recíprocos entre estas linhagens. Os resultados deste estudo e os reportados em outros trabalhos sugerem que as mutações que conferem resistência a Cry1Fa em *S. frugiperda*, não comprometem sua adaptabilidade, o que têm importantes implicações para o manejo da resistência dessa espécie a toxinas Bt expressas em milho e em outras culturas Bt, os quais são aqui discutidos.

## MATERIAL E METODOS

### Origem e manutenção dos insetos

Duas linhagens foram usadas como suscetíveis nos experimentos, uma linhagem (Lab-SS) mantida sem exposição a inseticidas por mais de quinze anos em laboratório e outra (MT) originada de coletas de campo em quatro estados produtores de milho no Brasil. A linhagem MTH resistente a Cry1Fa foi originada a partir da linhagem MT por exposições contínuas ao milho transgênico, que expressa a proteína Cry1Fa de *B. thuringiensis* var *aizawai* (evento TC1507) (dados não publicados). Uma segunda linhagem resistente (IrmaF) foi originada de insetos coletados em lavouras de milho transgênico Cry1Fa em dois municípios de Minas Gerais (Brasil), e, selecionada para resistência a Cry1Fa usando o evento de milho transgênico TC1507 (Leite, 2012). Todas as linhagens foram mantidas usando a metodologia de criação de Kasten et al., (1978), com ligeiras modificações.

As comparações do custo adaptativo foram feitas usando quatro genótipos de lagarta-do-cartucho: resistente a Cry1Fa (RR), suscetível (SS), assumidos como homozigotos resistentes e suscetíveis, respectivamente, e as duas progênies derivadas dos cruzamentos recíprocos entre a linhagem resistente e suscetível ( $S^{\square}R^{\triangle}$  e  $S^{\triangle}R^{\square}$ ). Para gerar genótipos heterozigotos, cento e vinte pupas das linhagens resistente e suscetível foram separadas por sexo (Heinrich, 1919; Capinera, 2000). Posteriormente estas foram acondicionadas em gaiolas de PVC (40 cm de altura x 30 cm Ø) para o acasalamento dos adultos ( $S^{\square}\times R^{\triangle}$  e  $S^{\triangle}\times R^{\square}$ ). Para proporcionar um substrato de oviposição as gaiolas foram recobertas internamente com folhas de papel sulfite. Os ovos foram coletados a cada dois dias durante quatro dias e colocados em sacolas plásticas (35 x 40 cm) até a eclosão. Os adultos foram alimentados com uma solução com 10% açúcar e 5% ácido ascórbico embebida em algodão para alimentação (Kasten Jr. et al., 1978). As criações foram mantidas em ambiente controlado com temperatura de  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 15\%$  e fotoperíodo de 14L: 10E.

### **Obtenção de linhagem resistente isogênica à população susceptível por introgressão**

Em estudos de custos adaptativos ligados à resistência a inseticidas é importante assegurar que a base genética entre a população suscetível e a resistente seja similar, isto diminui a possibilidade de que a diferença observada entre as duas linhagens seja derivada da variação genética e não à presença do caráter de resistência (Bergelson & Purrington, 1996; Raymond et al., 2011). Portanto, foi realizada a introdução do caráter resistente a Cry1Fa da linhagem IrmaF à linhagem Lab-SS. Isto foi conseguido usando protocolo de introgressão, que é o método mais rigoroso para gerar pares combinados de linhagens resistentes e suscetíveis isogênicos (Bergelson & Purrington, 1996). Para a introgressão a linhagem resistente foi cruzada com a suscetível, sendo a progênie F1 mantida em milho P30F35 (não-Bt) isogênico do P30F35H (Bt), que expressa a forma ativa da toxina Cry1Fa. A progênie na geração F2 e F3 foi selecionada para resistência a Cry1Fa usando folhas de milho P30F35H (Bt). Posteriormente na geração F4, esta linhagem híbrida foi retrocruzada com a linhagem suscetível e sua progênie nas gerações F2 e F3 novamente foi selecionada com Cry1Fa como descrito acima. Esse

retrocruzamento e processo de seleção foram repetidos três vezes conforme adaptado de Wang et al., (2007).

Para confirmar o nível de resistência a Cry1Fa alcançado pela nova linhagem (Lab-RR), foi estimada a concentração da toxina que causa 50% de mortalidade ( $CL_{50}$ ) e de inibição de crescimento ( $CE_{50}$ ). Os bioensaios foram feitos mediante a exposição de neonatas a diferentes concentrações da proteína Cry1Fa aplicada superficialmente sobre dieta artificial (Marçon et al., 1999). O fator de resistência para as linhagens Lab-RR e IrmaF foi calculado com base na  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  da linhagem suscetível (POLO-PC, LeOra Software, 2007) (Robertson et al., 1995, 2007). A sobrevivência de neonata até pupa em milho expressando Cry1Fa foi comparada entre estas três linhagens (IrmaF, Lab-RR e Lab-SS). A proteína Cry1Fa utilizada nos bioensaios foi obtida do laboratório da Dra. Marianne P. Carey, (Case Western Reserve University, OH). A proteína foi ativada com tripsina e purificada em HPLC, sendo fornecida na forma liofilizada. A toxicidade da Cry1Fa do estoque utilizado nos bioensaios para *S. frugiperda* foi semelhante àquela obtida em outros laboratórios tais, como da University of Nebraska-Lincoln (Velez et al., 2013).

### **Fontes de tecido foliar de milho não Bt**

Os parâmetros do custo adaptativo dos genótipos resistentes, suscetíveis e heterozigotos foram estimados usando folhas de milho estágio V4-V9, híbrido P30F35 (não-Bt) (DuPont Pioneer, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil). O milho foi semeado em vasos de 4 L no campo experimental da Universidade Federal de Viçosa. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes, mantendo-se quatro plantas por vaso após desbaste. As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas aos 10 e 35 dias com 40 g de NPK 08-28-16 por vaso. Os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para o cultivo de milho (Cruz, 2010), sem aplicação de pesticidas, sendo o controle de plantas daninhas realizado manualmente.

### **Tempo de desenvolvimento, peso de pupa e taxa de crescimento**

Sessenta e quatro lagartas neonatas de cada genótipo (RR, SS, S♀R♂, S♂R♀) selecionadas ao acaso foram pesadas e colocadas individualmente sobre folhas de milho dispostas em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP). Os fragmentos de folha de milho foram trocados a cada dois dias até que as lagartas alcançassem a fase de pupa. O tempo de desenvolvimento até pupa foi calculado com base no dia da eclosão das lagartas até a pupação, sendo o peso e sexo das pupas determinado no primeiro dia em que foram observadas no recipiente de criação. A taxa de crescimento (GR) foi calculada utilizando a fórmula proposta por Radford, (1967):  $GR = [W_2 \text{ (mg)} - W_1 \text{ (mg)}]/T$ , onde  $W_1$  e  $W_2$  são o peso das lagartas neonatas (< de 24 h de eclosão) e das pupas, respectivamente, e  $T$  é o tempo em dias de lagarta neonata até estágio de pupa (Sayyed & Wright, 2001).

### **Fecundidade e número de descendentes produzidos**

Com machos e fêmeas virgens obtidos no estudo de tempo de desenvolvimento, foram formados quinze casais para cada genótipo (RR, SS, S♀R♂, S♂R♀). Cada casal foi disposto em uma gaiola de PVC (10 cm altura x 10 cm Ø) e mantido conforme já descrito. Para estimar a fecundidade de cada genótipo, o número de ovos colocados por cada casal foi registrado diariamente até o final do período de oviposição (sete dias). As massas de ovos foram pesadas e transferidas individualmente para potes plásticos de 200 mL para a eclosão das lagartas. A fertilidade dos ovos foi determinada contando diariamente o número de neonatas eclodidas em cada massa de ovos. Para determinar a sobrevivência de larva neonata a adulto e o número de fêmeas produzidas por cada parental fêmea foram usadas 16 lagartas neonatas de cada casal (Pereira et al., 2009; Crespo et al., 2010; Velez et al., 2013). As lagartas foram alimentadas com milho P30F35, conforme já descrito.

## **Experimentos de tabela de vida**

Os parâmetros relacionados com o crescimento populacional foram calculados usando a informação gerada no experimento de fecundidade e número de descendentes produzidos. Para os quatro genótipos (RR, SS, S♀R♂, S♂R♀) os parâmetros calculados com a tabela de fertilidade foram taxa líquida reprodutiva (produção de fêmeas por fêmea parental,  $R_o$ ), tempo médio de uma geração (T), taxa intrínseca de crescimento populacional (produção diária de fêmeas por fêmea parental,  $r_m$ ) e tempo médio para que a população dobre o tamanho (DT). Estes foram determinados como descrito por Birch, (1948) e Carey, (1993) usando o método descrito por Maia et al., (2000) no programa SAS (SAS Institute, 2011).

## **Taxa de respiração larval**

Ensaio de respirometria foram realizados em condições de laboratório utilizando-se um respirômetro do tipo TR3C equipado com um analisador de CO<sub>2</sub> (Sable System International, Las Vegas, EUA), usando a metodologia adaptada de Guedes et al. (2003; 2006). Para mensuração da taxa respiratória média (produção de CO<sub>2</sub>) foram tomadas ao acaso 15 lagartas de quarto instar (14 dias) de cada genótipo e acondicionados individualmente em câmeras com capacidade volumétrica de 25 mL. As câmeras foram conectadas a um sistema completamente fechado por três horas antes da varredura do CO<sub>2</sub> produzido pelos insetos. Na varredura o CO<sub>2</sub> produzido pelos insetos (µmL de CO<sub>2</sub> por inseto por hora) foi removido por um fluxo de ar isento de CO<sub>2</sub> e mensurado por um leitor infravermelho de CO<sub>2</sub> conectado ao sistema.

## **Estabilidade da resistência**

Os testes de estabilidade da resistência a Cry1Fa foram realizados usando os cruzamentos recíprocos entre as linhagens MTH×MT e Lab-RR×Lab-SS, utilizados nos experimentos de crescimento populacional (esta geração representou a F0 para cada linhagem). Os adultos da progênie dos cruzamentos recíprocos (S♀R♂ e S♂R♀) foram

cruzados entre si, usando gaiolas de acasalamento já descritas (esta geração representou a F1 para cada linhagem). Desta forma foram geradas as linhagens MT-RS e Lab-RS, cada uma contendo indivíduos com genótipos previstos homozigotos suscetíveis e resistentes, assim como heterozigotos (Jakka et al., 2014). As duas linhagens foram mantidas com um mínimo de 200 adultos por sete gerações, sendo a cada geração avaliada a estabilidade da resistência por meio da sobrevivência dos homozigotos resistentes.

Para estimar o número de larvas homozigotas resistentes sobreviventes em cada geração, foi estabelecida previamente para cada linhagem uma concentração discriminatória de Cry1Fa que elimina genótipos homozigotos suscetíveis (SS) e heterozigotos (RS), permitindo só a sobrevivência de homozigotos resistentes (RR). Essa concentração discriminatória foi estimada por meio da exposição de larvas neonatas da geração F0 a diferentes concentrações da proteína Cry1Fa aplicada superficialmente sobre dieta artificial (Marçon et al., 1999).

Em cada geração foram testados 224 indivíduos em média usando bioensaios já descritos (Marçon et al., 1999) e o mesmo estoque de toxina purificada Cry1Fa dos experimentos da confirmação do nível de resistência da linhagem Lab-RR. Para ambas as linhagens (MT-RS e Lab-RS) a estabilidade da resistência foi examinada comparando a porcentagem de sobrevivência observada nos bioensaios com a concentração diagnóstica durante sete gerações (Jakka et al., 2014).

### **Análises dos dados**

O peso de pupas, o tempo de desenvolvimento e a taxa relativa de crescimento (GR) foram analisados por meio de uma análise de variância de duas vias (ANOVA), com os genótipos e sexo como efeitos principais. As medias destes dados e as de peso de ovos por dia, numero de ovos e neonatas por fêmea, taxa respiratória ( $\mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1} / \text{inseto}$ ) e sobrevivência entre gerações foram submetidas ao teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD,  $P < 0,05$ ) (PROC GLM) (SAS Institute, 2011) para

comparar os tratamentos. Para todos os dados foi empregada a análise de resíduos para verificar se os pressupostos de homogeneidade de variância e normalidade foram atendidos (PROC MIXED, PROC UNIVARIATE) (SAS Institute, 2011), não sendo necessária transformação dos dados.

As variâncias associadas com os parâmetros de crescimento populacionais foram estimadas pelo método de Jackknife (Efron, 1982; Meyers et al., 1986), utilizando a programação em SAS desenvolvido por Maia et al., (2000). O programa permite o cálculo dos intervalos de confiança para todos os parâmetros estimados e fornece testes de t unilaterais e bilaterais para realizar a comparação pareada ou múltipla entre grupos usando seus respectivos valores de *P*.

## RESULTADOS

### **Obtenção de linhagem resistente isogênica à população susceptível por introgressão**

A transferência do gene de resistência Cry1Fa à população de laboratório foi realizada por cruzamentos e retrocruzamentos com a linhagem suscetível. A linhagem resultante, Lab-RR, quase isogênica à linhagem suscetível mostrou um nível de resistência a Cry1Fa semelhante ao que apresentou a linhagem parental IrmaF, como indicado nos bioensaios com a toxina exposta em dieta artificial (Tabela 1) e na porcentagem de sobrevivência em plantas de milho transgênicas expressando Cry1Fa (Lab-RR:  $52.50 \pm 6.42$ ; IrmaF:  $58.12 \pm 4.93$ ; Lab-SS:  $61.87 \pm 2.45$ ;  $F= 0.48$ ; d.f.= 2, 45;  $P = 0.40$ ).

### **Tempo de desenvolvimento, peso de pupa e taxa de crescimento**

Não houve diferenças significativas ( $P > 0.05$ ) entre sexos, genótipos e a interação genótipo  $\times$  sexo para peso de pupa entre as linhagens homocigotas MTH (R) e MT (S) e, as heterocigotas produzidas dos cruzamentos recíprocos entre estas linhagens ( $S\text{♀}R\text{♂}$  e  $S\text{♂}R\text{♀}$ ). No entanto, foram encontradas diferenças significativas para taxa de

crescimento entre os sexos para os genótipos MTH e MT (além de seus heterozigotos de cruzamentos recíprocos), e entre os genótipos e a interação genótipo × sexo para os genótipos Lab-RR, Lab-SS e seus heretorizotos de cruzamentos recíprocos (Tabela 2). Para as linhagens Lab-RR e Lab-SS e heterozigotos dos cruzamentos recíprocos entre elas ( $S_{\text{♀}}R_{\text{♂}}$  e  $S_{\text{♂}}R_{\text{♀}}$ ), foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) somente na interação genótipo × sexo para peso de pupa (Tabela 2).

O peso de pupa, tempo de desenvolvimento e a taxa de crescimento das linhagens homozigotas resistentes (MTH e Lab-RR) e suscetíveis (MT e Lab-SS) e das heterozigotas produzidas com os cruzamentos recíprocos respectivos ( $S_{\text{♀}}R_{\text{♂}}$  e  $S_{\text{♂}}R_{\text{♀}}$ ), são apresentadas nas Figuras 1a-d. Não se registrou diferenças significativas entre indivíduos homozigotos suscetíveis MT e os resistentes MTH em todos estes parâmetros ( $P > 0.05$ ). Nos indivíduos homozigotos suscetíveis Lab-SS a taxa de crescimento foi significativamente menor do que a registrada nos resistentes Lab-RR ( $P < 0.05$ ). Para os heterozigotos produzidos com as linhagens homozigotas MTH e MT houve diferenças significativas entre machos e fêmeas no tempo de desenvolvimento e no peso de pupa (Figura 1a, b). Para heterozigotos produzidos com as linhagens Lab-RR e Lab-SS registraram se diferenças significativas para todos os parâmetros avaliados ( $P < 0.05$ ).

### **Fecundidade e número de descendentes produzidos**

Não se detectou diferenças significativas entre os genótipos homozigotos MTH e MT e os heterozigotos produzidos entre eles ( $S_{\text{♀}}R_{\text{♂}}$  e  $S_{\text{♂}}R_{\text{♀}}$ ) para peso de ovos por dia ( $F = 1.45$ ; d.f.= 3, 157;  $P = 0.23$ ), número de ovos por fêmea ( $F = 0.13$ ; d.f.= 3, 38;  $P = 0.94$ ) e número de neonatas por fêmea ( $F = 0.16$ ; d.f.= 3, 38;  $P = 0.92$ ). Similarmente, entre os genótipos homozigotos Lab-RR e Lab-SS e os heterozigotos produzidos entre eles ( $S_{\text{♀}}R_{\text{♂}}$  e  $S_{\text{♂}}R_{\text{♀}}$ ), não houve diferença significativa no peso de ovos por dia ( $F = 1.36$ ; d.f.= 3, 158;  $P = 0.2571$ ); número de ovos por fêmea ( $F = 0.42$ ; d.f.= 3, 40;  $P = 0.74$ ); e número de neonatas por fêmea ( $F = 0.19$ ; d.f.= 3, 38;  $P = 0.90$ ). Contudo, as duas linhagens, resistentes MTH e Lab-RR apresentaram as menores médias em todos esses parâmetros (Tabela 3) e curiosamente, os dois heterozigotos derivados das fêmeas

resistentes (MTH♀ × MT♂ e Lab-RR ♀ × Lab-SS♂) apresentaram as maiores médias nessas três variáveis (Tabela 3).

### **Experimentos de tabela de vida**

Não houve diferenças significativas entre os indivíduos resistentes e suscetíveis MTH e MT e entre os indivíduos resistentes e suscetíveis Lab-RR e Lab-SS, para a taxa líquida reprodutiva ( $R_0$ ) e a taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ) (Tabela 4). Curiosamente o número de fêmeas produzidas por fêmea parental ( $R_0$ ) foi maior nos dois heterozigotos derivados das fêmeas resistentes (MTH♀ × MT♂ e Lab-RR ♀ × Lab-SS♂) (Tabela 4). Semelhantemente, o tempo médio por geração foi similar entre linhagens homozigotas resistentes e suscetíveis. Contudo, o tempo necessário para estas dobrarem seu tamanho foi maior do que o requerido nos heterozigotos. Essas diferenças no desempenho do heterozigoto sugerem a presença de vigor híbrido, o qual também foi encontrado em trabalhos realizados com a população resistente de *S. frugiperda* de Porto Rico (Velez et al., 2013).

### **Taxa de respiração larval**

Diferenças significativas na taxa de respiração, medidas como produção de CO<sub>2</sub> (µmL de CO<sub>2</sub> por inseto por hora), foram observadas entre larvas dos genótipos homozigotos (resistente e suscetível) e os heterozigotos produzidos entre si (S♀R♂ e S♂R♀) ( $F = 20.07$  df =3, 55;  $P < 0.05$ ). As larvas heterozigotas mostraram uma taxa de respiração significativamente maior do que seus pais homozigotos resistentes e suscetíveis (Figura 2a,b). Contudo, não se registraram diferenças significativas na taxa de respiração entre os homozigotos resistentes e suscetíveis (MTH vs MT e Lab-RR vs Lab-SS).

### **Estabilidade da resistência**

A concentração discriminatória estimada para testar a estabilidade da resistência nas linhagens MT-RS e Lab-RS foi de 1977.8 ng.cm<sup>-2</sup> e 2456.5 ng.cm<sup>-2</sup> de toxina Cry1Fa, respectivamente. Essas concentrações são as necessárias para eliminar 99% (CL<sub>99</sub>) dos indivíduos homozigotos suscetíveis (SS) e heterozigotos (RS), sem causarem mortalidade nos indivíduos homozigotos resistentes. Os bioensaios com essas concentrações discriminatórias nas duas linhagens não detectaram diferenças significativas na porcentagem de sobrevivência larval entre as larvas das sete gerações testadas (MT-RS: df = 6, 97; P= 0.68; Lab-RS: df = 6, 97; P= 0.60). Embora a sobrevivência das larvas resistentes tenha decrescido depois da primeira geração em ambas as linhagens, a porcentagem de sobrevivência na sétima geração se mantém perto a 20% em ambas as linhagens (Figura 3), sugerindo uma frequência constante dos indivíduos resistentes e indicando que a resistência nas linhagens é estável, pelo menos durante as gerações testadas.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudadas as características de história de vida de duas linhagens resistentes de *S. frugiperda* a Cry1Fa com diferente base genética. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre genótipos resistentes e suscetíveis na taxa líquida reprodutiva (R<sub>0</sub>) e taxa intrínseca de crescimento populacional (r<sub>m</sub>). Além disto, a fecundidade indicou menor peso de ovos por dia, número de ovos por fêmea e número de neonatas por dia nas duas linhagens resistentes (MTH e Lab-RR), sem serem significativamente diferentes a suas respectivas linhagens suscetíveis isogênicas (MT e Lab-SS) e aos híbridos originados de seus cruzamentos recíprocos respectivos (Tabela 3). Esses dados, somados aos registrados nos experimentos de taxa de respiração larval, onde não se evidenciou diferenças significativas entre as taxas metabólicas de insetos resistentes e suscetíveis indicam ausência de custo adaptativo associado à resistência a Cry1Fa. Esta conclusão é reforçada ainda mais pela constatação da estabilidade da resistência a Cry1Fa por sete gerações para as duas linhagens de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil e selecionadas para altos níveis de resistência com milho

Bt TC1507. Estes resultados são similares aos reportados para *S. frugiperda* resistente ao milho Cry1Fa detectada em Porto Rico em condições de campo (Velez et al., 2013) e aos registrados por Jakka et al. (2014) com uma população coletada em Porto Rico, mantida também em laboratório sob pressão de seleção com folhas de milho Bt TC1507 por 30 gerações.

Os indivíduos heterozigotos apresentaram igual, ou melhor, desempenho relativo aos homozigotos suscetíveis em variáveis nas quais foi detectado pequenas desvantagens adaptativas nos homozigotos resistentes (taxa líquida reprodutiva ( $R_0$ ), taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ), fecundidade, número de descendentes produzidos). Isto indica que se existir custo adaptativo, este deve ser recessivo, como normalmente tem sido documentado para resistência a toxinas Bt (Gassmann et al., 2009). Estes resultados têm implicações importantes para o manejo da resistência, porque custos recessivos favorecem a permanência, e em alguns casos, o aumento da frequência do alelo resistente ( $r$ ) nos refúgios (Carrière & Tabashnik, 2001; Gould et al., 2006). Contudo, algumas modelagens da evolução da resistência indicam que dependendo do tamanho do refúgio e dos custos adaptativos nos indivíduos resistentes nas plantas Bt (i.e., no caso de resistência incompleta), custos recessivos podem ajudar a retardar ou reverter a evolução de resistência recessiva em culturas Bt (Gassmann et al., 2009). Em *S. frugiperda*, a herança da resistência e do custo adaptativo se ajustam a esse modelo (Storer et al., 2010; Alves et al., 2013; Jakka et al., 2014; Farias et al., 2014), sugerindo que a manipulação do refúgio poderia ser uma ferramenta melhor explorada no manejo da resistência dessa espécie em cultivos de milho Bt, inclusive em áreas onde a resistência já evoluiu.

As estimativas de custo adaptativo nos insetos resistentes foram feitas usando pedaços de folhas de milho, condição ótima para o desenvolvimento de *S. frugiperda*, o que poderia influenciar a não expressão de custos associados à resistência, já que estes podem ser mais aparentes em condições desfavoráveis (Janmaat & Myers, 2005; Raymond et al., 2005; Raymond et al., 2011). Contudo, estimativas de custos adaptativos realizadas em outras populações de *S. frugiperda* resistentes à toxina

Cry1Fa, usando diferentes fontes de alimentos como dieta artificial, milho, soja e algodão, também não identificaram custos associados à resistência (Velez et al., 2013; Jakka et al., 2014). A falta de custo adaptativo associado à resistência a Cry1Fa em *S. frugiperda*, poderia estar ligada ao mecanismo de resistência destas populações, o qual foi associado à redução de ligação ao receptor fosfatase-alcálica (ALP) nas duas populações deste estudo (dados não publicados) e na população de Porto Rico (Jurat-Fuentes et al., 2011). Esta enzima, à semelhança de outras associadas à resistência a toxinas Bt [aminopeptidases (APN) e caderina (CAD) (Gahan et al., 2001; Rajagopal et al., 2002; Heckel et al., 2007)], poderia estar envolvida na proteção da membrana do intestino médio e/ou na absorção e assimilação de nutrientes, produzindo assim, efeitos subletais como baixo peso larval e maior tempo de desenvolvimento (Gassmann et al., 2009), sem comprometer funções que afetem a viabilidade do inseto.

Por outro lado, os resultados do estudo de respirometria não evidenciaram diferenças na taxa de respiração larval entre as linhagens resistentes e suscetíveis, mostrando que, aparentemente, as linhagens resistentes não apresentam incrementos na taxa metabólica, como tem sido sugerido quando há produção de enzimas de detoxificação (Soderlund & Bloomquist, 1990). Portanto, nós inferimos que não há redução no fitness, por causa de uma possível realocação de energia em outras funções, que poderiam incorrer em detrimento da reprodução e do crescimento. Isto também foi reportado para uma linhagem de *Spodoptera Exigua* resistente a Cry1Ac (Dingha et al., 2004). Este resultado reforça a hipótese que a alteração dos receptores específicos de ligação das proteínas Cry (localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio) seja a causa da resistência em *S. frugiperda*. Este mecanismo parece não causar efeitos negativos na capacidade adaptativa dos indivíduos resistentes potencialmente limitando-se a assimilação deficiente de nutrientes. Esta limitação na assimilação de nutrientes ser superada pelo incremento da expressão de isoformas alternativas desses receptores, minimizando assim seus os custos adaptativos, como foi sugerido por Jakka et al., (2014) para *S. frugiperda* e por Tiewisiri & Ping, (2011) para *Trichoplusia ni*.

Embora resistência a inseticidas confira uma vantagem seletiva na presença do xenobiótico, o gene de resistência raramente é fixado em populações naturais e tende a diminuir na ausência do xenobiótico (Coustauet al., 2000), porém quando os alelos que conferem resistência não apresentam custos adaptativos, eles tendem a manter-se na população, tornando estável a resistência (Tabashnik et al., 1994). Os resultados do estudo de estabilidade da resistência indicam que a resistência se mantém estável por sete gerações, sugerindo fortemente que a resistência nas duas linhagens (MTH e Lab-RR) não apresenta custo em condições de laboratório, como também mostraram as comparações dos parâmetros de história de vida. Estudos baseados no monitoramento da frequência do alelo de resistência na ausência da pressão de seleção indicaram que a frequência do alelo de resistência se manteve estável em populações de *S. frugiperda* de Porto Rico, sugerindo que em campo também não existem custos adaptativos associados ao alelo de resistência para esta espécie (Velezet al., 2013).

Neste trabalho foi documentada a ausência de custo adaptativo associado à resistência a Cry1Fa em duas linhagens de *S. frugiperda* com bases genéticas diferentes. Esse resultado tem implicações importantes para o manejo da resistência de *S. frugiperda* em plantas transgênicas Bt, porque, considerando essa evidência, indivíduos portadores do alelo de resistência tendem a manter sua frequência em populações de campo e, por migração, tais alelos podem ser levados a outras regiões. Além disso, a tendência de não reversão e consequente manutenção da frequência do gene de resistência a Cry1Fa pode favorecer a adaptação desse inseto a outras toxinas de Bt, resultando em resistência múltipla por seleção sequencial ou resistência cruzada por causa da semelhança nos sítios de ligação entre as toxinas Cry1 em *S. frugiperda* (Hernandez-Rodriguez et al., 2013). Tal fato aumenta o risco de resistência desta praga a outras culturas transgênicas que expressam toxinas Bt. Desta forma, é importante a adoção de medidas eficazes para reduzir a taxa de evolução de resistência considerando a ausência de custo adaptativo associado a ela em *S. frugiperda*, já que uma vez ocorrendo a resistência nesta espécie é difícil revertê-la. Isto pode comprometer o uso de culturas transgênicas para seu controle onde ocorra, como no Brasil.

**Tabela 1.** Toxicidade da proteína CylF disposta para as populações resistente (IrmaF), selecionada por introgressão e susceptível (LabSS) de *Spodoptera frugiperda*

População	n	Mortalidade				Inibição de crescimento			
		Inclinação ± EP	CL <sub>50</sub> (95% IC) <sup>a</sup>	FR <sup>b</sup>	χ <sup>2</sup>	Inclinação ± EP	CL <sub>50</sub> (95% IC) <sup>a</sup>	FR <sup>b</sup>	χ <sup>2</sup>
IrmaF	479	nc <sup>c</sup>	>10.000	>183.04	nc*	0.26 ± 0.06	>2100	>10.000	nc*
Lab-RR	256	nc <sup>c</sup>	>10.000	>183.04	nc*	nc*	>2100	>10.000	nc*
Lab-SS	998	2.08 ± 0.25	54.63 (38.02 - 70.06)		4.03*	1.74 - 1.08	4.76 (0.09 - 21.11)		0.43*

a concentração letal em ng (nanogramas)/cm<sup>2</sup> de Cry1Fa na superfície da dieta.

b Fator de resistência, CL<sub>50</sub>/CL<sub>50</sub> Lab., com respectivo intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Robertson et al., 2007).

c Não calculado devido a insuficiente concentração – resposta.

\*Falta de ajuste não significativo ( $P > 0.05$ ), indica que modelo de próbite se ajustou aos dados.

**Tabela 2.** Valores e probabilidades de teste-*F* para a análises de variancia de dois fatores sobre componentes de custos adaptativos em quatro genótipos de *S. frugiperda* alimentadas com o híbrido de milho P30F35 (não-Bt).

Linhagens ou cruzamentos	df	Peso de pupa		Tempo de desenvolvimento		Taxa de crescimento <sup>1</sup>	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<b>MTH × MT</b>							
Sexo	1	2.95	0.08	3.28	0.07	5.64	0.01*
Genótipos	3	1.89	0.13	3.78	0.01*	1.01	0.38
Genótipo × Sexo	3	0.33	0.80	2.73	0.04*	1.29	0.27
Erro	156						
<b>Lab-RR × Lab-SS</b>							
Sexo	1	10.68	0.01*	4.01	0.04*	10.79	0.01*
Genótipos	3	5.23	0.01*	7.46	0.01*	6.28	0.01*
Genótipo × Sexo	3	2.40	0.07	3.93	0.09	3.96	0.01*
Erro	152						

As médias foram obtidas de 40 a 55 indivíduos.

<sup>1</sup>Taxa de crescimento = [(peso de pupa – peso inicial) / número de dias].

**Tabela 3.** Comparação de parâmetros de fecundidade em quatro genótipos de *S. frugiperda* alimentados com o híbrido de milho P30F35 (não-Bt)

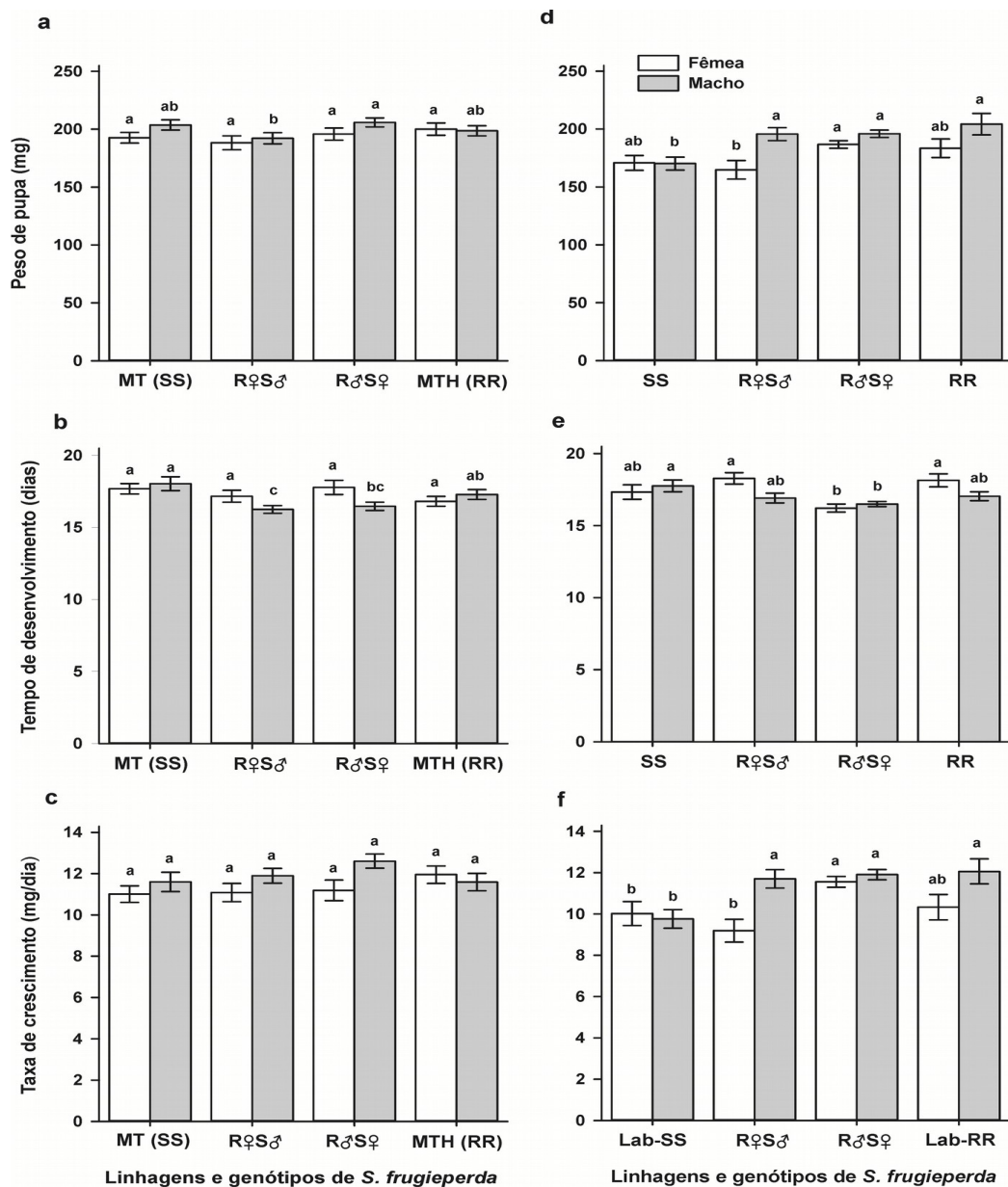
Linhagem ou cruzamentos	Peso de ovos/dia (mg)	No. Ovos / fêmeas	No. Neonatas / fêmea
<b>MTH × MT</b>			
RR	15.1 ± 1.4a	1206.8 ± 267.1a	759.9 ± 136.9a
(R♀S♂)	20.6 ± 1.7a	1427.6 ± 323.5a	894.8 ± 159.5a
(R♂S♀)	16.0 ± 2.5a	1268.0 ± 229.0a	770.0 ± 174.6a
SS	16.9 ± 3.3a	1286.0 ± 273.4a	813.9 ± 153.8a
<b>Lab-RR × Lab-SS</b>			
RR	12.1 ± 2.6a	1003.0 ± 217.0a	615.3 ± 95.7a
(R♀S♂)	18.1 ± 2.5a	1272.4 ± 154.7a	752.4 ± 105.6a
(R♂S♀)	15.6 ± 2.2a	1103.1 ± 284.6a	732.5 ± 187.2a
SS	12.9 ± 2.3a	1015.3 ± 159.4a	695.9 ± 123.8a

Para cada parâmetro de fecundidade as médias (± erro padrão) com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD protegido por ANOVA, *P* > 0,05.

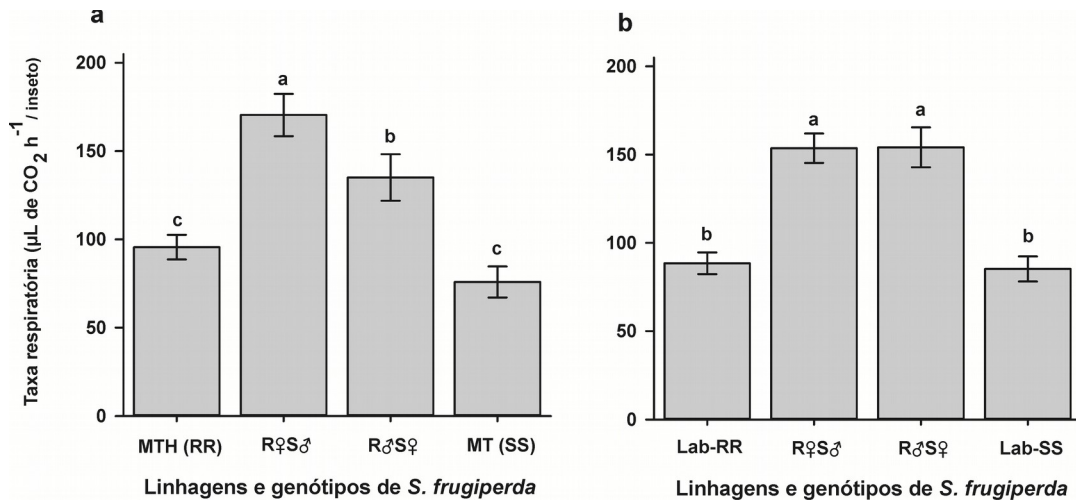
**Tabela 4.** Comparação de parâmetros de crescimento populacional (média e intervalo de confiança 95%) para quatro genótipos de *S. frugiperda* alimentadas com o híbrido de milho P30F35 (não-Bt).

Linhagem ou cruzamentos	Parâmetros de crescimento populacional			
	$R_o$	$r_m$	$T$	$DT$
<b>MTH × MT</b>				
RR	178.6 a (104.4 - 252.9)	0.20 a (0.17 - 0.22)	25.7 ab (24.5 - 26.8)	3.42 a (3.03 - 3.80)
(R♀S♂)	230.5 a (119.3 - 341.8)	0.21 a (0.19 - 0.24)	24.9 b (24.1 - 25.8)	3.15 a (2.76 - 3.55)
(R♂S♀)	165.9 a (91.0 - 240.9)	0.19 a (0.17 - 0.21)	26.3 a (25.2 - 27.4)	3.55 a (3.14 - 3.95)
SS	183.0 a (101.9 - 264.2)	0.19 a (0.17 - 0.22)	26.4 a (25.1 - 27.7)	3.50 a (3.08 - 3.91)
<b>Lab-RR × Lab-SS</b>				
RR	144.7 b (92.3 - 197.2)	0.18 b (0.17 - 0.19)	27.1 a (26.6 - 27.6)	3.77 a (3.53 - 4.01)
(R♀S♂)	223.8 a (155.4 - 292.2)	0.20 a (0.19 - 0.22)	26.1 a (25.1 - 27.2)	3.34 b (3.08 - 3.59)
(R♂S♀)	178.6 ab (75.3 - 281.4)	0.18 ab (0.16 - 0.21)	27.8 a (25.0 - 27.2)	3.70 a (3.21 - 4.18)
SS	148.3 b (90.3 - 206.4)	0.18 b (0.16 - 0.19)	27.7 a (27.1 - 28.2)	3.82 a (3.52 - 4.12)

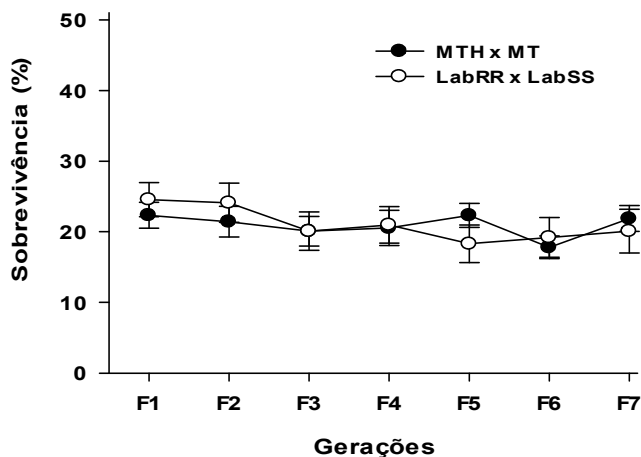
$R_o$ , taxa neta reprodutiva (fêmeas/fêmea/geração);  $r_m$ , taxa intrínseca de incremento populacional (por dia);  $T$ , tempo médio por geração (dias);  $DT$ , tempo para que a população dobre o tamanho. Para cada parâmetro, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si significativamente ( $P > 0.05$ ) por o método jackknife usando o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2011) (Maia et al., 2001).



**Figura 1.** Taxa de crescimento, tempo de desenvolvimento e peso de pupa de quatro genótipos de *S. frugiperda*. (a, b, c) Linhagem homocigota resistente MTH e suscetível MT a Cry1Fa e, os cruzamentos recíprocos produzidos entre si. (d, e, f) Linhagem homocigota resistente Lab-RR e suscetível Lab-SS a Cry1Fa e os cruzamentos recíprocos produzidos entre si. As médias ( $\pm$  erro padrão) como mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD protegido por ANOVA,  $P > 0,05$ . O número de indivíduos de cada genótipo avaliados variou de 40 a 55.



**Figura 2.** Produção de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{L de CO}_2 \text{ h}^{-1} / \text{inseto}$ ) de grupos de larvas de quatro genótipos de *S. frugiperda*. (a) Linhagem homocigota resistente MTH e suscetível MT a Cry1Fa e, os cruzamentos recíprocos produzidos entre si e (b) Linhagem homocigota resistente Lab-RR e suscetível Lab-SS a Cry1Fa e os cruzamentos recíprocos produzidos entre si. As médias ( $\pm$  erro padrão) com mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD protegido por ANOVA,  $P > 0,05$ . O número de indivíduos de cada genótipo avaliados foi de 14.



**Figura 3.** Estabilidade da resistência para duas linhagens de *S. frugiperda* (MTH×MT e LabRR×LabSS) à toxina Cry1Fa. Médias ( $\pm$  erro padrão) de porcentagem de sobrevivência em neonatas obtidas usando a concentração discriminatória para a toxina Cry1Fa durante sete gerações.

## REFERÊNCIAS

- Arnaud, L.; Haubruge, E. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. **Evolution**, v. 56, p. 2435-2444, 2002.
- Bergelson, J.; Purrington, C.B. Surveying patterns in the cost of resistance in plants. **The American Naturalist**, v. 148, p. 536-558, 1996.
- Birch, L.C.-The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **Journal of Animal Ecology**, v. 17, p. 15-26, 1948.
- Bourguet, D.; Lenormand, T.; Guillemaud, T.; Marcel, V.; Fournier, D.; Raymond, M. Variation of dominance of newly arisen adaptive genes.-**Genetics**, v. 147, p. 1225-1234, 1997.
- Capinera, J.-Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*-(J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). The University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. (UF/IFAS), 2000.
- Carey, J.R. Applied demography for biologists with special emphasis on insects.-**Oxford University Press**, Oxford. 1993.
- Carrière, Y.; Tabashnik, B.E. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 268, p. 1475-1480, 2001.
- Carrière, Y.; David, W.; Crowder, W.; Tabashnik, B.E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, v. 3, p. 561-573, 2010.
- Chown, S.L.; Gaston, K. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. **Biological Research**, v. 74, p. 87-120, 1999.
- Coustau, C.; Chevillon, C.; French-Constant, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 378-383, 2000.
- Crespo, A.L.B.; Spencer, T.A.; Tan, S.Y.; Siegfried, B.D. Fitness cost of Cry1Ab resistance in a field-derived strain of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal Economic Entomology**, v. 103, p.1386-1393, 2010.
- Dingha, B.N.; Moar, W.J.; Appel, A.G. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin on the metabolic rate of Cry1C resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological Entomology**, v. 29, p. 409-418, 2004.

- Efron B, 1982. The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, 1982.
- Foster, S.P.; Young, S.; Williamson, M.S.; Duce, I.; Denholm, I.; Devine, G.J. Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach potato aphids and houseflies. **Heredity**, v. 91, p. 98-106, 2003.
- Gahan, L.J.; Gould, F.; Heckel, D.G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, -v. 293, p. 857–60, 2001.
- Gassmann, A.J.; Carrière, Y.; Tabashnik, B.E. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 147–63, 2009.
- Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annul Review Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- Gould, F.; Cohen, M. B.; Bentur, J. S.; Kennedy, G. G.; Van Duyn, J. Impact of small fitness costs on pest adaptation to crop varieties with multiple toxins: a heuristic model. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 2091-2099, 2006.
- Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Guedes, N.M.P.; Ribeiro, B.; Serrão, J.E. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Physiological Entomology**, v. 31, p. 30-38, 2006.
- Guedes, R.N.C.; Smith, R.H.; Guedes, N.M.P. Host suitability, respiration rate and the outcome of larval competition in strains of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. **Physiological Entomology**, v. 28, p. 298-305, 2003.
- Guillemaud, T.; Lenormand, T.; Bourguet, D.; Chevillon, C.; Paster, N.; Raymond, M. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: allele replacement and changing environment. **Evolution**, v. 52, p. 443–453, 1998.
- Heckel, D.G.; Gahan, L.J.; Baxter, S.W.; Zhao, J-Z.; Shelton, A.M.; Gould, F.; Tabashnik, B.E. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal Invertebrate Pathology**, v.95, p. 192–97, 2007.
- Hernandez-Rodriguez, C.S.; Hernandez-Martinez, P.; Van Rie, J., Escriche, B.; Ferré, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pest, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PlosOne**, v. 8 (7): e68146.
- Hostetler, M.E.; Anderson, J.F.; Lanciani, C. Pesticide resistance and metabolic rate in *German cockroach* (Dictyoptera: Blattellidae). **Florida Entomologist**, v. 77, p. 288–290, 1994.

- Jakka, S.R.K.; Knight, V.R.; Jurat-Fuentes, J.L. Fitness Costs Associated with Field-Evolved Resistance to Bt Maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomology**, v. 107(1), p. 342-351, 2014.
- Janmaat, A.F.; Myers, J.H. The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 272, p. 1031–1038, 2005.
- Jurat-Fuentes, J.L.; Karumbaiah, L.; Jakka, S.R.K.; Ning, C.; Liu, C.; Wu, K.; Jacson, J.; Gould, F.; Blanco, C.; Portilla, M.; Perera, O.; Adang, M. Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PlosOne**, v. 6, p. 1-7, 2011.
- Kasten-Junior, 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**, v.53, n.1-2, p. 68-78, 1978.
- Leite NA, 2012. Seleção e Caracterização da Resistência de uma Linhagem de *Spodoptera frugiperda* ao Milho Transgênico Expressando Cry1Fa, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 30 p.
- LeOra Software. 2007. POLO-PC: a user guide to probit or logit analysis. Berkeley, CA: LeOra Software.
- Li, H.; Oppert, B. Higgins, R.A.; Huang, F.; Zhu, Y.K.; Buschman, L.L. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, p. 753-762, 2004.
- Liu, Y. B.; Tabashnik, B. E.; Puzsai-Carey, M. Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal Economic Entomology**, v. 89, p. 798–804, 1996.
- Maia, ADN, Luiz AJB, Campanhola C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 511-518, 2000.
- Marais, E.; Chown, S.L. Repeatability of standard metabolic rate and gas exchange characteristics in a highly variable cockroach, *Perisphaeria* sp. **Journal of Experimental and Biology**, v. 206, p. 4565-4574, 1993.

- Marçon, P.C.R.G.; Young, L.J.; Steffey, K.L.; Siegfried, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 279-285, 1999.
- Meyers, J.S.; Ingersoll, C.G.; McDonald, L.L.; Boyce, M.S. Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. **Ecology**, v. 67, p. 1156–1166, 1986.
- Oliveira, E.E.; Guedes, R.N.C.; Tótola, M.R.; De Marco, P., Jr. Competition between insecticide-susceptible and – resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Chemosphere**, v. 69, p. 17-24, 2007.
- Pereira, E.J.G.; Storer, N.P.; Siegfried, B.D. Fitness cost of Cry1Fa resistance in laboratory-selected European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal Applied Entomology**, v, 135, p. 17-24, 2009.
- Radford, P.J. Growth analysis formulae – their use and abuse. **Crop Science**, v.7, p. 171–175, 1967.
- Rajagopal, R.; Sivakumar, S.; Agrawal, N.; Malhotra, P.; Bhatnagar, R.K. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p. 46849–51, 2002.
- Raymond, B.; Sayyed, A.H.; Wright, D.J. Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 272, p. 1519-1524, 2005.
- Raymond, B.; Wright, D.J.; Bonsall, M.B. Effects of host plant and genetic background on the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Journal Heredity**, v. 106, p. 281-288, 2011.
- Ribeiro, B.; Guedes, R.N.C.; Corrêa, A.S.; Santos, C.T. Fluctuating asymmetry in insecticide-resistant and insecticide-susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Archives of Environmental Contaminations and Toxicology**, v. 53, p. 77-83, 2007.
- Robertson, J. L.; Preisler, H. K.; Ng, S. S.; Hickle, L. A.; Gelernter, W.D. Natural variation a complication factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p. 1-10, 1995.
- Robertson, J. L.; Russel, R. M.; Preisler, H. K.; Savin, N. E. Bioassays with Arthropods. Second Edition. CRC Press. 2007.

- SAS Institute. 2011. SAS user's manual, version 9.3. SAS Institute, Cary NC.
- Soderlund, D.M.; Bloomquist, J.R. (1990). Molecular mechanisms of insecticide resistance. *Pesticide Resistance in Arthropods* (ed. by R. T. Roush and B. E. Tabashnik), pp. 58–96. Chapman & Hall, New York, New York.
- Southwood, T.R.E.; Henderson PA, *Ecological methods*, 3rd edn. **Blackwell Science**, London. 2000.
- Sayyed, A.H.; Wright, D.J. Fitness costs and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a field population of the diamondback moth *Plutellaxylostella* L. **Ecology Entomology**. v. 26, p. 502-508, 2001.
- Storer, N.P.; Babcock, J.M.; Schlenz, M.; Meade, T.; Thompson, G.D.; Bing, J.W.; Huchaba, R.M. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1031-1038, 2010.
- Tabashnik, B. E.1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, v. 39, p. 47–79, 1994.
- Tabashnik, B. E.; Dennehy, T. J.; Carrière, Y. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 15389–15393, 2005.
- Tiewisiri, K.; Wang, P. 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**, v. 108(34), p. 14037-14042, 2011.
- Velez, A.M.; Spencer, T.A.; Alves, A.P.; Crespo, A.L.B.; Siegfried, B.D. Fitness of Cry1Fa resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, doi: 10.1111/jen.12092, 2013.
- Wang, P.; Zhao, J.Z.; Rodrigo-Simón, A.; Kain, W.; Janmaat, A.F.; Shelton, A. M.; Ferré, J.; Myers, J. Mechanism of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in a Greenhouse Population of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73 (4), p. 1199-1207, 2007.

### **Capítulo 3: F1 screen para detecção de alelos de resistência à toxina Cry1Fa em populações brasileiras da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda***

#### **RESUMO**

Embora o Brasil seja um dos países com maior área plantada de milho transgênico Bt no mundo, não se conhecem estudos publicados sobre frequência inicial dos alelos de resistência e a suscetibilidade da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* às toxinas expressas por essas plantas no país, o que dificulta o monitoramento da evolução da resistência em campo. Para conhecer a atual frequência alélica de resistência a Cry1Fa foram realizados experimentos de F1 *screen* e bioensaios de concentração-resposta com oito populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do país. A frequência do alelo de resistência a Cry1Fa nas populações do Brasil foi estimado em 0.24 com IC 95% de 0.18 a 0.25. Cinco das oito populações mostraram níveis significativos de resistência, superiores a 32 vezes, quando comparados com a linhagem suscetível de laboratório. Os resultados deste estudo fornecem evidências de que em cinco regiões produtoras de milho no Brasil, existem populações de *S. frugiperda* resistentes a Cry1Fa e que as diferenças na suscetibilidade observadas podem estar associadas em parte a exposições prévias a plantas de milho transgênicas.

**Palavras-chave:** Frequência alélica de resistência, milho transgênico, lagarta-do-cartucho, bioensaios concentração-resposta, manejo da resistência.

## INTRODUÇÃO

As toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) têm sido usadas em aplicações para o controle de insetos pragas por décadas e em plantas transgênicas desde 1996 (Sanahuja et al., 2011). Estimativas globais indicam que a área plantada com culturas Bt desde a sua liberação comercial, tem aumentado ano após ano, sendo que para o ano de 2011 ultrapassou 66 milhões de hectares (James, 2011). A rápida comercialização e uso extensivo destas culturas Bt tem aumentado o risco de que espécies de insetos-praga-alvo se adaptem rapidamente a esta classe de toxinas (Gould, 1998; Wolfenbarger & Phifer, 2000). O alto risco ocorre devido à expressão contínua da proteína inseticida ao longo do desenvolvimento fenológico das plantas Bt, o que exerce uma elevada pressão de seleção de genótipos resistentes na população da espécie-alvo (Ferré & Van Rie, 2002).

*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é principal praga do milho nos países da América central e do sul, causando severas perdas na produção (Pogue, 2002). A mais recente estratégia para seu controle tem sido a utilização de milho transgênico Bt (Siebert et al., 2008). Contudo, populações de campo dessa praga desenvolveram altos níveis de resistência ao evento de milho TC1507, que expressa o gene da toxina Cry1Fa (Storer et al., 2010; Farias et al., 2014), confirmando a rápida adaptação que essa praga apresenta a inseticidas usados para seu controle (Adamczyk et al., 1999). Embora o Brasil seja um dos países com maior área plantada de milho transgênico Bt no mundo (James, 2011), são poucos os estudos sobre a suscetibilidade inicial desta praga às toxinas expressas por estas plantas no país, o que tem dificultado o monitoramento da evolução da resistência em campo.

Um programa de monitoramento da resistência eficaz para as culturas Bt deve ser capaz de detectar as primeiras mudanças na frequência de alelos de resistência, de modo que medidas proativas para o manejo da resistência possam ser implantadas antes que falhas de controle ocorram em campo (Andow & Alstad, 1998; Andow & Ives, 2002; Huang, 2006; Yue et al., 2008; Tabashnik et al., 2009; 2013). Vários métodos têm sido

utilizados ou sugeridos para detectar mudanças na frequência de alelos resistentes a culturas Bt em populações de campo (Huang, 2006), entre eles se incluem: bioensaios de concentração resposta (Wu et al., 2006), concentração diagnóstica (Roush & Miller, 1986), e F1 e F2 *screen* (Andow & Alstad, 1998; Liu et al., 2008; Blanco et al., 2008). Entre estes, os métodos de F1 e F2 *screen* têm provado ser os mais eficazes e sensíveis para a detecção de alelos raros de resistência na fase inicial de evolução da resistência (Gould et al., 1997; Andow & Alstad, 1998; Andow & Ives, 2002).

O F1 *screen* envolve o cruzamento de insetos de campo (com genótipo desconhecido) com insetos homozigotos resistentes e o *screen* do híbrido (F1) para a resistência (Gould et al., 1997; Liu et al., 2008; Yue et al., 2008; Mahon et al., 2010). Se o inseto de campo possui o mesmo alelo de resistência que o inseto resistente, 50% da progênie deverá ser homozigota resistente e, assim, esses indivíduos (homozigotos resistentes) poderiam sobreviver no F1 *screen* (Gould et al., 1997). Por não requerer que a geração F2 seja mantida em laboratório para ser testada, o F1 *screen* é um método que demanda menor trabalho e custo do que o F2 *screen* (Yue et al., 2008; Mahon et al., 2010). Além disso, como os insetos resistentes são criados em laboratório, o sucesso do método de F1 *screen* é aumentado, uma vez que o número de acasalamentos bem sucedidos com os indivíduos coletados em campo é maior (Blanco et al., 2008), superando alguns dos principais problemas do F2 *screen*. Desta forma, mais alelos podem ser mostrados usando o F1 *screen*, resultando em estimativas mais robustas da frequência da resistência (Mahon et al., 2010). Contudo, a principal desvantagem do F1 *screen* é que detecta unicamente alelos de resistência idênticos aos apresentados pela população resistente de laboratório (Yue et al., 2008).

Em comparação com os métodos de F1 e F2 *screen*, o bioensaio de concentração-resposta é um método relativamente barato e simples para determinar a susceptibilidade em relação a inseticidas (Liu et al., 2008). Este método é geralmente usado para confirmar a presença de resistência em populações de insetos ou para verificar se uma falha de controle em campo é devida ao desenvolvimento de resistência (Huang, 2006). Isto porque, quando algumas populações são altamente resistentes, os valores de LC<sub>50</sub> e

sobrevivência a uma concentração diagnóstica tendem a estar correlacionados (Tabashnik et al., 1993). No entanto, o método concentração-resposta não é suficientemente sensível para detectar a resistência em baixas frequências dos alelos (i.e.,  $q < 10^{-3}$ ) (Liu et al., 2008). Por conseguinte, o método de concentração-resposta, quando usado sozinho, não tem sido recomendado para monitorar a resistência a plantas Bt (Gould et al., 1997; Tabashnik., 1997; Andow & Alstad, 1998).

No Brasil, tem havido constantes reclamações de falhas de controle de *S. frugiperda* em lavouras de milho transgênico TC1507, com evidências de evolução de resistência em algumas populações (Farias et al. 2014). Com intuito de ampliar esse diagnóstico e considerando que a sobrevivência em uma cultura Bt, por si só, não constitui prova de resistência de um inseto-alvo (Tabashnik et al., 2014), nós conduzimos experimentos de F1 *screen* e bioensaios de concentração resposta para conhecer o status atual da suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* das principais regiões produtoras do milho do Brasil à toxina Cry1Fa. Os resultados indicam que cinco das oito populações amostradas neste estudo apresentam alto grau de resistência à toxina Cry1Fa expressa no evento de milho TC1507. Contudo, devido à falta de estudos prévios à liberação do milho transgênico no Brasil, não se tem evidências experimentais do aumento da frequência do alelo de resistência e/ou diminuição da suscetibilidade ( $CL_{50}$ ) após a exposição das populações das regiões amostradas à toxina Cry1Fa.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem e manutenção dos insetos

A linhagem suscetível (Lab) foi fornecida pelo laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos do Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo (CNPMS) da EMBRAPA (EMBRAPA Milho e Sorgo), em Sete Lagoas, MG, Brasil, onde tem sido mantida sem exposição a inseticidas sintéticos e toxinas Bt por mais de quinze anos. Essa linhagem foi usada para comparação com as linhagens coletadas em campo, quanto à concentração da toxina que mata 50% ( $CL_{50}$ ), a concentração da toxina que inibe 50%

de crescimento ( $CE_{50}$ ) e o fator de resistência (FR). A linhagem resistente (MTH) foi originada de larvas coletadas em 2011-2012 em diferentes estados produtores de milho do Brasil e selecionada para resistência a Cry1Fa por meio da exposição das larvas a tecidos foliares de milho TC1507. A herança da resistência nesta população é altamente recessiva, autossômica, sem efeito maternal e monogênica, sendo que as neonatas sobrevivem em  $10000 \text{ ng.cm}^{-2}$  de Cry1Fa, a maior concentração de toxina testada nos bioensaios que fizemos. Essa linhagem resistente foi usada junto com a suscetível para estabelecer a concentração diagnóstica empregada para estimar a frequência do alelo de resistência a Cry1Fa e, também, para os acasalamentos com as linhagens coletadas em campo para realizar os experimentos de F1 *screen*.

As populações de campo foram coletadas nas regiões geográficas de maior representatividade da área plantada com milho no Brasil (Figura 1). Na região de Viçosa (MG), apesar de não ser uma área importante de plantio de milho no país, foi realizada uma coleta para se ter uma população com pouca exposição prévia a culturas Bt. Todas as populações foram coletadas em plantios de milho comercial não-Bt (200-420 larvas). As larvas foram trazidas para o laboratório e mantidas com dieta artificial (Kasten Jr. *et al.*, 1978) até alcançar o estágio de pupa. As populações de campo foram usadas nos bioensaios concentração-resposta para estabelecer a suscetibilidade a Cry1Fa e, também, para acasalar com os indivíduos virgens resistentes de laboratório e assim gerar a progênie F1 usada nos experimentos de F1 *screen*.

Para a emergência dos adultos de todas as populações, as pupas foram colocadas em gaiolas de PVC de 40 cm h x 30 cm Ø. Os adultos foram alimentados com uma solução a base de açúcar (10%) e ácido ascórbico (5%) (Kasten Jr. *et al.*, 1978) disposta numa placa de petri de poliestireno (60 x 15mm) recoberta por algodão. A solução foi reabastecida a cada dois dias. Para proporcionar um substrato de oviposição, as gaiolas foram recobertas internamente com folhas de papel sulfite e tampadas com folhas de jornal. Os ovos foram coletados a cada dois dias e colocados em sacolas plásticas (35 x 40 cm) até a eclosão das larvas neonatas, que foram usadas nos experimentos

(bioensaios e F1 *screen*). As populações foram acondicionadas em ambiente controlado com temperatura de  $27 \pm 3$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 15$  % e fotoperíodo 14L: 10E.

### **Suscetibilidade das populações a Cry1Fa**

A toxina utilizada nos bioensaios foi obtida do laboratório da Dra. Marianne P. Carey, (Case Western Reserve University, OH). A proteína foi ativada com tripsina e purificada em HPLC, sendo fornecida na forma liofilizada. A toxicidade da Cry1Fa do estoque utilizado nos bioensaios para *S. frugiperda* é semelhante àquela obtida em outros laboratórios tais como da University of Nebraska-Lincoln, EUA (Velez et al., 2013).

Bioensaios foram conduzidos usando a técnica descrita por Marçon et al., (1999) com pequenas modificações. Foram utilizadas bandejas de 128 células (CD International Inc., Pitman, NJ). Um mililitro de dieta artificial foi colocado em cada célula, deixando-se solidificar. Utilizaram-se sete concentrações da toxina purificada mais o controle sem toxina. As diluições foram feitas em detergente não iônico Triton-X-100 a 0,1% para obter espalhamento uniforme na superfície da dieta. Cada célula foi tratada superficialmente com 30 µL da concentração indicada. O controle consistiu em células tratadas somente com o diluente.

As células tratadas foram deixadas secar ao ar, e posteriormente, uma lagarta neonata (> 24 h de eclosão) foi transferida para cada célula usando um pincel fino. As células foram cobertas com tampas de plástico autoadesivas (CD International Inc., Pitman, NJ), que permitem a troca de gás com o ambiente externo. A mortalidade foi avaliada aos sete dias de exposição. As larvas que não conseguiram passar ao segundo instar ou seu peso foi inferior a 0.1 mg foram registradas como mortas (Marçon et al., 1999). Portanto, a mortalidade também incluiu severa inibição de crescimento. Também o peso das larvas sobreviventes foi registrado para determinar a porcentagem de inibição do crescimento em relação às larvas controle. As bandejas foram mantidas em escotofase (24 h),  $27 \pm 3$  °C de temperatura e  $70 \pm 15$  % de umidade relativa. Para cada população

os bioensaios foram repetidos duas vezes em duas datas diferentes, usando 16 larvas em cada concentração (total de quatro réplicas de 16 neonatas por concentração).

### **Concentração diagnóstica de Cry1Fa para uso no F1 screen**

A concentração diagnóstica que permite unicamente a sobrevivência dos homozigotos resistentes (rr), foi estabelecida por meio de bioensaios concentração-resposta (Marçon et al., 1999) com os insetos heterozigotos (rs) para a resistência a Cry1Fa gerados do cruzamento entre adultos virgens da linhagem suscetível (Lab) e a linhagem resistente (MTH). As análises destes bioensaios indicaram que a concentração que mata 99% (CL<sub>99</sub>) dos indivíduos heterozigotos para a resistência à toxina é de 1117.5 ng.cm<sup>-2</sup> de Cry1Fa (Tabela 1). No entanto, para ter um maior poder discriminatório do genótipo rr em relação aos outros genótipos (ss e rs), optou-se por tomar como concentração diagnóstica o limite superior do intervalo de confiança da CL<sub>99</sub>. Desta forma a concentração usada no F1 screen foi de 1869.4 ng.cm<sup>-2</sup> de Cry1Fa. Essa concentração permite a sobrevivência dos genótipos resistentes (rr), já que a população resistente de laboratório (MTH) não apresentou suscetibilidade a doses inferiores de 10000 ng.cm<sup>-2</sup> de toxina Cry1Fa indicando desta maneira maior confiabilidade nos resultados. Assim, usando essa concentração diagnóstica espera-se uma sobrevivência de 50% no F1 screen para uma família que o parental de campo possua um único alelo de resistência (rs) e de 100% se o parental de campo possui dois alelos de resistência (rr).

### **F1 screen**

Para estimar a frequência de alelos de resistência em populações de campo de *S. frugiperda*, foi usada a metodologia proposta por Gould et al., (1997) com algumas modificações. Os indivíduos coletados em campo com genótipo desconhecido (rr, rs ou ss) foram acasalados individualmente com indivíduos homozigotos resistentes (rr) virgens da população MTH. Sua progênie [homozigoto (i.e., rr) ou heterozigotos (i.e., rs)] foi testada com a concentração diagnóstica de Cry1Fa, que permite a discriminação

entre homozigotos resistentes, homozigotos suscetíveis e heterozigotos (Gould et al., 1997; Mahon et al., 2010; Velez et al., 2013).

Para o cruzamento entre as populações de campo e a linhagem resistente, as pupas foram separadas por sexo (Capinera, 2000) e acondicionadas em potes plásticos de 500 mL recobertos internamente com folhas de papel sulfite umedecido. Depois da emergência dos adultos, fêmeas e machos virgens da população resistente foram emparelhados individualmente com o sexo oposto da população de campo, usando gaiolas de PVC de 10 cm h x 10 cm Ø. Cada emparelhamento (casal) constituiu uma família.

