

NATÁLIA ALVES LEITE

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE UMA LINHAGEM DE
Spodoptera frugiperda AO MILHO TRANSGÊNICO EXPRESSANDO CRY1F**

**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
2012**

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

T

L533s
2012

Leite, Natália Alves, 1987-

Seleção e caracterização da resistência de uma linhagem de
Spodoptera frugiperda ao milho transgênico expressando
Cry1F / Natália Alves Leite. – Viçosa, MG, 2011.
vii, 34f. : il. ; 29cm.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 28-34

1. Lagarta-do-cartucho. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Milho -
Doenças e pragas. 4. *Zea mays*. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.781

NATÁLIA ALVES LEITE

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE UMA LINHAGEM DE
Spodoptera frugiperda AO MILHO TRANSGÊNICO EXPRESSANDO CRY1F**

**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: 10 de Fevereiro de 2012.

**Simone Martins Mendes
(Coorientadora)**

**Raul Narciso Carvalho Guedes
(Coorientador)**

Analiza Piovesan Alves

André Luiz Barreto Crespo

**Eliseu José Guedes Pereira
(Orientador)**

Aos meus pais, Antônio e Ana, meus exemplos;

Aos meus irmãos, Rubens e Marcos;

Aos meus tios, Magid e Ângela, pelo apoio;

Aos meus avós, José, Maria e Milton;

Ao meu namorado, Roberto;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Criador que concedeu a dádiva da vida, a força e a sabedoria necessária para essa jornada.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, à Embrapa Milho e Sorgo e a CAPES por fornecerem subsídios para a realização de trabalho.

Ao professor Eliseu José Guedes Pereira, pela confiança depositada e pela orientação amigável e enriquecedora durante estes dois anos de mestrado.

À Dr^a. Simone Martins Mendes e ao Dr. José Magid Waquil pela imprescindível ajuda, paciência, acolhimento, amizade e conselhos durante o mestrado.

Ao professor Raul pela co-orientação e amizade.

Aos amigos do laboratório de Ecotoxicologia: Érick, Eduardo, Hudson, Juliana, Ronnie, Conrado e Nelsa pelo acolhimento, ajuda e ótima convivência, e, principalmente, ao Alberto e ao Lucas, que me ajudaram na coleta inicial de lagartas, ao Hipólito, pela grande amizade e apoio, e à Katherine grande amiga, confidente e por me ajudar em todos os momentos.

Aos meus queridos estagiários Thaís e Gustavo, pela amizade e enorme ajuda no início dos meus trabalhos.

Aos amigos da Embrapa: Eustáquio, Vieira, Ismael, