

REBECA LEAL MARCELLOS

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE
GLÂDULAS SECRETORAS DE FEROMÔNIO SEXUAL DE
POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* SUSCEPTÍVEIS E
RESISTENTES A *Bacillus thuringiensis*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M314q
2013

Marcellos, Rebeca Leal, 1984-
Quantificação de compostos extraídos de glândulas
secretoras de feromônio sexual de populações de *Spodoptera*
frugiperda susceptíveis e resistentes a *Bacillus thuringiensis* /
Rebeca Leal Marcellos. – Viçosa, MG, 2013.
xiii, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Evaldo Ferreira Vilela.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 29-46.

1. *Spodoptera frugiperda*. 2. Lagarta-do-cartucho.
3. Cromatografia a gás. 4. Milho. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de
Pós-Graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

REBECA LEAL MARCELLOS

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE
GLÂDULAS SECRETORAS DE FEROMÔNIO SEXUAL DE
POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* SUSCEPTÍVEIS E
RESISTENTES A *Bacillus thuringiensis*

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

APROVADA: 25 de Outubro de 2013.

Eliseu José Guedes Pereira

Eraldo Rodrigues de Lima

Weyder Cristiano Santana

Evaldo Ferreira Vilela
Orientador

À minha mãe, Maria das Graças, exemplo de força
e dedicação, com todo o meu amor, dedico.

Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas;
glória, pois, a ele eternamente. Amém.
(Romanos 11:36)

Agradecimentos

A Deus, pelo sustento em todos os momentos.

Aos meus pais Luiz Carlos Marcellos (*in memoriam*) e Maria das Graças Leal Marcellos pelo amor incondicional, apoio, exemplo, paciência e orações.

Aos meus sobrinhos, por todo amor.

Ao professor Evaldo Vilela, meu orientador, pela oportunidade.

Aos professores Eraldo Lima e Eliseu Pereira, pelo apoio, dedicação, amizade, paciência, colaboração, sugestões, esclarecimentos e confiança depositada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

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

Ao meu namorado Rodolfo Ferreira de Mendonça, por toda paciência, apoio, carinho, dedicação. Por todo o suporte emocional nos momentos difíceis e por toda calma nos momentos insanos. Por sempre estar presente e me fazer rir no meio do desespero.

Ao Hernane Dias Araújo pelo auxílio durante todo o mestrado e no experimento, pela amizade e resignação em me ouvir.

À Clara Glória e Claryssa pelo auxílio no experimento, me ajudando com a criação no laboratório.

À Sandra Mara Gomes, por ter me auxiliado no experimento.

À Aline Francêz, por todo apoio e preocupação comigo.

Ao Antonio Costa, por toda amizade, preocupação, apoio e caronas.

Aos amigos dos laboratórios de Semioquímicos e Resistência pela força e amizade.

À Regiane Teodoro, Diogo Costa, João Felipe Brites Senra e Tatiane Paulino, pela disposição em me ajudar.

À Juliana Quintiliano, Andréa Koeller, Luciana Leite, Letícia Brumano e Débora Munnerat, por toda amizade nesses dois anos que passei em Viçosa, pelo carinho e orações, por todos os momentos bons que tivemos.

À Monalize Vieira e família, Lucas Duque e Victor Dalmaso, amigos que mesmo à distância foram fundamentais para a conclusão desse trabalho, obrigada pela amizade.

A todos os amigos que me ajudaram direta ou indiretamente, agradeço imensamente por tudo.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Àqueles que por esquecimento não foram citados aqui, mas que contribuíram para minha formação e minha estadia aqui.

Agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho tivesse sucesso. Obrigado por tudo.

Biografia

Rebeca Leal Marcellos, filha de Luiz Carlos Marcellos (*in memmoriám*) e Maria das Graças Leal Marcellos, nasceu em Juiz de Fora – MG, em 17 de abril de 1984.

Em fevereiro de 2011, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre – ES.

Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Mestrado em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, submetendo-se à defesa de dissertação em 25 de outubro de 2013.

Conteúdo

	Página
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xii
1 Introdução	1
2 Material e Métodos	12
2.1 Obtenção das populações	12
2.2 Efeito da população na escolha do parceiro sexual em laboratório	13
2.3 Extração e análise do feromônio sexual	13
2.3.1 Cromatografia em fase gasosa (GC)	14
3 Resultados	15
4 Discussão	23
5 Conclusões	28
6 Referências	29

Lista de Figuras

	Página
1 Caminhos propostos para a biossíntese dos componentes feromônio em <i>S. frugiperda</i> (com base em vias biossintéticas descritas para outras espécies de traça por Jurenka (2003)). . . .	10
2 Preferência de acasalamento de machos de <i>S. frugiperda</i> resistentes (barras pretas) e susceptíveis (barras cinzas) em relação à fêmeas das populações resistentes (RR) ou susceptíveis (SS).	15
3 Média da concentração do composto Z9-14: Ac (ng/ μ L) nas populações susceptíveis (SS) e resistentes (RR) de <i>S. frugiperda</i> . .	18
4 Média da concentração do composto Z11-16: Ac (ng/ μ L) nas populações susceptíveis (SS) e resistentes (RR) de <i>S. frugiperda</i> . .	19
5 Agrupamento das famílias susceptíveis e resistentes de <i>S. frugiperda</i> , tendo por base a média da concentração do composto Z9-14:Ac separados em 2 grupos, considerando similaridade superior a 60%, de acordo com o método de Ward.	21
6 Agrupamento das famílias susceptíveis e resistentes de <i>S. frugiperda</i> , tendo por base a média da concentração do composto Z11-16:Ac, separados em 4 grupos, considerando similaridade superior a 60%, de acordo com o método de Ward.	22

Lista de Tabelas

	Página
1	Mínimo, Mediana, Média, Máximo, Variância e Desvio Padrão do composto Z9:14-Ac nas famílias e populações de <i>S.frugiperda</i> . . . 17
2	Mínimo, Mediana, Média, Máximo, Variância e Desvio Padrão do composto Z11:16-Ac nas famílias e populações de <i>S.frugiperda</i> . . . 17
3	Porcentagem média das concentrações dos compostos Z9-14: Ac e Z11-16: Ac 20

Resumo

MARCELLOS, Rebeca Leal, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2013. **Quantificação de compostos extraídos de glândulas secretoras de feromônio sexual de populações de *Spodoptera frugiperda* susceptíveis e resistentes a *Bacillus thuringiensis***
Orientador: Evaldo Ferreira Vilela. Co-orientadores: Ângelo Pallini Filho, Eliseu José Guedes Pereira e Eraldo Rodrigues de Lima.

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, é uma espécie polífaga que infestam inúmeras plantas em todo o Ocidente e é considerada uma praga chave desta cultura, onde causa perdas significativas. O controle da população deste inseto é realizado com o uso de culturas transgênicas. Tais plantas codificam a expressão de proteínas Bt, oriundas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, tem adquirido importância ao longo dos anos para o manejo de lepidópteros-praga, por conferir alto padrão de resistência da planta a algumas espécies de insetos. Feromônios sexuais são moduladores do acasalamento em muitas espécies de insetos, possuindo canais específicos para a comunicação da espécie. Neste trabalho, avaliou-se a composição das glândulas produtoras de feromônio da lagarta-do-cartucho em duas populações (susceptíveis e resistentes à Bt) e a preferência de acasalamento de machos de ambas as populações. Com base nos resultados das análises estatísticas, não foi observado preferência de acasalamento dos machos em relação às fêmeas susceptíveis ou resistentes à Bt, e também não foi detectado

diferença na variabilidade e concentração do composto Z9-14: Ac entre as populações. Na população susceptível foi verificado poucas vezes o composto Z11-16: Ac, contudo, quando o composto foi diagnosticado, ele não diferiu da concentração encontrada na população resistente. Houve uma correlação positiva significativa entre as concentrações de Z9-14: Ac e Z11-16: Ac.

Abstract

MARCELLOS, Rebeca Leal, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, september of 2013. **Quantification of compounds extracted from sex pheromone secretory glands of *Spodoptera frugiperda* from populations susceptible and resistant to *Bacillus thuringiensis***
Adviser: Evaldo Ferreira Vilela. Co-Advisers: Ângelo Pallini Filho, Eliseu José Guedes Pereira and Eraldo Rodrigues de Lima.

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is a polyphagous species that infest many plants throughout the Occident and is considered a key pest of this crop, causing significant losses. The population control of this insect is held with the use of transgenic crops. Such plants encoding the expression of Bt proteins, derived from the bacterium *Bacillus thuringiensis*, has been acquiring importance over the years for the management of lepidopteran pests, by giving high standard of plant resistance to some insects. Sex pheromones are modulators of mating in many species of insects, which have specific channels for this kind of communication. In this work, the composition of the pheromone-producing glands of the fall armyworm in two populations (one susceptible and one resistant to Bt crops) and mating preference for males of both populations were evaluated. There was no mating preference of males by susceptible or resistant females, and it was not detected differences in the concentration of the major pheromone compound Z9-14: Ac between populations. In the susceptible population, the minor

compound Z11-16: Ac was not observed so often. However, when it was present, it was not different from the concentration found in the resistant population. There was a significant correlation between the concentrations of Z9-14: Ac and Z11-16: Ac.

1 Introdução

As espécies do gênero *Spodoptera* são largamente disseminadas no mundo e das 30 espécies descritas, metade é considerada praga de variadas culturas de importância econômica (Pogue, 2002). Dentre elas, a lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma espécie polífaga que infesta aproximadamente 186 plantas em todo o Hemisfério Ocidental (Casmuz *et al.*, 2010), incluindo muitas culturas agrícolas (Sparks, 1979; Andrews, 1980; Bentancourt & Scatoni, 1996), tais como o algodão, soja, cana-de-açúcar, aveia, cevada e milheto (Gallo *et al.*, 2002; Pogue, 2002; Capinera, 2008), sendo considerada uma praga importante de plantas da família Poaceae (gramíneas), como milho, arroz, trigo, entre outras (Cruz, 1995; Busato *et al.*, 2002; Capinera, 2008).

O centro de origem desta espécie são as regiões de clima quente (tropical-subtropical) do continente americano, incluindo as ilhas do Caribe (Bertels, 1970; Mitchell, 1979; Sparks, 1979; Pair *et al.*, 1986; Raulston *et al.*, 1986; Pedigo, 1989). Apesar de ser endêmica de regiões mais quentes, esta espécie atinge regiões frias, como Estados Unidos e Canadá (Wiseman *et al.*, 1966; Mitchell, 1979; Maund, 1995), sobrevivendo nas regiões tropicais do sul da Flórida e Texas, durante o inverno, e migrando a partir destes locais durante a primavera, verão e outono, podendo se deslocar a grandes distâncias. Na Argentina e Chile, a espécie é verificada até mesmo nos meses de inverno (Juárez *et al.*, 2012). Sendo uma espécie que não realiza diapausa, em zonas temperadas e frias comporta-se como uma praga sazonal (Pair *et al.*, 1991).

A fêmea de *S. frugiperda* deposita de 1500 a 2000 ovos em “massas” de coloração palha na parte superior das folhas. Após três dias de desenvolvimento embrionário, as lagartas emergem e passam a alimentar-

se realizando raspagem das folhas mais tenras. Estas lagartas possuem coloração que varia de verde até quase preta, com três linhas longitudinais branco-amareladas na parte dorsal do corpo. O período larval pode durar de 12 a 30 dias, alterando com as condições climáticas. As pupas possuem coloração marrom-avermelhada e são encontradas no solo, com período pupal variando entre 8 e 25 dias. Os adultos possuem cerca de 35 milímetros de envergadura, com asas anteriores pardo escuras e posteriores branco acinzentadas (Gallo *et al.*, 2002).

O registro do primeiro grande surto de *S. frugiperda* na história ocorreu em 1899, quando uma grande parte dos EUA foi invadida pela lagarta-militar, gerando severos danos em milho, feijão, arroz, sorgo e trigo. Mais tarde esta praga foi encontrada acarretando graves injúrias em aveia, algodão e pastagens. Já no Brasil, o primeiro surto foi relatado em 1964, com enormes danos em milho, arroz e pastagens (Cruz, 1995).

No Brasil, um fator que coopera para a dificuldade do manejo de *S. frugiperda* é a grande oferta de culturas alternativas onde o inseto pode se alimentar ao longo do ano, seja com sucessão de culturas, como milho ou soja no verão, ou milho ou sorgo na “safrinha” (Barros *et al.*, 2010). Além disso, o plantio em áreas próximas de diferentes culturas com fenologias distintas, como é o caso da soja, do milho e do algodão, cultivados durante o verão, além de plantas de cobertura na entressafra, como o milheto, pode beneficiar o movimento de *S. frugiperda* entre os cultivos (Nagoshi, 2009).

Uma alternativa para o manejo deste inseto é o controle biológico, que pode ser feito com o uso racional de entomopatógenos, que constituem os componentes ativos dos bioinseticidas ou inseticidas biológicos.

Entre os bioinseticidas, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bt) é a mais utilizada, correspondendo a aproximadamente 90% do mercado mundial de bioinseticidas (Vilas-Bôas *et al.*, 2007), sendo os maiores produtores de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* os Estados Unidos e Canadá, respondendo por cerca de 50% da produção mundial (Tamez-Guerra *et al.*, 2001).

B. thuringiensis é uma bactéria do solo que foi isolada a partir de lagartas mortas da traça-da-farinha, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), na província de Thuringia, Alemanha. No entanto, esta não foi a primeira vez que o bacilo foi isolado: em 1901, no Japão, o biólogo Sotō Ishiwata já havia isolado uma bactéria a partir de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), que foi denominada de *B. sotto* Ishiwata, sendo descrita como o agente causal da “sotto disease”, que posteriormente se soube tratar também uma subespécie de *B. thuringiensis* (Glare & Ocallaghan, 2000).

B. thuringiensis se distingue de outras espécies do mesmo gênero devido a presença intracelular de um cristal protéico, produzido durante a esporulação e descoberto somente em 1953 por Hannay (Habib & Andrade, 1998; Glare & Ocallaghan, 2000; Moraes *et al.*, 2001; Vilas-Bôas *et al.*, 2007). A atividade entomopatogênica de Bt é devida a estes cristais, sendo letal para várias espécies das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Entretanto, existem subespécies de *B. thuringiensis* que são tóxicas contra insetos das ordens Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phthiraphera, além de alguns nematóides, protozoários e ácaros (Feitelson, 1994; Edwards *et al.*, 1998; Glare & Ocallaghan, 2000; Brar *et al.*, 2006).

Desde a década de 1920, produtores utilizam *B. thuringiensis* como estratégia para manejo de insetos na agricultura. Formulações comerciais de Bt são utilizadas para o controle biológico de pragas em muitas culturas, especialmente na agricultura orgânica. A comercialização do primeiro produto à base de *B. thuringiensis* foi iniciada em 1938 na França, com o nome de “Sporeine” (Weiser, 1986; Polanczyk & Alves, 2003; Capalbo *et al.*, 2004; Brar *et al.*, 2006). Nos anos 50, inseticidas biológicos à base de Bt passaram a ser produzidos comercialmente na Rússia, Checoslováquia, Alemanha e Estados Unidos (Martins, 2005). Essa bactéria tem alta especificidade e é relativamente segura para organismos não alvo. Contudo, possui limitações quanto à persistência no ambiente e eficiência (Vaeck *et al.*, 1987).

As limitações no uso de *B. thuringiensis* motivaram o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas que expressem as toxinas oriundas do Bt, através da incorporação de genes responsáveis pela expressão destas proteínas inseticidas em espécies de plantas cultivadas. As primeiras plantas Bt foram produzidas nos Estados Unidos na década de 90 (Maia, 2003). As plantas Bt, devido aos bons resultados no manejo dos insetos-alvo, na redução do uso de inseticidas químicos e segurança ambiental (Betz *et al.*, 2000; Ferré & Rie, 2002; Maagd, 2003), são consideradas uma das mais bem sucedidas inovações biotecnológicas recentes (Ferré *et al.*, 2008; Sena *et al.*, 2009).

Diversas cultivares de milho-Bt são plantadas em todo o mundo. A maioria delas expressam a proteína Cry1 e Cry 2 para controle de lepidópteros (Ferré *et al.*, 2008) e Cry3 para controle de coleópteros-praga (Christou *et al.*, 2006).

O milho geneticamente modificado, resistente a insetos, originalmente foi desenvolvido para o controle de *O. nubilalis*, praga de grande importância nos EUA, que causa injúrias no colmo do milho. As lagartas ao se alimentarem do tecido foliar de plantas geneticamente modificadas, ingerem a proteína Bt, causando a mortandade dos insetos, antes que os mesmos consigam causar danos econômicos à cultura (Gill *et al.*, 1992; Pietrantonio *et al.*, 1993; Gill, 1995). No Brasil, a liberação da comercialização do milho transgênico pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) ocorreu em 2007.

Uma grande ameaça à ampla adoção das culturas Bt é o surgimento da resistência dos insetos, devido a forte pressão de seleção que é imposta na população-alvo (Ferré & Rie, 2002). Ao fazer opção pelo plantio de cultivares milho-Bt, deve-se realizar o plantio de uma área de refúgio de 5 a 10%, da área total de milho plantada na propriedade, com milho convencional. O refúgio deverá ser plantado, no máximo a 800 m da lavoura de milho e é recomendada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), para reduzir a chance de seleção de raças de lagartas resistentes às toxinas do Bt (Cruz, 2012).

O potencial de resistência das pragas alvo é um dos principais riscos ambientais associados às culturas inseticidas, que ocorre em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, restringindo sua eficácia e viabilidade em longo prazo (Hawthorne, 1998). Mais de 500 espécies de insetos se tornaram resistentes a inseticidas convencionais e alguns insetos têm sido reconhecidos por apresentarem resistência a cepas de Bt após repetidas aplicações das toxinas Cry, tanto em campo quanto em laboratório (Higuchi *et al.*, 2007; Pinheiro, 2013).

O desenvolvimento da resistência a toxinas Bt expressas em plantas transgênicas é um processo regido por um grande número de fatores que interagem entre si e são relacionados a características do material genético da planta transgênica, a bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo. Esses fatores podem ser classificados como genéticos, bioecológicos e operacionais (Pinheiro, 2013).

O mecanismo mais frequente de resistência às toxinas de *B. thuringiensis* é a redução da ligação da toxina às células do trato digestório do inseto, que em diferentes espécies resistentes incluem mutações nos receptores das toxinas Cry ou mutações no transportador ABCC2 (Herrero *et al.*, 2005; Gahan *et al.*, 2010; Jurat-Fuentes *et al.*, 2011; Baxter *et al.*, 2011).

A tolerância de *S. frugiperda* a toxina Cry1Ab tem aumentado ao longo do tempo, com mortalidade decrescente de 96.66 a 76.66%, variando ao longo da fenologia do milho (DePolania *et al.*, 2009). Tem sido evidenciada a resistência cruzada entre a toxina Cry1Aa, presente em algodão transgênico, e Cry1Ab, presente em milho. Essas proteínas interagem com os mesmos receptores da membrana do intestino médio das lagartas (Monnerat & Bravo, 2000).

Devido à menor susceptibilidade da lagarta do cartucho para as toxinas bacterianas expressas pelo *B. thuringiensis* (Garczynski *et al.*, 1991; Luo *et al.*, 1999; Luttrell *et al.*, 1999) ou para o milho Bt em si (Matten *et al.*, 2008; Siebert *et al.*, 2008), um menor número de *S. frugiperda* do que de outros lepidópteros são controlados (Lynch *et al.*, 1999). A exposição a níveis de

toxinas subletais representa uma pressão para a rápida seleção de indivíduos resistentes (Tabashnik & Roush, 1990).

O fenômeno evolucionário da resistência é conhecido há várias décadas (Dobzhansky, 1951) e não pode ser totalmente entendido sem dados genéticos. A determinação do número de genes envolvidos, a relação de dominância entre genótipos e a base genética da herança cruzada são informações necessárias para uma descrição completa da herança da resistência (Roush & Daly, 1990). A resistência pode ter origens moleculares, como a amplificação de genes (Field *et al.*, 1988), taxas mais elevadas de transcrição (Fournier *et al.*, 1992) e mutações de ponto (Ffrench-Constant *et al.*, 1993). Normalmente, um único gene é suficiente para que a resistência seja detectada, não significando, contudo, que a resistência seja estritamente monogênica (Roush & Daly, 1990).

A genética de populações é o ramo da genética que visa estudar as variações genéticas nas populações naturais e as forças que determinam e alteram as composições destas populações, tendo por objetivo central é elucidar quais mecanismos são capazes de manter a homogeneidade e também as forças responsáveis por gerar distinção genética entre as populações no meio ambiente (Black & Tabachnick, 2005).

Os enfoques da genética de populações permitem ainda caracterizar os efeitos específicos inerentes a certos loci, causados por processos de seleção, mutação ou recombinação, daqueles que afetam todo o genoma, provocados pela deriva, efeito de gargalo, fluxo gênico ou endocruzamento (Black & Tabachnick, 2005; Luikart *et al.*, 2003). Os efeitos que afetam todo o genoma informam sobre a demografia da população e sobre sua história filogenética, ao passo que, os efeitos específicos de certos loci auxiliam apenas na identificação de genes que são importantes para o fitness e para a adaptação. Os loci sob pressão de seleção apresentam padrões de variações ou comportamentos extremamente diferentes do restante do genoma (Cartaxo, 2009). O efeito gargalo é um evento genético causado por uma redução drástica do tamanho da população, onde há perda de variabilidade genética.

Ao ocorrer um pequeno afinilamento das bases genéticas, a variabilidade genética da população deverá diminuir rapidamente, porém quando o tamanho da população se torna maior, o afinilamento começa a aumentar devido a novas mutações.

A seleção para resistência a inseticidas, doenças e parasitóides apresenta alto custo adaptativo e muitas vezes exige compensações na aptidão reprodutiva, sendo os custos de resistência muitas vezes difíceis de medir (Janmaat & Myers, 2005). Traços atribuindo resistência a ambientes hostis, tais como a doença, toxinas químicas e alterações climáticas são na maioria das vezes associados a custos deletérios fortes (McNair, 1991; Orr & Coyne, 1992; Carrière *et al.*, 1994). Como resultado, os indivíduos resistentes podem alocar uma porção maior de recursos para a característica de resistência, em oposição ao crescimento e/ou reprodução (Carrière *et al.*, 1994; Bergelson & Purrington, 1996). Custos de resistência a produtos químicos, parasitas ou parasitóides podem ser condições dependentes de tal forma que o *trade-off* entre a defesa e a reprodução se torna mais evidente em condições precárias de recursos (Bergelson & Purrington, 1996), durante a hibernação, um período de estresse ambiental (McKenzie, 1996; Carrière *et al.*, 2001) ou sob condições de alta competição intraespecífica (Kraaijeveld & Godfray, 1997).

Nos casos estudados, a resistência ao Bt é autossômica herdada. Quanto ao número de loci envolvidos na resistência, frequentemente a herança é monofatorial. Repetidas vezes, a resistência aos produtos Bt e proteínas Cry foi relatada sendo instável. Esta instabilidade é causada, provavelmente, pelos custos adaptativos associados com genes de resistência ou com outros loci intimamente ligados a eles. A resistência ao Bt frequentemente diminui na ausência de seleção e, por conseguinte, parece provável que resistência ao *B. thuringiensis* está associada com um custo significativo de aptidão (Tabashnik *et al.*, 1994; Ferré & Rie, 2002), e esta tem sido documentada em diversos casos (Groeters *et al.*, 1993, 1994; Liu *et al.*, 1999). No entanto, existem alguns exemplos em que os níveis de resistência não diminuíram assim que o processo de seleção foi descontinuado (Ferré & Rie, 2002). Esta falta de

adequação dos custos pode ter sido devido à seleção de alelos resistentes sem efeitos negativos pleiotrópicos (Guillemaud *et al.*, 1998) ou modificadores da aptidão de outros loci (Liu *et al.*, 1996).

Os componentes do sistema de comunicação sexual de longa distância para machos e fêmeas são normalmente controlados por conjuntos independentes de genes (Butlin & Ritchie, 1989). Este controle genético, independente de sinais e respostas, levanta questões evolutivas sobre como mutações pontuais em tais sinais sexuais ou respostas poderiam aumentar em frequência (Butlin & Trickett, 1997). Em alguns sistemas de comunicação sexual, seleção natural e seleção sexual podem resultar em uma vantagem física de genótipos raros que produzem um sinal de alteração ou fenótipo de resposta do sinal.

Mariposas fêmeas tipicamente emitem uma mistura específica de dois ou mais componentes voláteis que atraem coespecíficos machos, os quais só são atraídos para aquela mistura (Cardé & Minks, 1997). Dada à atividade noturna da maioria das mariposas, estes voláteis são característicos para a detecção de parceiros adequados à longa distância, contando apenas com uma eficiente resposta do macho para uma mistura de particular de feromônios da espécie (Sheck *et al.*, 2006).

Feromônios sexuais são moduladores do acasalamento em muitas espécies de insetos, sendo que na maioria dos casos, as fêmeas liberam feromônios capazes de atrair potenciais parceiros em longa distância (Cardé & Baker, 1984), enquanto os feromônios sexuais liberados pelos machos agem em curtas distâncias (Fitzpatrick & McNeil, 1988; Birch *et al.*, 1990). Feromônios diferem em composição e/ou as proporções dos componentes constituintes, gerando canais específicos para a comunicação da espécie, que tem sido visto como mecanismo de isolamento reprodutivo pré-copulatório, visando reduzir cruzamentos inadequados (Mayr, 1963) ou como um meio para facilitar a acasalamentos entre indivíduos da mesma espécie (Paterson, 1985).

Os feromônios são compostos voláteis que pertencem a diversas classes químicas, como ésteres, alcoóis, aldeídos, sesquiterpenos. O feromônio sexual de muitos lepidópteros é formado por cadeias longas de 10 a 18

carbonos, derivados insaturados de ácidos graxos, com o carbono da carbonila modificado em um grupo funcional contendo oxigênio (Goldsmith & Marec, 2010).

No caso de *S. frugiperda*, o feromônio tem sido, principalmente, utilizado para monitorar a atividade do macho, para determinar a migração, dinâmica sazonal e distribuição espacial (Tingle & Mitchell, 1979; Waddill *et al.*, 1982; Starrat & Mcleod, 1982; Pair *et al.*, 1986; Adams *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1989). A possibilidade de utilizar feromônios como uma forma direta de controle foi menos explorado (Mitchell *et al.*, 1974). As alterações do sinal de uma feromônio feminino podem resultar no isolamento de reprodução, o que por sua vez pode levar a especiação (Roelofs & Cardé, 1974; Phelan, 1992; Baker, 2002; Smadja & Butlin, 2009).

O primeiro componente identificado do feromônio de fêmeas de *S. frugiperda* foi o componente principal, (Z) -9 - acetato de tetradecenilo (Z9-14: OAc) (Sekul & Sparks, 1967), enquanto em estudos posteriores foram relatados componentes adicionais (Jones & Sparks, 1979; Mitchell *et al.*, 1985; Tumlinson *et al.*, 1986; Descoins *et al.*, 1988). Os extratos de glândula secretora de feromônios sexual de fêmeas virgens de populações brasileiras de *S. frugiperda* apresentaram sete picos com as características espectrais de acetatos de cadeia longa. Os compostos foram identificados como (Z etilo)-9-tetradecenilo (Z9-14: Ac), (Z)-11-hexadecenil etilo (Z11-16: Ac), acetato de (Z)-10-tetradecenilo (Z10-14: Ac), (Z)-11-tetradecenilo etilo (Z11 - 14: Ac), tetradecil etilo-1-butanol (14: Ac), acetato de (Z)-7-dodecenilo (Z7-12: Ac), E7-12: Ac, e acetato de dodecilo (12: Ac). As proporções relativas de Z7-12: Ac, E7-12: Ac, 12: Ac, Z9-12: Ac, Z9-14: Ac, Z10-14: Ac, 14: Ac/Z11-14: Ac e Z11 -16: Ac em extratos de glândula secretora de feromônios sexual de fêmeas virgens foram 0.8:1.2:0.6: traços: 82.8:0.3:1.5:12.9, respectivamente (Batista-Pereira *et al.*, 2006). Nas glândulas secretoras de feromônios sexual f de *S. frugiperda* da América do Norte foram encontrados os compostos Z7-12: Ac, Z9-12: Ac, Z9-14: Ac, e Z11-16: Ac Mitchell1985, Tumlinson1986, Descoins1988, enquanto em Guadalupe (Caribe), os principais componentes

relatados foram Z9-12: Ac, Z9-14: Ac, e Z11-16: Ac (Andrade *et al.*, 2000). A rota biossintética proposta para a produção dos principais compostos do feromônio de *S. frugiperda* pode ser vista na Figura 1.

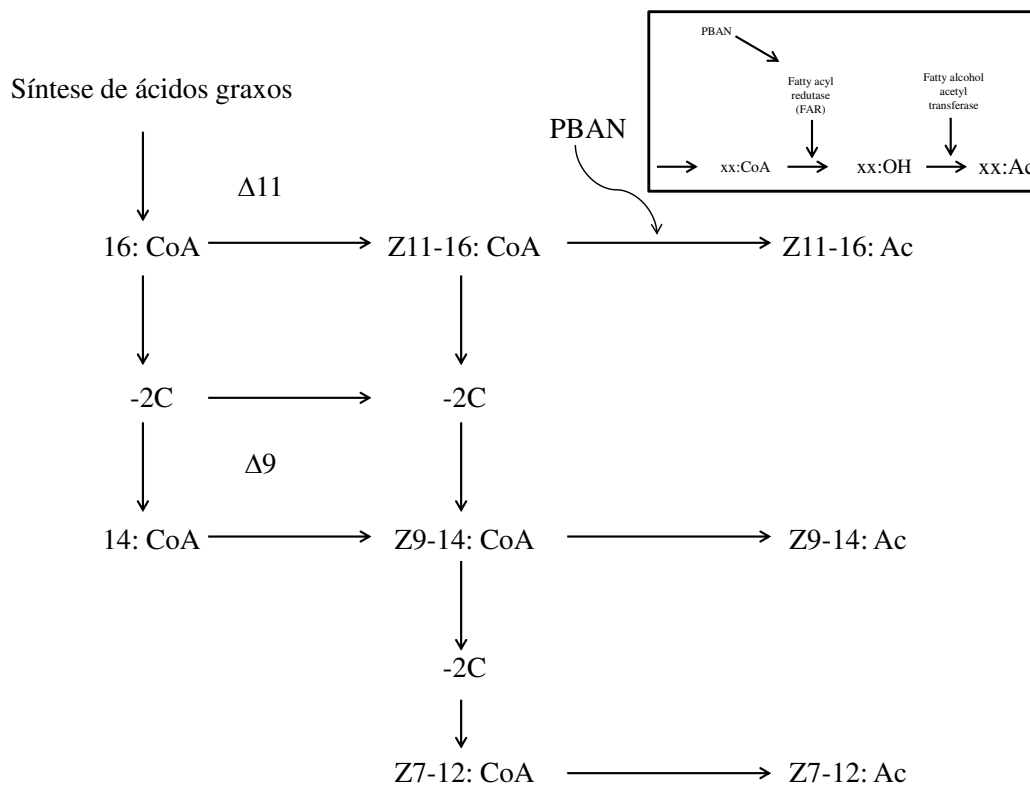


Figura 1: Caminhos propostos para a biossíntese dos componentes feromônio em *S. frugiperda* (com base em vias biossintéticas descritas para outras espécies de traça por Jurenka (2003)).

Na literatura é possível encontrar diferenças tanto no número quanto na razão dos compostos isolados a partir da glândula secretora de feromônios sexual de *S. frugiperda* (Tumlinson *et al.*, 1986; Descoins *et al.*, 1988). Visando oferecer informações relevantes para a efetivação de manejo de *S. frugiperda* à Bt, o presente trabalho procurou identificar possíveis variações no feromônio sexual da mariposa submetida a uma forte pressão de seleção.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar se há variação na proporção relativa dos compostos de Z9-14: Ac e Z11-16: Ac em duas estirpes de *S. frugiperda*, uma susceptível e uma resistente à Bt ocasionada pelo efeito gargalo, avaliando se a resistência a Bt afeta o acasalamento neste inseto.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção das populações

As populações susceptível e resistente de *S. frugiperda* foram obtidas no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos da Universidade Federal de Viçosa. Foram formadas a partir de cruzamentos recíprocos com insetos coletados de Cascavel (Paraná), Sorriso (Mato Grosso), Morrinhos (Goiás) e Brasília (Distrito Federal).

A linhagem resistente de *S. frugiperda* à toxina Cry1F foi selecionada em laboratório, através de exposição crônica de lagartas neonatas (<24h de idade) a folhas de milho-Bt do evento TC1507 (híbrido 30F35H da Pioneer Sementes, Brasil), que expressa a forma ativa da toxina Cry1F e o seu isogênico não-Bt (P30F35) que foi utilizada como testemunha. Após sete gerações de seleção, a população selecionada teve suas médias de mortalidade e biomassa aos três e sete dias, peso das pupas e tempo de desenvolvimento de neonata até pupa, semelhante a insetos controle mantidos sem pressão de seleção, evidenciando significativo nível de resistência a Cry1F.

Os insetos foram criados em sala climatizada sob as condições de 25° C \pm 2, UR 70% e fotofase de 14 horas no Laboratório de Feromônios e Comportamento de Insetos da Universidade Federal de Viçosa. Os adultos de uma mesma população foram separados em casais e mantidos em gaiolas de PVC circulares cobertas com organza na parte superior e revestidas internamente com papel sulfite para permitir a oviposição. Uma solução de sacarose 10% foi mantida *ad libitum*, e trocada diariamente. As posturas de cada casal (que a partir de agora será tratado como “Família”) foram conservadas separadamente e as lagartas foram transferidas para frascos de plástico contendo dieta artificial. As lagartas de *S. frugiperda* foram

alimentadas com dieta artificial modificada por Valicente & Barreto (1999), contendo os seguintes componentes: grãos de feijão cozido, gérmen de trigo, levedo de cerveja, ácido ascórbico, nipagin, ácido sórbico, ágar, formaldeído, ácido fosfórico e ácido propiônico. As pupas foram retiradas, sexadas e mantidas separadas por Família e sexo.

2.2 Efeito da população na escolha do parceiro sexual em laboratório

Neste experimento os adultos foram individualizados em frascos após a emergência e alimentados com solução de sacarose a 10% e ácido ascórbico a 1% *ad libitum*. Duas fêmeas, uma de cada população, marcadas na asa com um pequeno corte, com dois dias após a emergência, foram colocadas juntamente com um macho (2 dias de idade) de cada população em uma gaiola plástica. A ocorrência de cópulas foi monitorada a cada trinta minutos, do início ao final da escotofase. Para comprovar o acasalamento, as fêmeas eram dissecadas para verificar a presença do espermatóforo. Foram realizadas 18 repetições para cada tratamento (população). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de qui-quadrado. As análises foram realizadas com o programa R (R Development Core Team, 2011).

2.3 Extração e análise do feromônio sexual

Os compostos biologicamente ativos foram obtidos da glândula secretora de feromônio sexual de fêmeas virgens de cada família, com 2 e 3 dias depois da emergência, entre a 3^a e 5^a hora de escotofase. As glândulas secretoras de feromônio sexual foram excisadas com pinças e transferidas para frascos cônicos contendo 20 μ L de hexano destilado com 40 ng de padrão interno (n-heptil acetato) para cada glândula secretora de feromônio sexual e mantida durante 24h, à temperatura ambiente. Posteriormente, a glândula secretora

de feromônio sexual foi removida e os extratos armazenados a -20°C até a realização da análise.

2.3.1 Cromatografia em fase gasosa (GC)

O GC estava equipado com uma coluna DB-5 (30 m, 0.32 mm d.i. e 0.25 μm de espessura de filme; JW Scientific Inc., EUA). Injetou-se 1 μL de cada extrato empregando o modo *splitless* com a temperatura do injetor a 280°C . A temperatura do forno foi mantida a 60°C por 1 min, aumentada para 200°C em uma velocidade de 10C min^{-1} , sendo mantida nesta temperatura por 7 min, novamente aumentada para 280°C em uma velocidade de 10C min^{-1} , sendo mantida nesta temperatura por 15 min. O gás carregador usado foi Hélio e a pressão na coluna foi de 46 kPa. A concentração e a razão da mistura dos compostos foram determinadas com base nas áreas dos picos observados no GC e a partir de curvas analíticas construídas com padrões autênticos.

Os valores de concentração obtidos para os dois componentes do feromônio sexual foram baseados em análises de 8 famílias da população susceptível e 7 famílias da população resistente, totalizando, respectivamente, 33 e 41 glândulas produtoras do feromônio sexual de fêmeas virgens e em horário de chamamento.

Os resultados encontrados para cada família foram submetidos aos testes de Bartlett, Kruskal-Wallis e Wilcoxon ($P < 0.05$). As médias dos resultados de cada população foram comparadas empregando os testes de Bartlett e t-Student ($P < 0.05$). As médias também foram comparadas utilizando o coeficiente de Pearson, para avaliar a correlação entre os compostos extraídos da glândula de feromônio de *S. frugiperda*. As análises foram realizadas com o programa R (R Development Core Team, 2011).

3 Resultados

Não foi observado preferência de acasalamento dos machos em relação às fêmeas susceptíveis ou resistentes. Dentre os machos susceptíveis, 9 se acasalaram com fêmeas susceptíveis e 5 com fêmeas resistentes, sendo que em 4 gaiolas não ocorreu acasalamento ($gl = 2$, $\chi^2 = 2.33$, $P = 0.3114$). Já entre os machos resistentes, 8 se acasalaram com fêmeas susceptíveis e 4 com fêmeas resistentes, e em 6 gaiolas não houve acasalamento. ($gl = 2$, $\chi^2 = 1.33$, $P = 0.5134$), conforme pode ser observado na Figura 2.

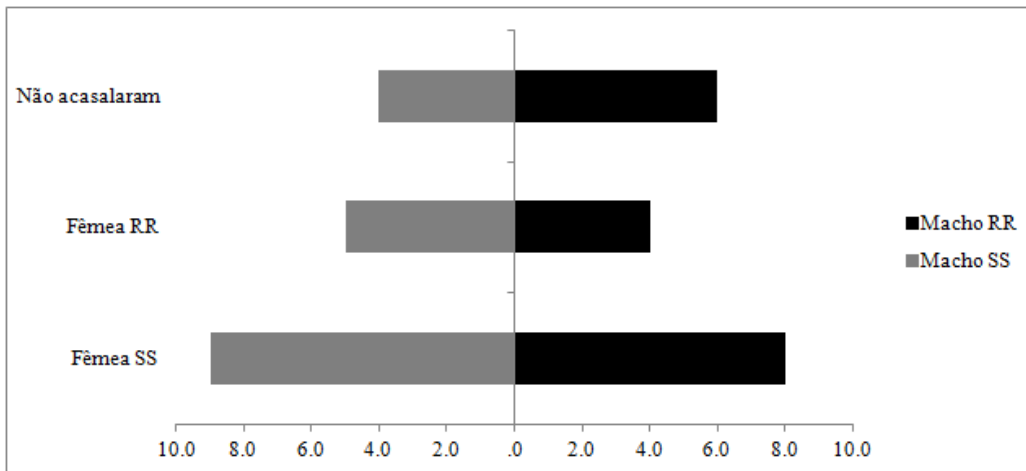


Figura 2: Preferência de acasalamento de machos de *S. frugiperda* resistentes (barras pretas) e susceptíveis (barras cinzas) em relação às fêmeas das populações resistentes (RR) ou susceptíveis (SS).

Confrontando a concentração do composto Z9-14: Ac nas duas populações, foi verificada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett ($gl = 1$, $K = 0.8331$, $P = 0.3614$), e a diferença entre as médias não

foi significativa ($gl = 72$, $t = -1.7282$, $P = 0.08826$). O mínimo, mediana, média, máximo, variância e desvio padrão da concentração do composto Z9-14: Ac em cada população e família podem ser observadas na Tabela 1.

Em populações susceptíveis, o composto Z11-16: Ac foi diagnosticado em 18.2% das amostras, enquanto que na população resistente esteve presente em 58.5%. Devido a isto, houve uma diferença significativa entre as amostras de glândulas de fêmeas susceptíveis e as amostras de fêmeas resistentes ($gl = 72$, $t = -4.085$, $P = 0.0001256$). Usando apenas as amostras em que o composto Z11-16: Ac foi detectado, a diferença na concentração deste nas populações não foi significativo ($\bar{x}_{SS} = 0.78617$, $\bar{x}_{RR} = 0.65913$, $gl = 44$, $t = -0.4453$, $P = 0.6583$). As médias da concentração dos compostos Z11-16: Ac em cada família podem ser observadas na Tabela 2. A porcentagem média dos compostos Z9-14: Ac e Z11-16: Ac podem ser vistas na Tabela 3.

Tabela 1: Mínimo, Mediana, Média, Máximo, Variância e Desvio Padrão do composto Z9:14-Ac nas famílias e populações de *S.frugiperda*

	SS	RR	SS2	SS4	SS7	SS8	SS9	SS10	SS11	SS16	RR1	RR3	RR6	RR7	RR8	RR9	RR14
Mínimo	1.30	0.90	3.10	2.50	1.90	1.30	3.20	1.60	2.60	2.60	2.10	2.00	2.50	2.60	2.80	3.40	0.90
Mediana	3.45	5.00	3.40	4.10	3.50	1.40	3.35	4.90	3.30	3.70	5.90	2.65	2.80	7.30	6.70	4.85	3.90
Média	4.48	6.30	3.40	9.50	3.45	1.93	3.40	6.33	3.16	3.73	8.30	2.57	2.83	8.71	5.38	5.40	4.00
Máximo	21.90	22.00	3.70	21.9	5.90	3.10	3.70	13.10	3.60	4.80	22.00	3.00	3.20	16.70	7.50	8.50	6.40
Variância	15.19	22.52	0.18	115.96	1.79	1.02	0.05	19.65	0.26	0.59	38.20	0.18	0.12	26.66	5.21	4.75	4.64
Desvio Padrão	3.89	4.74	0.42	10.76	1.34	1.01	0.21	4.43	0.51	0.76	6.18	0.43	0.35	5.16	2.28	2.18	2.15

Tabela 2: Mínimo, Mediana, Média, Máximo, Variância e Desvio Padrão do composto Z11:16-Ac nas famílias e populações de *S.frugiperda*

	SS	RR	SS2	SS4	SS7	SS8	SS9	SS10	SS11	SS16	RR1	RR3	RR6	RR7	RR8	RR9	RR14
Mínimo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mediana	0.00	1.25	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.70	0.45	0.00	1.95	0.00	1.60	0.00
Média	0.25	1.25	0.90	1.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.16	0.18	2.08	0.62	0.00	1.68	0.72	1.52	0.00
Máximo	3.00	4.80	1.20	3.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.50	1.30	4.8	1.60	0.00	3.1	2.10	2.90	0.00
Variância	0.43	1.81	0.72	3.00	0.00	0.00	0.00	0.61	0.08	0.24	2.21	0.60	0.00	1.59	1.01	1.41	0.00
Desvio Padrão	0.66	1.34	0.84	1.73	0.00	0.00	0.00	0.78	0.28	0.49	1.48	0.77	0.00	1.26	1.00	1.18	0.00

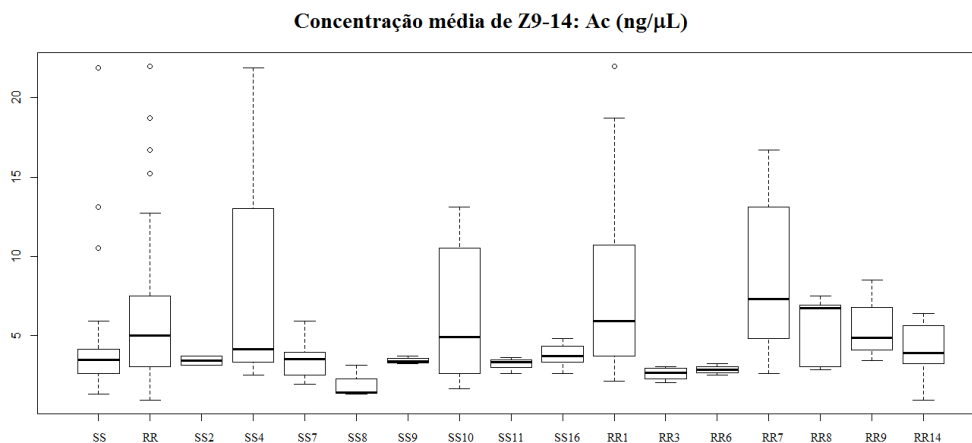


Figura 3: Média da concentração do composto Z9-14: Ac (ng/ μ L) nas populações susceptíveis (SS) e resistentes (RR) de *S. frugiperda*.

Com base no composto Z9-14: Ac, nas famílias da população susceptível as variâncias não são homogêneas, de acordo com o teste de Bartlett ($K = 41.1841$, $gl = 7$, $P = 0.0007463$). De acordo com os resultados obtidos com o teste de Kruskal-Wallis, não foi detectado diferença entre as famílias ($K = 7.603$, $gl = 7$, $P = 0.3689$).

Nas famílias da população resistente, tendo por base o composto Z9-14: Ac, as variâncias não são homogêneas, de acordo com o teste de Bartlett ($K = 27.1656$, $gl = 6$, $P = 0.0001348$). O teste de Kruskal-Wallis identificou que há diferença entre as famílias ($K = 14.9111$, $gl = 6$, $P = 0.02096$). Por este motivo, realizamos o teste de Wilcoxon, onde verificamos diferença entre as famílias RR1 e RR3 ($W = 48.5$, $P = 0.006342$), RR1 e RR6 ($W = 45.5$, $P = 0.01557$) e RR7 e RR14 ($W = 32$, $P = 0.04662$).

Avaliando as médias das concentrações do composto Z9-14: Ac, considerando uma similaridade superior a 60%, observou-se dois grupos, um grupo contendo as famílias SS4, SS10, RR1, RR7, RR8 e RR9, com alta

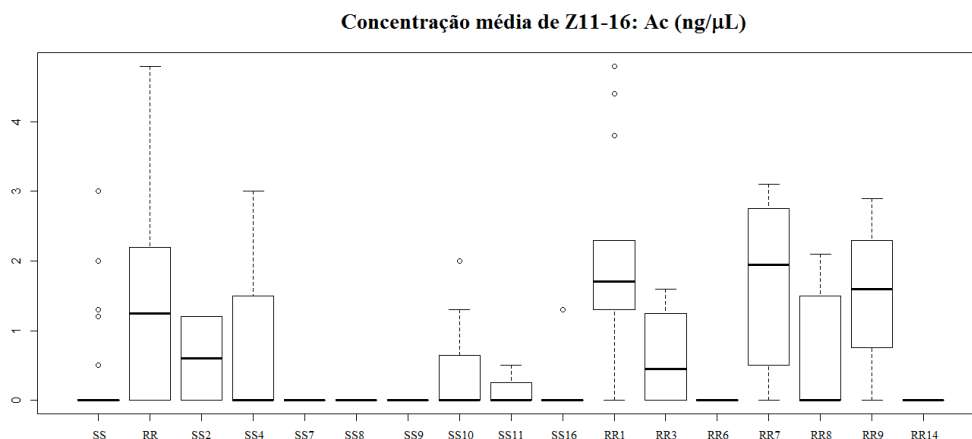


Figura 4: Média da concentração do composto Z11-16: Ac (ng/ μ L) nas populações susceptíveis (SS) e resistentes (RR) de *S. frugiperda*.

concentração do composto, e um segundo grupo contendo as famílias SS2, SS7, SS8, SS9, SS11, SS16, RR3, RR6 e RR14, com baixa concentração dos compostos. A diferença entre estes grupos não foi significativa ($t = 1.1813$, $gl = 15$, $P = 0.2559$). A similaridade entre as famílias, usando como referência o composto Z9-14: Ac pode ser observada na Figura 5.

Analisando as médias da concentração do composto Z11-16: Ac, obteve-se quatro grupos distintos, um grupo com a concentração do composto muito baixa (famílias SS11 e SS16), baixa (famílias SS10 e RR8), alta (famílias SS2, SS4 e RR3) e muito alta (RR1, RR7 e RR9), considerando similaridade superior a 60%. Neste caso, não houve diferença significativa entre os grupos onde a concentração foi muito baixa e baixa ($t = -2.7591$, $gl = 2$, $P = 0.1101$), muito baixa e alta ($t = -3.1742$, $gl = 3$, $P = 0.05032$), e baixa e alta ($t = -2.1677$, $gl = 3$, $P = 0.1187$). No entanto, houve diferença significativa entre os grupos onde a concentração foi muito baixa e muito alta ($t = -7.6534$, $gl = 3$, $P = 0.004633$), baixa e muito alta ($t = -6.7989$, $gl = 3$, $P = 0.006506$), e

Tabela 3: Porcentagem média das concentrações dos compostos Z9-14: Ac e Z11-16: Ac

Família	Z9-14: Ac (%)	Z11-16: Ac (%)
SS2	86.0	14.0
SS4	96.0	4.0
SS7	100.0	0.0
SS8	100.0	0.0
SS9	100.0	0.0
SS10	96.6	3.4
SS11	95.6	4.4
SS16	96.4	3.6
RR1	80.9	19.1
RR3	82.6	17.4
RR6	100.0	0.0
RR7	86.6	13.4
RR8	91.9	8.1
RR9	80.3	19.7
RR14	100.0	0.0

alta e muito alta ($t = -5.2464$, $gl = 3$, $P = 0.006312$). A similaridade entre as famílias, usando como referência o composto Z11-16: Ac pode ser observada na Figura 6.

O valor da estimativa do coeficiente de Pearson é 0,6848172 e a correlação é positiva entre os compostos Z9-14: Ac e Z11-16: Ac ($t = 2.658$, $gl = 8$, $P = 0,02889$).

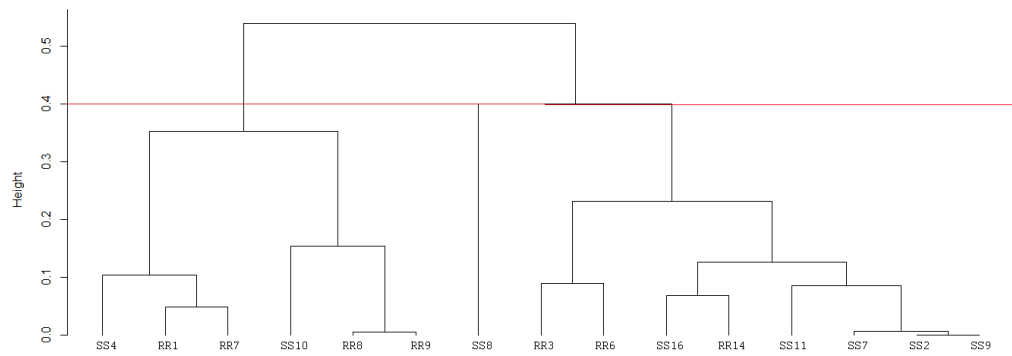


Figura 5: Agrupamento das famílias susceptíveis e resistentes de *S. frugiperda*, tendo por base a média da concentração do composto Z9-14:Ac separados em 2 grupos, considerando similaridade superior a 60%, de acordo com o método de Ward.

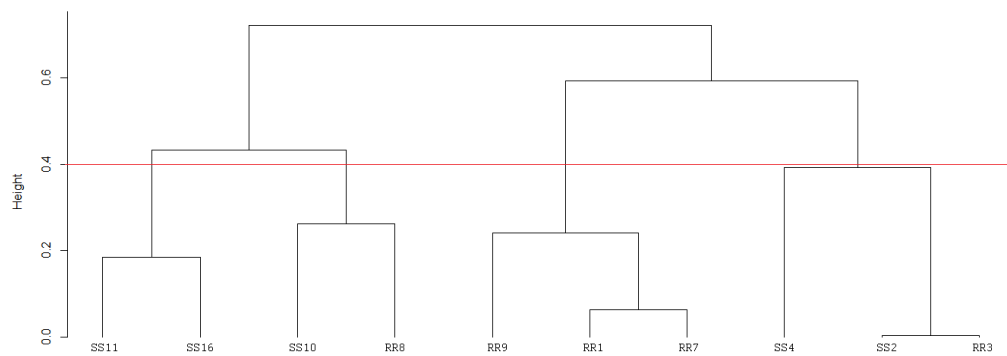


Figura 6: Agrupamento das famílias susceptíveis e resistentes de *S. frugiperda*, tendo por base a média da concentração do composto Z11-16:Ac, separados em 4 grupos, considerando similaridade superior a 60%, de acordo com o método de Ward.

4 Discussão

Os componentes do feromônios são relacionados uns com os outros através de vias biossintéticas comuns, com isso, espera-se que as quantidades relativas de alguns componentes na glândula secretora de feromônio sexual de uma fêmea sejam dependentes um do outro, e que a proporção de componentes múltiplos poderia ser controlada pelo mesmo gene(s). Usualmente, a variação na produção de um componente possui substanciais custos fisiológicos, com isso, um aumento da frequência desta variação não seria esperado. Na teoria básica de genética de populações, está indicado que, se a produção de um componente de feromônio for fundamentalmente neutra quanto à seleção (ou seja, não teve nenhum efeito na atração do sexo masculino e sem custo fisiológico), em seguida, uma única mutação resultando na produção substancial de um componente poderia fixar-se numa população devido à deriva. Isto poderia ser então seguido de um aumento de uma mutação que resulta na resposta do sexo masculino para o novo componente (Sheck *et al.*, 2006).

A evolução da resistência em insetos é pode estar associada com custo adaptativo, tais como o aumento do tempo de desenvolvimento, redução do tamanho do corpo, e a reprodução debilitada (Ferrari & Georghiou, 1981; Amin & White, 1984; El-Khatib & Georghiou, 1985; Halpern & Morton, 1987; Argentine *et al.*, 1989; Campanhola *et al.*, 1991; Carrière *et al.*, 1994). Campanhola *et al.* (1991) mencionam que a resistência pode resultar numa redução da produção de feromônios pelas fêmeas, bem como uma diminuição na capacidade dos machos para detectar uma fonte de feromônio. Além das limitações fisiológicas, Delisle & Vincent (2002) sugerem que a resistência também resulta em mudanças comportamentais significativas, que poderiam

alterar a aceitação do parceiro sexual, afetando o sucesso reprodutivo. No mosquito *Anopheles stephensi*, resistência à γ HCH / dieldrina alterou significativamente o nível e periodicidade da atividade de voo de machos e fêmeas, afetando a competitividade no acasalamento (Rowland, 1991). No presente trabalho, os resultados não demonstraram diferença na preferência de acasalamento entre as populações, indicando que a resistência a Bt em *S. frugiperda* não afetou o sucesso reprodutivo do inseto.

Delisle & Vincent (2002) em seu trabalho, diagnosticaram que a produção de feromônio foi significativamente menor em fêmeas de *Choristoneura rosaceana* (Harris, 1841) (Lepidoptera: Tortricidae), resistentes a vários inseticidas sintéticos (Reissig *et al.*, 1986; Carrière *et al.*, 1994, 1996; Lawson *et al.*, 1997; Smirle *et al.*, 1998; Pree *et al.*, 2001), com a diferença na concentração dos componentes do feromônio sexual mais pronunciada em fêmeas mais jovens do que mais velhas, sendo que esta diferença na concentração do feromônio foi referida como um custo direto associado à resistência. Contudo, em adultos de *O. furnacalis* tratados com deltrametrina, foi detectado maiores títulos de feromônio sexual e coeficientes de expansão da variação da taxa dos feromônios sexuais (Wei & Du, 2004). Em *S. litura*, após serem tratadas com uma dose subletal de deltametrina, foram obtidos resultados semelhantes (Wei *et al.*, 2004).

A partir da conjugação das toxinas de *B. thuringiensis* com a toxina de abamectina, formando o biopesticida BtA, Shen *et al.* (2013) avaliaram os efeitos deste biopesticida no feromônio sexual de *H. armigera* criadas em dieta artificial contendo doses subletais, sendo que nesse trabalho, as fêmeas tratadas com BtA produziram quantidades significativamente maiores dos compostos do feromônio sexual.

Nas avaliações realizadas neste trabalho, não houve diferença significativa entre as médias das populações no composto majoritário do feromônio sexual (Z9-14: Ac) ($P = 0.08826$), diferindo dos resultados obtidos por Delisle & Vincent (2002). Não foi verificada diferença do composto Z9-14: Ac nas famílias susceptíveis. Entretanto, entre as famílias RR1 e RR3, RR1 e RR6

e RR7 e RR14 foi verificado uma diferença significativa, onde a concentração do composto Z9-14: Ac foi maior nas famílias RR1 e RR7. Esta maior concentração do feromônio sexual pode estar relacionada com a resistência, como em *O. furnacalis* e *S. litura* tratados com deltrametrina (Wei & Du, 2004; Wei *et al.*, 2004) e *H. armigera* tratadas com BtA (Shen *et al.*, 2013).

Groot *et al.* (2010) afirmam que as alterações fenotípicas podem ocorrer para os componentes menos críticos de comunicação sexual, já que o impacto de tais modificações sobre o sucesso de acasalamento pode ser mínimo e pode variar com as condições ambientais. A teoria do rastreamento assimétrico propõe que machos e fêmeas experimentam regimes de seleção diferentes, fornecendo uma explicação interessante para a evolução da diversidade do feromônio sexual ao longo do tempo e espaço (Phelan, 1997; Bengtsson & Lofstedt, 2007). Seleção mais fraca em características sexuais de fêmeas pode permitir a persistência de alelos nas fêmeas que produzem misturas de feromônio desviantes e que poderiam ser rastreados por machos com uma janela ampla resposta (Phelan, 1997). Portanto, a chave para a compreensão da evolução da variação de feromônios é obtida demonstrando como a resposta do macho é determinada e distinguindo a natureza da variação desta característica (Lassance *et al.*, 2011). Devido a isso, podemos conjecturar que o baixo diagnóstico de Z11-16: Ac é devido a variação evolucionária em fêmeas, e a aceitação das mesmas não foi alterada devido à janela de resposta dos machos ser ampla. A seleção agindo ao nível de um gene particular, pode levar à perda de variação nos locais vizinhos desse gene, bem como em loci adjacentes, resultando em redução do padrão de variabilidade genética.

Existem diversas técnicas hierárquicas aglomerativas na análise de agrupamento, que se diferenciam pela forma de definir a proximidade entre os indivíduos dentro do grupo contendo vários indivíduos ou entre grupos de indivíduos (Liberato *et al.*, 1995). Apesar da abundância de técnicas, o pesquisador é o responsável por determinar qual a técnica mais adequada ao seu trabalho, uma vez que cada técnica leva a um diferente padrão de agrupamento (Manly, 1986; Cruz, 1990). Existe ainda dificuldade em definir

o número adequado de grupos formados na análise de agrupamento, pois não há um critério definitivo (Liberato *et al.*, 1995; Capucho, 2011).

Assim sendo, neste trabalho o agrupamento dos genótipos nos grupos foi baseado no Método de Ward, por ser o que melhor se adequou aos dados do experimento. Para o composto Z9-14: Ac, o padrão de agrupamento apontou dois grupos distintos, contudo, não houve diferença significativa entre estes grupos, do mesmo modo que não houve diferença entre as populações de trabalho. Para o composto Z11-16: Ac, houve a formação de quatro grupos distintos, com o grupo de famílias com a concentração do composto mais elevada (RR1, RR7 e RR9) diferindo significativamente dos demais. Entretanto, ao se avaliar este composto, quando presente nas duas populações, não foi possível observar essa diferença, devido a uma distribuição não uniforme na concentração do mesmo. Como já foi mencionado, os componentes do feromônio sexual são relacionados uns com os outros através de vias biossintéticas comuns. Neste trabalho observou-se que há uma correlação significativa entre os compostos do feromônio sexual em *S. frugiperda*. O grupo de famílias com a concentração do composto Z11-16: Ac muito alta (famílias RR1, RR7 e RR9) também pertencia ao grupo com concentração de Z9-14: Ac mais elevada. O mesmo foi observado com o grupo com a concentração do composto Z11-16: Ac muito baixa (famílias SS11 e SS16), que também pertencia ao grupo com menor concentração de Z9-14: Ac.

A fim de retardar o desenvolvimento da resistência dos insetos às toxinas de *B. thuringiensis*, a utilização de áreas de refúgio é uma alternativa recomendada (Alstad & Andow, 1995). O emprego de tais áreas para o manejo de resistência está relacionada com a ecologia do inseto, dispersão, e os padrões de acasalamento. Essas áreas destinam-se a fornecer um grande número de indivíduos homozigotos suscetíveis (SS) para acasalar com heterozigotos susceptíveis (SR) ou homozigotos resistentes raros (RR), diluindo os alelos de resistência presentes na população. Portanto, áreas de refúgio podem favorecer a ocorrência de acasalamento ao acaso entre as

populações em áreas tratadas e refúgio (Caprio, 1998). De acordo com o presente trabalho, não foi observado diferença na preferência de acasalamento entre as populações, o que garante o sucesso das áreas refúgio no manejo da resistência à Bt.

5 Conclusões

No presente trabalho não observamos diferença na preferência de acasalamento em relação à população susceptível e resistente à Bt, e também não foi detectado diferença na variância e concentração do composto Z9-14: Ac entre as populações de *S. frugiperda* susceptíveis e resistentes à *B. thuringiensis*.

Na população susceptível foi verificado poucas vezes o composto Z11-16: Ac, contudo, quando o composto foi diagnosticado, ele não diferiu da concentração encontrada na população resistente.

Houve uma correlação positiva entre as concentrações de Z9-14: Ac e Z11-16: Ac.

6 Referências

- Adams, R. G.; Murray, K. D. & Los, L. M. (1989). Effectiveness and selectivity of sex pheromone lures and traps for monitoring fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) adults in Connecticut sweet corn. *Journal of Economic Entomology*, 82, 285–290.
- Alstad, D. N. & Andow, D. A. (1995). Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 268, 1894–1896.
- Amin, A. M. & White, G. B. (1984). Relative fitness of organophosphate-resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 74, 591–598.
- Andrade, R.; Rodriguez, C. & Oehlschlager, A. C. (2000). Optimization of a pheromone lure for *Spodoptera frugiperda* (Smith) in Central America. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11, 609–613.
- Andrews, K. L. (1980). The whorlworm, *Spodoptera frugiperda*, in Central America and neighboring areas. *Florida Entomologist*, 63, 456–467.
- Argentine, J. A.; Clark, J. M. & Ferro, D. N. (1989). Relative fitness of insecticide-resistant colorado potato beetle strains (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 18, 705–710.
- Baker, T. C. (2002). Mechanism for saltational shifts in pheromone communication systems. *Proceedings of National Academy of Science*, 99, 13368–13370.
- Barros, E. M.; Torres, J. B. & Bueno, A. F. (2010). Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (JE

Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology*, 39, 996–1001.

Batista-Pereira, L. G.; Stein, K.; Paula, A. F. D.; A., J.; Cruz, I.; Figueiredo, M. L. C.; Jr., J. P. & Corrêa, A. G. (2006). Isolation, identification, synthesis, and field evaluation of the sex pheromone of the brazilian population of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, 32, 1085–1099.

Baxter, S. W.; Badenes-Pérez, F. R.; Morrison, A.; Vogel, H.; Crickmore, N.; Kain, W.; Wang, P.; Heckel, D. G. & Jiggins, C. D. (2011). Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189, 675–679.

Bengtsson, B. O. & Lofstedt, C. (2007). Direct and indirect selection in moth pheromone evolution: population genetical simulations of asymmetric sexual interactions. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90, 117–123.

Bentancourt, C. M. & Scatoni, I. B. (1996). *Lepidópteros de importancia económica. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales*. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.

Bergelson, J. & Purrington, C. B. (1996). Surveying patterns in the cost of resistance in plants. *American Naturalist*, 148, 536–558.

Bertels, A. (1970). Estudos da influência da umidade sobre a dinâmica de populações de lepidópteros pragas do milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 5, 67–79.

Betz, F. S.; Hammond, B. G. & Fuchs, R. L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 156–173.

Birch, M. C.; Poppy, G. M. & Baker, T. C. (1990). Scents and eversible scent structures of male moths. *Annual Review of Entomology*, 35, 25–58.

- Black, W. C. & Tabachnick, W. J. (2005). *Biology of Disease Vectors*, Elsevier Academic, chap. Population genetics of disease vectors. pp. 95–111.
- Brar, S. K.; Verma, M.; Tyagi, R. D. & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41, 323–342.
- Busato, G. R.; Grutzmacher, A. D.; Garcia, M. S.; Giolo, F. P. & Martins, A. F. (2002). Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. *Neotropical Entomology*, 31, 525–529.
- Butlin, R. & Ritchie, M. G. (1989). Genetic coupling in mate recognition systems: what is the evidence? *Biological Journal of the Linnean Society*, 37, 237–246.
- Butlin, R. & Trickett, A. J. (1997). *Insect Pheromone Research: New Directions*, Chapman & Hall, chap. Can population genetic simulations help to interpret pheromone evolution? pp. 548–562.
- Campanhola, C.; McCutchen, B. F.; Baehrecke, E. H. & Plapp, F. W. J. (1991). Biological constraints associated with resistance to pyrethroids in the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 84, 1404–1411.
- Capalbo, D. M. F.; Vilas-Bôas, G. T. & Arantes, O. M. N. (2004). *Biotecnologia e meio ambiente*, Folha de Viçosa, chap. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. pp. 309–350.
- Capinera, J. L. (2008). *Encyclopedia of entomology*, vol. 1-4. Springer, Dordrecht, The Netherlands., 2nd ed.

- Caprio, M. A. (1998). Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. *Journal of Economic Entomology*, 91, 1021–1031.
- Capucho, A. S. (2011). *Epidemiologia e resistência do cafeeiro conilon à ferrugem*. Ph.D. thesis, Universidade Federal de Viçosa.
- Cardé, R. T. & Baker, T. C. (1984). *Chemical ecology of insects*, Chapman & Hall, New York, chap. Sexual communication with pheromones. pp. 355–383.
- Cardé, R. T. & Minks, A. K. (1997). *Insect Pheromone Research: New Directions*. Chapman & Hall.
- Carrière, Y.; and D. A. Roff, J.-P. D. & Vincent, C. (1994). Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proceedings of the Royal Society B*, 258, 35–40.
- Carrière, Y.; Deland, J.-P. & Roff, D. A. (1996). Obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) resistance to insecticides: among-orchard variation and cross-resistance. *Journal of Economic Entomology*, 89, 577–582.
- Carrière, Y.; Ellers-Kirk, C.; Patin, A. L.; Sims, M. A.; Meyer, S.; Liu, Y. & Dennehy, T. J. (2001). Overwintering cost associated with resistance to transgenic cotton in the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*, 94, 935–941.
- Cartaxo, M. F. S. (2009). *Avaliação da diversidade genética de uma população de Culex quinquefasciatus proveniente de área sob intervenção para controle vetorial*. Master's thesis, Fundação Oswaldo Cruz.
- Casmuz, A.; Juárez, M. L.; Socías, M. G.; Murúa, M. G.; Prieto, S.; Medina, S.; Willink, E. & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del

gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69, 209–231.

Christou, P.; Capell, T.; Kohli, A.; Gatehouse, J. A. & Gatehouse, A. M. R. (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends in Plant Science*, 11, 302–308.

Cruz, C. D. (1990). *Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas*. Ph.D. thesis, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Cruz, I. (1995). *A lagarta-do-cartucho na cultura do milho*. Circular Técnica 21. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas.

Cruz, J. C. (2012). Sistemas de Produção 1 - Cultivo do Milho. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_8ed/index.htm>. Acesso em: 15/05/2013.

Delisle, J. & Vincent, C. (2002). Modified pheromone communication associated with insecticidal resistance in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Chemoecology*, 12, 47–51.

DePolania, I. Z.; Maldonado, H. A. A.; Cruz, R. M. & Sánchez, J. L. D. (2009). *Spodoptera frugiperda*: respuesta de distintas poblaciones a la toxina Cry1Ab. *Revista Colombiana de Entomología*, 35, 35–41.

Descoins, C.; Silvain, J. F.; Lalanne-Cassou, B. & Chéron, H. (1988). Surveillance des insectes ravageurs des cultures par piégeage sexuel des males dans les départements de la Guadeloupe et de la Guyane. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 21, 53–65.

Dobzhansky, T. (1951). *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York, 3rd ed.

- Edwards, D. L.; Payne, J. & Soares, G. G. (1998). Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. *European Patents Applications*, 303–426.
- El-Khatib, Z. I. & Georghiou, G. P. (1985). Comparative fitness of temephosresistant, -susceptible, and hybrid phenotypes of the southern house mosquito (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, 78, 1023–1029.
- Feitelson, J. S. (1994). Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Annual Meeting of the Society For Invertebrate Pathology*, 184.
- Ferré, J. & Rie, J. V. (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47, 501–533.
- Ferré, J.; Rie, J. V. & Macintosh, S. C. (2008). *Integration of insect resistant genetically modified crops within IPM programs*. Springer Science and Business Media., The Netherlands, Dordrecht, chap. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). pp. 41–85.
- Ferrari, J. A. & Georghiou, G. P. (1981). Effects on insecticidal selection and treatment on reproductive potential of resistant, susceptible, and heterozygous strains of the southern house mosquito. *Journal of Economic Entomology*, 74, 323–327.
- Ffrench-Constant, R. H.; Rocheleau, T. A. & Chalmer, J. C. S. A. E. (1993). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, 363, 449–451.
- Field, L. M.; Devonshire, A. L. & .G.Forde, B. (1988). Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochemical Journal*, 251, 309–312.

- Fitzpatrick, S. M. & McNeil, J. N. (1988). Male scent in lepidopteran communication: the role of male pheromone in mating behavior of *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 146, 131–151.
- Fournier, D.; Bride, J.-M.; F.Hoffmann & F.Karch (1992). Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *Journal Biological Chemistry*, 267, 14270–14274.
- Gahan, L. J.; Pauchet, Y.; Vogel, H. & Heckel, D. G. (2010). An ABC Transporter Mutation Is Correlated with Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin. *Plos Genetics*, 6, e1001248.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira-Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Baptista, G. C.; Berti-Filho, E.; Alves, J. R. P. P. S. B.; Vendramin, J. D.; Marchini, L. C.; Lopes, J. R. S. & Omoto, C. (2002). *Manual de Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ.
- Garczynski, S. F.; Crim, J. W. & Adang, M. J. (1991). Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2816–2820.
- Gill, S. S. (1995). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90, 69–74.
- Gill, S. S.; Cowles, E. A. & Pietrantonio, P. V. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Annual Review of Entomology*, 37, 615–636.
- Glare, T. R. & Ocallaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis biology, ecology and safety*. John Wiley & Sons.
- Goldsmith, M. & Marec, F. (2010). *Molecular biology and genetics of the Lepidoptera*. CRC Press.

- Groeters, F. R.; Tabashnik, B. E.; Finson, N. & Johnson, M. W. (1994). Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Evolution*, 48, 197–201.
- Groeters, F. T.; Tabashnik, B. E.; Finson, N. & Johnson, M. W. (1993). Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 86, 1035–1039.
- Groot, A. T.; Classen, A.; Staudacher, H.; Schal, C. & Heckel, D. G. (2010). Phenotypic plasticity in sexual communication signal of a noctuid moth. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 2731–2738.
- Guillemaud, T.; Lenormand, T.; Bourguet, D.; Chevillon, C.; Paster, N. & Raymond, M. (1998). Evolution of resistance in *Culex pipiens*: allele replacement and changing environment. *Evolution*, 52, 443–453.
- Habib, M. E. M. & Andrade, C. F. S. (1998). *Controle microbiano de insetos*, Manole, chap. Bactérias entomopatogênicas. pp. 383–446.
- Halpern, M. E. & Morton, R. A. (1987). Reproductive and developmental defects in a malathion-resistant, laboratory-selected population of *Drosophila melanogaster*. *Pesticida Biochemistry and Physiology*, 28, 44–56.
- Hawthorne, D. (1998). Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. *Journal of Economic Entomology*, v., 565–571.
- Herrero, S.; Gechev, T.; Bakker, P.; Moar, W. & de Maagd, R. (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC genomics*, 6, 96.
- Higuchi, M.; Haginoya, K.; Yamazaki, T.; Miyamoto, K.; Katagiri, T.; Tomimoto, K.; Shitomi, Y.; Hayakawa, T.; Sato, R. & Hori, H. (2007).

Binding de *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxinas para escovar vesículas de membrana fronteira do intestino médio de Cry1Ac suscetíveis e resistentes *Plutella xylostella*. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B: Bioquímica e Biologia Molecular*, 147, 716–725.

Janmaat, A. F. & Myers, J. H. (2005). The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, 1031–1038.

Jones, R. L. & Sparks, A. N. (1979). (Z)-9-Tetradecen-1-ol acetate: a secondary sex pheromone of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Journal of Chemical Ecology*, 5, 721–725.

Jurat-Fuentes, J. L.; Karumbaiah, L.; Jakka, S. R. K.; Ning, C.; Liu, C.; Wu, K.; Jackson, J.; Gould, F.; Blanco, C.; Portilla, M. *et al.* (2011). Reduced levels of membrane bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Plos One*, 6, e17606.

Jurenka, R. (2003). Biochemistry of female moth sex pheromones. insect pheromone biochemistry and molecular biology. *Elsevier Academic Press*, 53–80.

Juárez, M. L.; Murúa, M. G.; García, M. G.; Ontivero, M.; Vera, M. T.; Vilardi, J. C.; Groot, A. T.; Castagnaro, A. P.; Gastaminza, G. & Willink, E. (2012). Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of Economic Entomology*, 105, 573–582.

Kraaijeveld, A. R. & Godfray, H. C. (1997). Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 389, 278–280.

Lassance, J.-M.; Bogdanowicz, S. M.; Wanner, K. W.; C.Lofstedt & Harrison, R. G. (2011). Gene genealogies reveal differentiation at sex pheromone olfactory receptor loci in pheromone strains of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Evolution*, 65, 1583–1593.

Lawson, D. S.; Reissig, W. H. & Smith, C. M. (1997). Response of larval and adult obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) to selected insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 90, 1450–1457.

Liberato, J. R.; Cruz, C. D. & Zambolim, F. X. R. V. L. (1995). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, chap. Técnicas estatísticas de análise multivariada aplicada a fitopatologia - I. Análise de componentes principais, análise canônica e t't'cluster análise". pp. 227–281.

Liu, Y.; Tabashnik, B. & Puzsai-Carey, M. (1996). Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89, 798–804.

Liu, Y.; Tabashnik, B. E.; Dennehy, T. J.; Patin, A. L. & Bartlett, A. C. (1999). Development time and resistance to Bt crops. *Nature*, 400, 519.

Luikart, G.; England, P. R.; Tallmon, D.; Jordan, S. & Taberlet, P. (2003). The power and promise of populations genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, 4, 981–994.

Luo, K.; Banks, D. & Adang, M. J. (1999). Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 457–464.

Luttrell, R. G.; Wan, L. & Knighten, K. (1999). Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 92, 21–32.

- Lynch, R. E.; Wiseman, B. R.; Plainsted, D. & Warnik, D. (1999). Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1A(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm. *Journal Economic Entomology*, 92, 246–252.
- Maagd, R. A. D. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37, 409–433.
- Maia, A. H. N. (2003). *Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análise de incertezas*. Ph.D. thesis, Universidade de São Paulo.
- Manly, B. F. J. (1986). *Multivariate statistical methods: A primer*. Chapman and Hall.
- Martins, E. S. (2005). *Clonagem, expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de Bacillus thuringiensis, em insetos-praga*. Master's thesis, (Mestrado em Patologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde.
- Matten, S. R.; Head, G. P. & Quemada, H. D. (2008). How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops within IPM programs. In: *SIntegration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*, Springer, New York. pp. 27–39.
- Maund, C. M. (1995). Pheromone trap results (1995) for sweet corn insect pests: corn earworm, *Helicoverpa zea*, (Boddie); fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Adaptative Research Report*, 17, 203–212.
- Mayr, E. (1963). *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge.

- McKenzie, J. A. (1996). *Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance*. G. Landes Company.
- McNair, M. (1991). Why the selection of resistance to anthropogenic toxins normally involves major gene changes: the limits of natural selection. *Genetica*, 84, 213–219.
- Mitchell, E. R. (1979). *Movement of highly mobile insects: concepts and methodology in research*, NCSU University Graphics, N.C. State University, Raleigh, NC., chap. Migration by *Spodoptera exigua* and *S. frugiperda*, North American style. pp. 386–393.
- Mitchell, E. R.; Agee, H. R. & Heath, R. R. (1989). Influence of pheromone trap color and design on the capture of male velvetbean caterpillar and fall armyworm moths (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology*, 15, 1775–1784.
- Mitchell, E. R.; Copeland, W. W.; Sparks, A. N. & Sekul, A. A. (1974). Fall armyworm: Disruption of pheromone communication with synthetic acetates. *Environmental Entomology*, 3, 778–780.
- Mitchell, E. R.; Tumlinson, J. H. & McNeil, J. N. (1985). Field evaluation of commercial pheromone formulations and traps using a more effective sex pheromone blend for the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Economic Entomology*, 78, 1364–1369.
- Monnerat, R. S. & Bravo, A. (2000). *Controle biológico*, Embrapa Meio Ambiente, chap. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. pp. 163–200.
- Moraes, I. O.; Capalbo, D. M. F. & Arruda, R. O. M. (2001). *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*, Edgar Blücher, chap. Produção de bioinseticidas. pp. 245–265.

- Nagoshi, R. N. (2009). Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? *Journal of Economic Entomology*, 102, 210–218.
- Orr, H. A. & Coyne, J. A. (1992). The genetics of adaptation: a reassessment. *American Naturalist*, 140, 725–742.
- Pair, S. D.; Raulston, J. R.; Westbrook, J. K. & Douce, J. K. (1986). Fall armyworm distribution and population dynamics in the southeastern states. *Florida Entomologist*, 69, 468–487.
- Pair, S. D.; Raulston, J. R.; Westbrook, J. K.; Wolf, W. W. & Adams, S. D. (1991). Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) outbreak originating in the lower rio grande valley. *Florida Entomologist*, 74, 200–213.
- Paterson, H. E. H. (1985). *Species and speciation*, Transvaal Museum Monograph, Pretoria, chap. The recognition concept of species. 4.
- Pedigo, L. P. (1989). *Entomology and pest management*. MacMillan.
- Phelan, P. L. (1992). *Insect Chemical Ecology*, Chapman & Hall, chap. Evolution of sex pheromones and the role of asymmetric tracking. pp. 245–264.
- Phelan, P. L. (1997). *The evolution of mating systems in insects and arachnids*, Cambridge Univ. Press, chap. Evolution of mate-signaling in moths: phylogenetic considerations and predictions from the asymmetric tracking hypothesis. pp. 240–256.
- Pietrantonio, P. V.; Federici, B. A. & Gill, S. S. (1993). *Parasites and pathogens of insects*, New York Academic Press, chap. Interaction of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with the insect midgut epithelium. pp. 55–79.
- Pinheiro, D. H. (2013). *Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda escovada da membrana (BBMV's) do intestino médio de Spodoptera*

frugiperda e Diatraea saccharalis e avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina em isolados de Bacillus thuringiensis. Ph.D. thesis, Universidade Federal de Lavras.

Pogue, G. M. (2002). A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society*, 1, 202.

Polanczyk, R. & Alves, S. (2003). *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. *Agrociência*, 7, 1–10.

Pree, D. J.; Whitty, K. J.; Pogoda, M. K. & Bittner, L. A. (2001). Occurrence of resistance to insecticides in populations of the obliquebanded leafroller from orchards. *Canadian Entomologist*, 133, 93–103.

R Development Core Team (2011). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raulston, J. R.; Pair, S. D.; Sparks, A. N.; Loera, J.; Pedraza, F. A.; Jimenez, S.; Palamon, A.; Ortega, A.; Sánchez, J. R.; Marquez, P. & et al. (1986). Fall armyworm distribution and population dynamics in the Texas-Mexico Gulf Coast Area. *Florida Entomologist*, 69, 455–468.

Reissig, W. H.; Stanley, B. H. & Hebding, H. E. (1986). Azinphosmethyl resistance and weight-related response of obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) larvae to insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 79, 329–333.

Roelofs, W. L. & Cardé, R. T. (1974). *Pheromones*, North-Holland, chap. Sex pheromones in the reproductive isolation of lepidopterous species. pp. 96–114.

- Roush, R. T. & Daly, J. C. (1990). *Pesticide resistance in arthropods*, Chapman and Hall, chap. The role of population genetics in resistance research and management. pp. 97–152.
- Rowland, M. (1991). Activity and mating competitiveness of γ HCH/dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and *An. Stephensi* mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Medical and Veterinary Entomology*, 5, 207–222.
- Sekul, A. A. & Sparks, A. N. (1967). Sex pheromone of the fall armyworm moth: isolation, identification and synthesis. *Journal of Economic Entomology*, 60, 1270–1272.
- Sena, J. A. D.; Hernandez-Rodriguez, C. S. & Ferré, J. (2009). Interaction of *Bacillus thuringiensis* Vry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2236–2237.
- Sheck, A. L.; Groot, A. T.; Ward, C. M.; Gemeno, C.; Wang, J.; Brownie, C.; Schal, C. & Gould, F. (2006). Genetics of sex pheromone blend differences between *Heliothis virescens* and *Heliothis subflexa*: a chromosome mapping approach. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 600–617.
- Shen, L.-Z.; Chen, P.-Z.; Xu, Z.-H.; Deng, J.-Y.; Harris, M.-K.; Wanna, R.; Wang, F.-M.; Zhou, G.-X. & Yao, Z.-L. (2013). Effect of larvae treated with mixed biopesticide *Bacillus thuringiensis* - abamectin on sex pheromone communication system in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Plos One*, 8, 1–10.
- Siebert, M. W.; Tindall, K. R.; Leonard, B. R.; Duyn, J. W. V. & Babcock, J. M. (2008). Evaluation of corn hybrids expressing Cry1F (Herculex I Insect Protection) against fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the southern United States. *Journal of Entomological Science*, 43, 41–51.

- Smadja, C. & Butlin, R. K. (2009). On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity*, 102, 77–97.
- Smirle, M. J.; Vincent, C.; Zurowski, C. & Rancourt, B. (1998). Azinphosmethyl resistance in the obliquebanded leafroller, *Choristoneura rosaceana*: reversion in the absence of selection and relationship to detoxication enzyme activity. *Pesticida Biochemistry and Physiology*, 61, 183–189.
- Sparks, A. N. (1979). A review of the biology of the fall armyworm. *Florida Entomologist*, 62, 82–87.
- Starrat, A. N. & Mcleod, D. G. R. (1982). Monitoring fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), moth population in southwestern Ontario with sex pheromone traps. *Canadian Entomologist*, 114, 545–549.
- Tabashnik, B. E.; Finson, N.; Groeters, F. R.; Moar, W. J.; Johnson, M. W. & Luo, K. (1994). Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proceedings of National Academy of Science*, 91, 4120–4124.
- Tabashnik, B. E. & Roush, R. T. (1990). *Pesticide resistance in arthropods*, Chapman and Hall, chap. Introduction. pp. 1–3.
- Tamez-Guerra, P.; Galán-Wong, L. J.; Medrado-Roldán, H.; García-Gutiérrez, C.; Rodríguez-Pádilla, C.; Gómez-Flores, R. A. & Tamez-Guerra, R. S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización em México. *Ciência UANL*, 4, 145–152.
- Tingle, F. C. & Mitchell, E. R. (1979). *Spodoptera frugiperda*: Factors affecting pheromone trap catches in corn and peanuts. *Environmental Entomology*, 8, 989–992.

Tumlinson, J. H.; Mitchell, E. R.; Teal, P. E. A.; Heath, R. R. & Mengelkoch, L. J. (1986). Sex pheromone of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (j e smith) identification of components critical to attraction in the field. *Journal of Chemical Ecology*, 12, 1909–1925.

Vaeck, M.; Reynaerts, A.; Höfte, H.; Jansens, S.; De Beuckeleer, M.; Dean, C.; Zabeau, M.; Montagu, M. V. & Leemans, J. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328, 33–37.

Valicente, F. H. & Barreto, M. R. (1999). Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (j. e. smith) (lepidoptera: Noctuidae), na região de cascavel, pr. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 28, 333–337.

Vilas-Bôas, G. T.; Peruca, A. P. S. & Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 673–687.

Waddill, V. H.; Mitchell, E. R.; Denton, W. H.; Poe, S. L. & Schuster, J. (1982). Seasonal abundance of the fall armyworm and velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) at four locations in Florida. *Florida Entomologist*, 65, 350–354.

Wei, H. Y. & Du, J. W. (2004). Sublethal effects of larval treatment with deltamethrin on moth sex pheromone communication system of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80, 12–20.

Wei, H. Y.; Huang, Y. P. & Du, J. W. (2004). Sex pheromones and reproductive behavior of *Spodoptera litura* (Fabricius) moths reared from larvae treated with four insecticides. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1457–1466.

Weiser, J. (1986). *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft*, Berlin Paul Parey, chap. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. pp. 37–50.

Wiseman, B. R.; Painter, R. H. & Wassom, C. E. (1966). Detecting corn seedling differences in the greenhouse by visual classification of damage by the fall armyworm. *Journal Economic Entomology*, 59, 211–214.