Para o F1 *screen*, quarenta e oito (48) larvas neonatas de cada família foram testadas com a concentração diagnóstica de Cry1Fa. Os bioensaios foram realizados como descrito anteriormente. As famílias usadas para o cálculo da frequência alélica foram aquelas que produziram número suficiente de larvas neonatas para os bioensaios.

Devido a resistência na linhagem resistente (rr) selecionada em laboratório ser altamente recessiva e conferida por um único *locus* (monogênica), a expectativa de mortalidade na concentração diagnóstica depende do genótipo dos indivíduos coletados em campo. Assim, se os indivíduos coletados em campo fossem homozigotos suscetíveis (ss) para a resistência a Cry1Fa, toda a progênie será heterozigota (rs) resultando em 100% de mortalidade na concentração diagnóstica. No entanto, se os indivíduos coletados em campo são heterozigotos (rs) e contiverem o alelo de resistência no mesmo *locus* dos alelos de resistência da população MTH, espera-se que a progênie seja 50% heterozigota (rs) e 50% homozigota resistente (rr), resultando em 50% de mortalidade na concentração diagnóstica. Finalmente, se os indivíduos coletados em campo são homozigotos para a resistência (rr), toda a progênie será resistente e, portanto, espera-se 100% de sobrevivência na concentração diagnóstica (Gould et al., 1997; Mahon et al. 2010; Velez et al., 2013).

**Confirmação da resistência.** Todas as famílias identificadas como resistentes a partir do F1 *screen* foram submetidas a um novo *screen* para eliminar famílias falsas positivas. Assim, as larvas das famílias potencialmente resistentes foram mantidas em dieta artificial até completar seu ciclo. Posteriormente os irmãos adultos proveniente de cada família foram acasalados entre si, e sua descendência F2 foi testada com a concentração diagnóstica para confirmar a presença de alelos resistentes (Gould et al., 1997).

### **Analises de dados**

Para determinar a suscetibilidade das populações à proteína Cry1Fa, os dados foram submetidos a análise de probit (Finney, 1971) usando POLO-PC (LeOra Software, 2007). A concentrações de toxina que matam 50% (CL<sub>50</sub>) e que inibem 50% de crescimento (CE<sub>50</sub>) das larvas foram calculadas junto com seus intervalos de confiança a 95%. O fator de resistência foi calculado com base na mortalidade e inibição de crescimento (Robertson et al., 1995, 2007) usando POLO-PLUS (LeOra Software, 2007). Para testar a hipótese que todos os valores de CL<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e os respectivos fatores de resistência (FR) das populações são iguais, foram comparados os valores do IC95% (intervalo de confiança 95%). A diferença significativa entre as inclinações foi determinada pelo teste da razão de probabilidade para paralelismo e igualdade, e teste dos interceptos (Savin et al., 1977). Essas análises foram realizadas utilizando-se o programa PoloPlus (Robertson et al., 2007).

**Calculo da frequência de alelos resistentes.** A frequência de alelos resistentes foi estimada usando as equações (1) e (2) de Wenes et al., (2006) com uma distribuição a priori uniforme.

$$Q = 1 - [1 - (S+1)/(N_{tot} + 2)]^{1/2}$$

Onde S = número de famílias positivas, e N<sub>tot</sub> = o número total de indivíduos coletados em campo usados com sucesso no *screen*. O intervalo de confiança 95% para a

frequência do alelo de resistência em cada população foi calculada usando a fórmula 15 de Andow & Alstad, (1999).

## RESULTADOS

### Suscetibilidade das populações a Cry1Fa

Os dados de mortalidade e inibição de crescimento para as oito populações de *S. frugiperda* coletadas em campo e a população padrão de laboratório se encontram na tabela 2. A população coletada em Sorriso (MT) não apresentou mortalidade nem inibição significativa de crescimento mesmo frente a sete dias de exposição a maior concentração de Cry1Fa testada (5000 ng.cm<sup>-2</sup>). Para as outras populações a CL<sub>50</sub> variou de 2325.4 (Planaltina/DF) a 58.7 (Lab) ng.cm<sup>-2</sup> de Cry1Fa, registrando-se diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre algumas das populações. A partir de uma estimativa do limite inferior da CL<sub>50</sub> para a população de Sorriso, o fator de resistência (FR) foi estimado em 85 vezes, sendo esta a população menos suscetível das coletadas em campo. Por outro lado, as populações de Planaltina, Toledo, Palmas e Passo Fundo apresentaram FR entre 32 a 39 vezes, sendo estes valores significativamente semelhantes entre eles ( $P > 0.05$ ). A população de Viçosa foi a população mais suscetível assemelhando-se as populações coletadas em Charqueada e Itumbiara.

Os dados de inibição de crescimento larval de *S. frugiperda* expostas a diferentes concentrações de Cry1Fa, mostram que a CE<sub>50</sub>, nas populações onde foi estimada, variou de 259.4 (Palmas/TO) a 18.5 (Lab) ng.cm<sup>-2</sup> de Cry1Fa, registrando-se diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre algumas das populações. O intervalo de variação do FR, calculado com base na inibição do crescimento, foi similar ao indicado pela mortalidade. Para a população de Sorriso foi estimado em mais de 270 vezes. As CE<sub>50</sub> das populações de Planaltina, Toledo e Palmas oscilaram entre 6 a 14 vezes, sendo essas populações as menos suscetíveis. Por outro lado as populações provenientes de Viçosa, Charqueada e Itumbiara, foram as mais suscetíveis com base nesta variável resposta. Curiosamente, a população de Passo Fundo, apesar de ter apresentado baixos níveis de

suscetibilidade com base na mortalidade ( $CL_{50}$ ), não se diferenciou significativamente ( $P > 0.05$ ) das mais suscetíveis no parâmetro de inibição de crescimento ( $CE_{50}$ ) (Tabela 2).

O teste de razão de probabilidade para paralelismo e igualdade mostrou que as inclinações da regressão concentração-mortalidade para as populações são significativamente diferentes, indicando que existe variação genética na suscetibilidade a Cry1Fa entre as populações de *S. frugiperda* das diferentes localidades geográficas do Brasil (Tabela 2). Contudo, tanto na mortalidade como na inibição de crescimento, os valores das inclinações foram relativamente pequenos, sugerindo que dentro das populações existe baixa variabilidade genotípica.

### **F1 screen**

Apesar de mais de 200 lagartas terem sido coletadas a campo para cada população, só foram estabelecidas 360 famílias (Tabela 3). A principal causa do baixo número de famílias estabelecidas foi a alta mortalidade nos indivíduos oriundos do campo, causada por fungos e bactérias. Dessas 360 famílias, 197 (54%) tiveram posturas bem sucedidas, gerando número de neonatas suficientes para realizar o F1 *screen*. A falta de sucesso na obtenção de posturas pode estar associada à baixa eficiência de acasalamento entre os indivíduos de campo e laboratório e, também, ao limitado número de espermatozoides dos machos coletados em campo, como tem sido reportados em trabalhos similares (Stodola et al., 2006; Liu et al., 2008).

Das 197 famílias testadas com a concentração diagnóstica ( $1869.4 \text{ ng.cm}^{-2}$  de Cry1Fa), 74 foram positivas para a presença do alelo de resistência, e dessas, quatro famílias da população de Sorriso e uma de Passo Fundo foram eliminadas na confirmação do *screen* da F2 (Tabela 3). Assim, foram confirmadas 69 famílias com presença do alelo de resistência. Destas, 55 tiveram sobrevivência igual a 50%, indicando que o indivíduo coletado em campo possuía genótipo heterozigoto (rs) para a resistência a Cry1Fa e 14 tiveram sobrevivência de 100%, indicando que os indivíduos

coletados em campo possuíam genótipo homozigoto resistente (rr). Do total de indivíduos coletados em campo portadores do alelo de resistência, 42 foram fêmeas e 29 machos. Contudo, essa proporção não pode ser levada em conta para indicar que nas fêmeas o alelo de resistência seja mais frequente em campo do que nos machos, dado que os acasalamentos no laboratório para todas as populações foram feitos com um maior número de fêmeas do que machos coletados em campo.

Os dados combinados de todas as populações mostraram que a frequência para os alelos que conferem resistência a Cry1Fa no Brasil é de 0.23, com um intervalo de confiança (IC) a 95% entre 0.17 e 0.25. Entre as populações, a frequência do alelo de resistência variou de 0.07 (IC 95%: 0.01 - 0.13) em Viçosa a 0.60 em Sorriso. Nessa última região o IC a 95% não foi calculado devido à falta de ajuste ao modelo (Andow & Alstad, 1999). Curiosamente, em todas as regiões onde foram feitas coletadas de lagartas foram identificados indivíduos portadores do alelo de resistência (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

Os bioensaios concentração-resposta mostraram que as oito populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões do Brasil, apresentam níveis significativos de variação na suscetibilidade à toxina Cry1Fa. Variações semelhantes na suscetibilidade para populações de *S. frugiperda* de diferentes regiões do Brasil também foram registradas para as toxinas Cry1A.105 e Vip3Aa20 (Salmeron et al., 2008; Bernardi et al., 2014), e mais recentemente para Cry1Fa (Farias et al., 2014). Nesses trabalhos e em outros similares com diferentes pragas e toxinas de Bt (e.i., *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea saccharalis*), a variação na suscetibilidade foi atribuída à variação natural das populações entre os locais de coleta (Stone & Sims, 1993; Marçon et al., 1999; Albernaz et al., 2012; Bernardi et al., 2014). Contudo, devido à alta variação na suscetibilidade a Cry1Fa encontrada entre as populações de *S. frugiperda*, nós acreditamos que as diferenças registradas neste estudo devem ter sido causadas por exposições prévias a toxinas Bt em plantas de milho transgênico ou por aplicações com produtos formulados a base de toxinas de *B. thuringiensis*.

As populações coletadas em Sorriso, Planaltina, Toledo, Palmas e Passo Fundo apresentaram menor suscetibilidade a Cry1Fa do que as populações de Itumbiara, Charqueada e Viçosa. Curiosamente, nas regiões onde a suscetibilidade foi menor, as culturas transgênicas Bt tem tido maior nível de adoção e, portanto, deve ter sido maior a exposição dos insetos à pressão de seleção exercida por essas plantas Bt. O exposto anteriormente reforça a ideia de que a variação na suscetibilidade entre as populações mostradas neste estudo pode estar associada à diferença entre os níveis de exposição prévia nas localidades das coletas dos insetos.

Fatores de resistência maiores ou iguais a 10 vezes ( $\geq 10$ ) tem sido usados para categorizar os casos de resistência (Mota-Sanchez et al., 2002). Quando o fator da resistência é maior que dez vezes ( $>10$ ) considera-se que há sinais de evolução da resistência em campo (Whalon & McGaughey, 1993). Em nosso estudo, o fator de resistência apresentou valores maiores a 85, 39, 38, 34, e 32 vezes, para as populações de Sorriso, Planaltina, Toledo, Palmas e Passo Fundo, respectivamente, o que indica que essas populações apresentam altos níveis de resistência a Cry1Fa. De forma interessante, em cada uma dessas cinco populações os valores da  $CL_{50}$  foram superiores à concentração diagnóstica de 1869.4 ng.cm<sup>2</sup> de Cry1Fa (a qual só permite a sobrevivência de indivíduos homozigotos resistentes) calculada no experimento de F1 *screen* indicando que existe uma relação entre os valores da  $CL_{50}$  e os níveis de sobrevivência na concentração diagnóstica, o qual é normal quando as populações são altamente resistentes (Tabashnik et al., 1993).

Embora neste estudo tenham sido encontrados altas frequências de resistência e baixos níveis de suscetibilidade na concentração diagnóstica nas populações coletadas nas regiões onde o uso de culturas transgênicas tem sido maior, esses resultados não permitem concluir que se trata de evolução da resistência em condições de campo. Isto porque não existem dados de  $CL_{50}$  anteriores a estudo nessas regiões, que permitiriam demonstrar incremento nos valores de  $CL_{50}$  nas populações (Tabashnik et al., 2014). Contudo, em algumas dessas regiões tem sido reportadas falhas de controle ou eficácia reduzida em campo em culturas de milho Cry1Fa por parte dos agricultores, após cinco

anos de uso do milho TC1507, sendo esse critério importante na determinação da evolução da resistência em campo (Moar et al., 2008).

Os dados do F1 *screen* mostraram que das 197 famílias testadas, 69 (35%) foram positivas na presença do alelo de resistência. Baseados nesses dados a frequência do alelo de resistência a Cry1Fa nas populações coletadas em diferentes regiões produtoras de milho do Brasil foi estimado em 0.24 (IC 95%: 0.18 e 0.25), o qual significa que aproximadamente 239 indivíduos de cada 1000 carregam o alelo de resistência Cry1Fa em campo. A principal estratégia proposta para retardar a evolução da resistência a toxinas Bt em culturas transgênicas é a estratégia “alta-dose refúgio” (Alstad & Andow, 1995). Uma condição chave nessa estratégia é que os alelos que conferem resistência a toxinas Bt sejam inicialmente raros, numa frequência entre  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  (Roush, 1994; Gould, 1998). Nossos dados mostram que nas oito populações coletadas de *S. frugiperda* os alelos de resistência a Cry1Fa em campo foram detectados em níveis muito superiores aos sugeridos para a estratégia “alta-dose refugio”. Isto indica que os alelos de resistência nessas regiões não são raros, o que compromete o uso dessa estratégia para retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* em culturas de milho transgênico Cry1Fa no Brasil.

Além disto, nas regiões onde os indivíduos apresentaram menor suscetibilidade a Cry1Fa (Sorriso, Toledo, Planaltina, Palmas), os alelos de resistência foram mais frequentes. Por outro lado, na região que apresentou maior suscetibilidade (Viçosa), a frequência do alelo resistente foi menor. Esse resultado reforça a evidência de que nessas localidades existem populações altamente resistentes a Cry1Fa e que as diferenças entre as regiões deve ser devido a exposições prévias a culturas transgênicas Bt. Contudo, a falta de registros de dados de monitoramento da frequência de alelos de resistência antes ou no início da liberação comercial do milho Cry1Fa no Brasil dificulta saber se a frequência do alelo de resistência aumentou como consequência da pressão de seleção exercida pelas plantas transgênicas.

Dos 69 indivíduos identificados no F1 *screen* como portadores do alelo de resistência a Cry1Fa, 55 carregavam uma única cópia do alelo e 14 duas cópias. O fato de ter sido identificado 14 indivíduos homozigotos resistentes, sugere que a resistência nessas localidades não estava em seus primeiros estágios de evolução da resistência, quando normalmente os homozigotos resistentes são raros (Roush, 1994). Nós não realizamos testes de complementação alélica para nenhuma das populações coletadas em campo de *S. frugiperda*. Contudo, através dos híbridos (F1) produzidos dos cruzamentos com a população resistente foram identificados alelos de resistência nas oito populações coletadas. O exposto anteriormente sugere que o alelo responsável pela resistência a Cry1Fa nas 69 famílias positivas para o alelo de resistência, encontra-se no mesmo *locus* em todas as populações. Este resultado tem implicações importantes no manejo da resistência de *S. frugiperda* no Brasil, uma vez que, quando a resistência esta associada a um único *locus*, espera-se que a frequência seja maior no ambiente do que quando está associada a mais de um *locus* (Mahon et al., 2008). Isto em parte poderia explicar a alta frequência do alelo resistente em campo e o fato de ter encontrado uma alta quantidade de indivíduos homozigotos resistentes.

Embora seja esperado que a frequência de alelos de resistência nos estados iniciais da evolução da resistência seja baixa (Roush & McKenzie, 1987), estimativas em algumas espécies de lepidópteros-praga sugerem que é possível encontrar alelos conferindo resistência a plantas Bt, antes da seleção exercida por essas culturas transgênicas (Gould et al., 1997; Tabashnik et al., 1997; Bentur et al., 2000; Downes et al., 2009). No caso de *S. frugiperda* no Brasil essa situação não seria estranha devido à grande variedade de inseticidas convencionais que tem sido usados para seu controle, entre os quais formulados de *B. thuringiensis* (Cruz & Waquil, 2001). Contudo, nós acreditamos que existem três prováveis causas para a baixa suscetibilidade a Cry1Fa das populações brasileiras amostradas neste estudo e a alta frequência de alelos de resistência a essa toxina. A primeira é a alta adoção de plantas transgênicas de algodão e milho expressando toxinas do grupo Cry1 (Cry1Ac, Cry1Ab e Cry1Fa) nas maiores regiões agrícolas do Brasil (James, 2011). Isto porque os sítios de ligação entre as toxinas Cry1 são semelhantes em *S. frugiperda* (Hernandez-Rodriguez et al., 2013), o

que facilita a adaptação por meio de uma toxina às outras, e assim, promover um rápido aumento da frequência do alelo resistente a Cry1Fa nas regiões. Uma segunda razão pode ser o uso de híbridos de milho Cry1Fa, que não expressam alta dose para *S. frugiperda*. Estudos feitos pela EPA (2005) nos Estados Unidos concluíram que o milho Cry1Fa alcançou para *S. frugiperda* alto nível de eficácia e não alta dose, como foi para *Ostrinia nubilalis*. Essa baixa expressão da toxina pode permitir a sobrevivência dos indivíduos carregadores de alelos de resistência levando ao acúmulo do alelo de resistência nas populações em campo. A última causa poderia estar relacionada com a falta de adoção do refúgio por parte dos agricultores nessas regiões. Os cinco casos de resistência evoluída em campo no mundo estão associados com o uso inadequado do refúgio (Tabashnik et al., 2014). Este fato sugere que a falta de adoção do refúgio pode aumentar a frequência dos alelos de resistência em campo e também, diminuir a suscetibilidade das pragas às toxinas expressas pelas plantas Bt.

Em resumo, este estudo fornece fortes evidências de que cinco das oito populações coletadas em diferentes regiões no Brasil são resistentes a Cry1Fa e que as diferenças na suscetibilidade podem dever-se em parte a pressão prévia de seleção exercida pela toxina Cry1Fa expressa em plantas de milho transgênicas ou por aplicações com produtos formulados a base das toxinas de *B. thuringiensis*. Contudo, não se pode categorizar estes casos como evolução da resistência ocorrida em campo, porque faltam dados de monitoramento da resistência das populações à toxina Cry1Fa no Brasil.



**Figura 1.** Locais de coleta de oito populações de *S. frugiperda* no Brasil usadas no F1 screen de alelos resistentes a Cry1Fa e bioensaios concentração resposta.

**Tabela 1.** Concentração discriminatória de larvas homozigotas para resistência a Cry1Fa em populações de *S. frugiperda* do Brasil.

População	n	Mortalidade					
		Inclinação ± EP	CL <sub>50</sub> (95% IC) <sup>b</sup>	CL <sub>90</sub> (95% IC) <sup>b</sup>	CL <sub>99</sub> (95% IC) <sup>b</sup>	χ <sup>2</sup>	P
F1 <sup>a</sup>	506	2.25 ± 0.18	108.9 (92.3 - 127.5)	404.2 (323.5 - 536.8)	1117.5 (834.5 - 1869.4)	2.28	0.81

<sup>a</sup> Gerada pelo cruzamento entre a linhagem resistente selecionada em laboratório e a suscetível (MTX × Lab).

<sup>b</sup> nanogramas de Cry1Fa.cm<sup>-2</sup> de dieta.

**Tabela 2.** Suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* à toxina Cry1Fa de *B. thuringiensis* aplicada à superfície da dieta artificial.

População	n	Mortalidade					Inibição de crescimento				
		Inclinação ± EP <sup>c</sup>	CL <sub>50</sub> (95% IC) <sup>a,c</sup>	FR (95% IC) <sup>b,c</sup>	χ <sup>2</sup>	P	Inclinação ± EP	IC <sub>50</sub> (95% IC) <sup>a,c</sup>	FR (95% IC) <sup>b,c</sup>	χ <sup>2</sup>	P
Sorriso/MT	496	nc <sup>d</sup>	> 5000	> 85	nc	nc	nc	>5000	>270	nc	nc
Planaltina/DF	504	1.00 ± 0.18 <sup>d</sup>	2325.4 (1664.3 - 3633.1) <sup>a</sup>	39.5 (25.5 - 61.2) <sup>a</sup>	3.47	0.62	1.15 ± 0.12 <sup>e</sup>	253.3 (183.4 - 331.4) <sup>a</sup>	13.6 (8.67 - 21.5) <sup>a</sup>	2.05	0.84
Toledo/PR	512	0.62 ± 0.10 <sup>b</sup>	2246.2 (1369.2 - 4887.9) <sup>a</sup>	38.2 (20.3 - 71.9) <sup>a</sup>	3.18	0.67	0.80 ± 0.11 <sup>bc</sup>	120.0 (25.9 - 245.1) <sup>a</sup>	6.4 (3.41 - 12.2) <sup>a</sup>	8.91	0.11
Palmas/TO	494	0.71 ± 0.10 <sup>bd</sup>	2011.1 (1305.8 - 3749.9) <sup>a</sup>	34.2 (19.8 - 59.1) <sup>a</sup>	3.07	0.68	0.99 ± 0.11 <sup>bce</sup>	269.4 (117.5 - 468.6) <sup>a</sup>	14.5 (8.94 - 23.5) <sup>a</sup>	9.88	0.07
Passo Fundo/RS	509	1.50 ± 0.18 <sup>a</sup>	1905.7 (1462.6 - 2535.7) <sup>a</sup>	32.4 (23.0 - 45.7) <sup>a</sup>	4.66	0.45	1.75 ± 0.12 <sup>b</sup>	38.4 (10.4 - 78.5) <sup>b</sup>	2.0 (0.76 - 5.60) <sup>b</sup>	1.71	0.88
Itumbiara/GO	508	1.09 ± 0.11 <sup>cd</sup>	416.0 (311.2 - 542.3) <sup>b</sup>	7.0 (5.0 - 10.0) <sup>b</sup>	1.34	0.93	0.87 ± 0.14 <sup>bc</sup>	24.5 (6.19 - 51.4) <sup>b</sup>	1.2 (0.47 - 3.71) <sup>b</sup>	0.72	0.98
Charqueada/SP	508	1.49 ± 0.13 <sup>a</sup>	279.5 (219.6 - 346.3) <sup>b</sup>	4.7 (3.49 - 6.48) <sup>b</sup>	3.06	0.69	0.92 ± 0.22 <sup>cde</sup>	20.5 (2.1 - 48.3) <sup>b</sup>	1.1 (0.40 - 3.00) <sup>b</sup>	2.07	0.83
Viçosa/MG	506	1.83 ± 0.15 <sup>a</sup>	245.4 (184.9 - 342.2) <sup>b</sup>	4.1 (3.13 - 5.56) <sup>b</sup>	6.81	0.23	1.39 ± 0.14 <sup>de</sup>	22.3 (15.8 - 29.2) <sup>b</sup>	1.2 (0.76 - 1.91) <sup>b</sup>	2.33	0.80
LabF18	508	1.81 ± 0.16 <sup>a</sup>	58.7 (47.0 - 71.3) <sup>c</sup>	.	3.53	0.61	2.20 ± 0.35 <sup>a</sup>	18.5 (11.7 - 24.5) <sup>b</sup>	.	0.91	0.96

<sup>a</sup>nanogramas de Cry1Fa.cm<sup>-2</sup> de dieta.

<sup>b</sup> FR. Fator de resistência relativo à população suscetível de laboratório (Lab), com seu respectivo intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Robertson et al., 2007).

<sup>c</sup> Valores de CL50 e CE50 designados com letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes uns dos outros por não sobreposição dos intervalos de confiança a 95%. A diferenças significativas entre as inclinações foram determinadas pelo teste de relação de probabilidade para paralelismo e igualdade por comparações pareadas usando a não sobreposição dos intervalos de confiança (Savin et al., 1977; Robertson et al., 2007).

<sup>d</sup> n.c. não calculado por falta de suscetibilidade.

**Tabela 3.** Frequência de alelos de resistência à toxina Cry1Fa de *B. thuringiensis* em seis populações de *S. frugiperda* do Brasil.

População	Nº de famílias montadas	Nº de famílias testadas por população	Nº de famílias positivas <i>screen</i> F1	Nº de famílias positivas na confirmação ( <i>screen</i> da F2)	Nº de alelos resistentes por população	Alelos de resistência		Sexo do indivíduo de campo portador do alelo resistente	Frequência do alelo de resistentes e intervalo de confiança 95%
						sr	rr		
Palmas/TO	40	24	8	8	10	6	2	5 ♀ / 3 ♂	0.2404 (0.1220 - 0.3060)
Planaltina/DF	44	22	10	10	11	9	1	5 ♀ / 5 ♂	0.2929 (0.1529 - 0.3471)
Itumbiara/GO	48	24	7	7	8	6	1	3 ♀ / 4 ♂	0.1914 (0.0899 - 0.2675)
Passo Fundo/RS	38	20	7	6	6	6	0	4 ♀ / 2 ♂	0.1743 (0.0729 - 0.2609)
Toledo/PR	50	26	10	10	14	6	4	4 ♀ / 6 ♂	0.3186 (0.1766 - 0.3567)
Charqueada/SP	51	35	12	12	16	8	4	9 ♀ / 3 ♂	0.2648 (0.1520 - 0.3095)
Sorriso/MT	41	17	17	13	15	11	2	8 ♀ / 5 ♂	0.6026*
Viçosa/MG	48	29	3	3	3	3	0	2 ♀ / 1 ♂	0.0667 (0.018 - 0.1326)
Total Brasil	360	197	74	70	83	55	16	40 ♀ / 29 ♂	0.2398 (0.1772 - 0.2456)

\* IC 95% não calculado por falta de ajuste ao modelo usado (Andow & Alstad, (1999))

## REFERÊNCIAS

- Adameczyk, J. R.; Holloway, J.J.; J. W. Leonard, J.W.; Graves, J.B. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. **Journal of Cotton Science**, v.1, p. 21-28, 1997.
- Albernaz, K. C.; Merlin, B. L.; Martinelli, S.; Head, G. P.; Omoto, C. 2013. Baseline susceptibility to Cry1Ac insecticidal protein in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Journal Economic Entomology**, v. 106, p.1819-1824, 2013.
- Alstad, D.N.; Andow, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, v.268, p. 1894-1896, 1995.
- Andow, D. A.; Alstad, D.N. F2 screen for rare resistance alleles. **Journal Economic Entomology**, v. 91(3), p. 572-578, 1998.
- Andow, D.A.; Alstad, D.N. Credibility interval for rare resistance allele frequencies. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, v. 755-758, 1999.
- Andow, D.A.; Ives, A.R. Monitoring and adaptive resistance management. **Ecological Applications**, v. 12, p. 1378-1390, 2002.
- Bentur, J.S.; Andow, D.A. Cohen, M.B.; Romena, A.M.; Gould, F. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippines population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal Economic Entomology**, v. 93, p. 1515-1521, 2000.
- Bernardi, O.; Amado, D. Souza, R.S.; Segatti, F.; Fatoletto, J.; Burd, A.D. Omoto, C. Baseline Susceptibility and Monitoring of Brazilian Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 Insecticidal Protein. **Journal Economic Entomology**, v. 107(2): p. 781-790, 2014.
- Blanco, C.A.; Perera, O.P.; Gould, F.; Sumerford, D.V.; Hernandez, G.; Abel, C.A.; Andow, D.A. An Empirical test of the F2 screen for detection of *Bacillus thuringiensis* alleles in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomology**, v. 101(4), 1406-1414, 2008.
- Capinera, J. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). The University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. (UF/IFAS), 2000.
- Cruz, I.; Waquil, J. M. Pragas da cultura do milho para silagem. In: Cruz, J. C.; Pereira Filho, I. A.; Rodrigues, J. A. S.; Ferreira, J. J. (Ed.). **Produção e utilização**

- silagem de milho e sorgo.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. p.141-207.
- Downes, S.; Parker, T.L.; Mahon, R.J. Frequency of alleles conferring resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from 2002 to 2006. **Journal Economic Entomology**, v. 102, p. 733-742, 2009.
- Faria, J.R.; Andow. D.A.; Horikoshi, R.J.; Sorgatto, R.J. Fresia. P., Dos Santos, A.C.; Omoto, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, v. 64, p. 150-158, 2014.
- Ferré, J.; Van Rie, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501-533, 2002.
- Finney, D. J. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press. 350 p, 1971.
- Gould, F.; Anderson, A.; Jones, A.; Summerford, D.; Heckel, D.G; Lopez, J.; Micinski, S.; Leonard, R.; Laster, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 94, p. 3519-3523, 1997.
- Gould, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- Hernandez-Rodriguez, C.S.; Hernandez-Martinez, P.; Van Rie, J., Escriche, B.; Ferré, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pest, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PlosOne**, v. 8(7): e68146.
- Huang, F. Detection and monitoring of insect resistance to transgenic Bt crops. **Insect Science**, v. 13, p. 73-84, 2006.
- James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA Brief No. 43. Ithaca, New York: ISAAA, 2011.
- Kasten-Junior, 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**, v.53, n.1-2, p. 68-78, 1978.
- LeOra Software. 2007. POLO-PC: a user guide to probit or logit analysis. Berkeley, CA: LeOra Software.

- Liu, F.; Xu, Z.; Chang, J.; Chen, J.; Meng, F.; Zhu, Y.C. Resistance allele frequency to Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in China. **Journal Economic Entomology**, v.101, p. 933-943, 2008.
- Mahon, R. J.; Olsen, K. M.; Downes, S. Isolations of cry2ab resistance in australian populations of *helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) are allelic. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 909-914, 2008.
- Mahon, R. J.; Downes, S.; James, W.; Parker, T. Why do F1 screens estimate higher frequencies of Cry2Ab resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) than do F2 screens?. **Journal economic Entomology**, v. 103, p. 472-481, 2010.
- Marçon, P.C.R.G.; Young, L.J.; Steffey, K.L.; Siegfried, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 279-285, 1999.
- Moar, W.; Roush, R.; Shelton, A.; Ferre, J.; MacIntosh, S.; Leonard, B.R.; Abel, C. Field-evolved resistance to Bt toxins. **Nature Biotechnology**, v.26, p.1072-1074, 2008.
- Mota-Sanchez, D.; Bills, S. P.; Whalon, M. E. Arthropod resistance to pesticides: Status and overview, pp. 241-272. *In*: W. Wheeler and B. Gainesville (eds.), **Pesticides in agriculture and the environment**. Marcel Decker, New York, NY, 2002.
- Pogue, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, p. 1-202, 2002.
- Robertson, J. L.; Preisler, H. K.; Ng, S. S.; Hickie, L. A.; Gelernter, W.D. Natural variation – a complication factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p. 1-10, 1995.
- Robertson, J. L.; Russel, R. M.; Preisler, H. K.; Savin, N. E. Bioassays with Arthropods. Second Edition. CRC Press. 2007.
- Roush, R. T., Miller G. L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring program. **Journal Economic Entomology**, v. 79, p. 293-298, 1986.
- Roush, R.T.; McKenzie, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review Entomology**, v. 32, p. 361-380, 1987.
- Roush, R. T. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays?. **Biocontrol Science and technology**, v. 4, p. 501-516, 1994.

- Salmeron, E.; Fonseca, L. B.; Martinelli, S.; Head, G.P.; Omoto, C. Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 de *Bacillus thuringiensis* na cultura do milho, 2008. In XXII Congresso Brasileiro de Entomologia, Uberlândia, MG. (<http://www.seb.org.br/eventos/CBE/XXIICBE/trabalhos.htm>).
- Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.M.; Capell, T.; Christou, P. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 283–300, 2011.
- SAS Institute. 2011. SAS user's manual, version 9.3. SAS Institute, Cary NC.
- Savin, N.E.; Robertson, J.L.; Russell, R.M.A critical evaluation of bioassay in insecticide research: likelihood ratio tests of dose-mortality regression. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 23, p. 257-266, 1977.
- Siebert, M. W.; Tindall, K. V.; Leonard, B. R.; Van Duyn, J. W.; Babcock, J.M. Evaluation of corn hybrids expressing Cry1Fa (Herculex ® I Insect Protection) against Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern United States. **Journal of Entomological Science**, v. 43, p. 41-51, 2008.
- Stodola, T.D.; Andow, D.A.; Hyden, A.R.; Hilton, J.L.; Roark, J.J. Buschman, L.L.; Porter, P.; Cronholm, G.B. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States corn belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal Economic Entomology**, v. 99, p. 502-507, 2006.
- Stone, T. B.; Sims, S.R. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology**, v. 86, p. 989-994, 1993.
- Storer, N.P.; Babcock, J.M.; Schlenz, M.; Meade, T.; Thompson, G.D.; Bing, J.W.; Huchaba, R.M. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1031-1038, 2010.
- Tabashnik, B. E.; Finson, N.; Chilcutt, C. F.; Cushing, N. L.; Johnson, M. W. Increasing efficiency of bioassays: evaluation of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal Economic Entomology**, v.86, p. 635-644, 1993.
- Tabashnik, B.E. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94(3), p. 3488-3490, 1997.
- Tabashnik, B.E.; Van Rensburg, J.B.J.; Carrière, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal Economic Entomology**, v.102, p. 2011-2025, 2009.

- Tabashnik, B.E.; Brévault, T.; Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology**, v. 31 n, 6, p. 510-521, 2013.
- Tabashnik, B.E.; Mota-Sanchez, D.; Whalon, M.E.; Hollingworth, R.M.; Carrière, Y. Defining Terms for Proactive Management of Resistance to Bt Crops and Pesticides. **Journal Economic Entomology**, v. 107, p. 496-507, 2014.
- Velez, A.M.; Spencer, T.A.; Alves, A.P.; Moellenbeck, D. Meagher, R.L.; Chirakkal, H.; Siegfried, B.D. Inheritance of Cry1Fa resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomology Research**, v. 103, p. 700-713, 2013.
- Wenes, A. L.; Bourguet, D.; Andow, D. A.; Courtin, C.; Carré, G.; Lorme, P.; Sanchez, L.; Agustin, S. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Heredity**, v. 97, p. 127-134, 2006.
- Whalon, M.E.; McGaughey, W.H. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*, in *Advanced Engineered Pesticides*, ed. By Kim L. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 215–232, 1993.
- Wolfenbarger, L.L.; Phifer, P.R. Biotechnology and ecology – The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. **Science**, v. 290, p. 2088-2093, 2000.
- Wu, K.; Guo, Y.; Head, G. Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt insecticidal protein during 2001-2004 in China. **Journal Economic Entomology**, v. 99, p. 893-896, 2006.
- Yue, B.; Huang, F.; Rogers Leonard, B.; Moore, S.; Parker, R.; Andow, D. A.; Cook, D.; Emfinger, K.; Lee, D.R. Verifying an F1 screen for identification and quantification of rare *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in field populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 129, p. 172-180, 2008.

## CONSIDERACOES FINAIS

Os resultados dos experimentos de seleção mostram que populações de *S. frugiperda* de diferentes regiões do Brasil responderam à pressão de seleção exercida coma toxina Cry1Fa expressa no milho contendo o evento TC1507. Após onze gerações de seleção, as duas linhagens selecionadas não apresentaram suscetibilidade a doses inferiores de 10.000 ng.cm<sup>-2</sup> de Cry1Fa e, além disso, conseguiram colonizar e completar seu ciclo de vida em plantas de milho comercial Cry1Fa, o que evidencia o nível significativo de resistência desenvolvido. Os bioensaios de concentração-resposta com as progênies geradas dos cruzamentos recíprocos entre a população suscetível e resistente indicaram que a herança da resistência a Cry1Fa é recessiva, autossômica e herdada sem efeito maternal. Além disso, bioensaios comparativos no retrocruzamento entre a progênie F1 e os pais resistentes, revelaram que a resistência é conferida por um único *locus* ou por um grupo de loci fortemente ligados. Os resultados obtidos em casa de vegetação usando plantas de milho Bt e não-Bt foram consistentes com os encontrados nos bioensaios concentração-resposta e indicam que, pela sobrevivência dos heterozigotos nas plantas de milho TC1507, tal evento parece não ser de alta dose para *S. frugiperda*. Em conjunto esses resultados sugerem que a base genética da resistência se adequa parcialmente aos pressupostos da estratégia de manejo de resistência em uso, porém por não ser de alta dose o milho Cry1Fa, atenção especial deve ser dada ao uso de refúgio para retardar a evolução da resistência desse inseto-praga no Brasil.

Os experimentos realizados para identificar custos adaptativos nas duas linhagens resistentes mostraram menor número de ovos por fêmea, menor peso de ovos e número de neonatas por dia dos indivíduos resistentes em relação aos heterozigotos F1, porém isso não foi significativamente diferente a suas respectivas linhagens suscetíveis. Além disso, não se observaram diferenças significativas entre genótipos resistentes e suscetíveis na taxa de crescimento populacional. Esses resultados somados àqueles dos experimentos de taxa respiratória larval, onde se evidenciou que as linhagens resistentes não precisaram de altas taxas metabólicas para manter o mecanismo de resistência, e que

a resistência se manteve estável nas duas linhagens durante as sete gerações testadas, indicam a ausência de fortes custos adaptativos associados à resistência a Cry1Fa para essas duas linhagens de *S. frugiperda* estudadas.

Esta falta de custo adaptativo associado à resistência a Cry1Fa em características de história de vida são consistentes com os reportados em trabalhos com outras populações de *S. frugiperda* resistentes à toxina, e que provavelmente possuem o mesmo mecanismo de resistência. Portanto, nossa hipótese é que as mutações que conferem resistência a Cry1Fa em *S. frugiperda* não comprometem seu desempenho. Esse resultado tem importantes implicações para o manejo da resistência de plantas transgênicas Bt, porque a falta de custos associados à resistência ajuda a manter alta a frequência de alelos de resistência em campo e pode favorecer a adaptação desse inseto a outras toxinas de Bt. Por fim, falta investigar se a resistência a Cry1Fa causa alterações no comportamento reprodutivo dos indivíduos resistentes para melhor entender o custo da resistência à toxina em *S. frugiperda*.

Os dados do F1 *screen* mostraram que nas oito regiões onde foram coletadas populações de *S. frugiperda*, os alelos de resistência a Cry1Fa estão em níveis muito superiores aos pressupostos na estratégia de manejo da resistência atualmente praticada no Brasil. Além disso, os resultados dos bioensaios de concentração-resposta forneceram fortes evidências de que cinco das oito populações coletadas são resistentes à toxina Cry1Fa e, que é provável que as diferenças na suscetibilidade se devam em parte à prévia pressão de seleção exercida pela toxina Cry1Fa expressa em plantas de milho Bt. Estes resultados indicam que é preciso reavaliar o uso das práticas de manejo para retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* nos cultivos Bt e que o uso do milho transgênico expressando unicamente Cry1Fa para o controle desta praga no Brasil pode já estar comprometido em algumas regiões do país.

A investigação aqui realizada permitiu a caracterização da resistência de *S. frugiperda* à toxina Cry1Fa e conhecer o nível de suscetibilidade e a frequência de alelos de resistência a essa toxina nas principais regiões produtoras do milho de Brasil. Os

resultados desta investigação tem permitido a elaboração de novas estratégias para o controle de *S. frugiperda* e a realização de novas pesquisas sobre o uso de outras plantas de milho transgênicas que expressam toxinas diferentes a Cry1Fa. Além disso, as linhagens selecionadas neste estudo permitirão a caracterização bioquímica e molecular da resistência, o que poderá também auxiliar no refinamento de recomendações para manejo da resistência de *S. frugiperda* a toxinas de Bt.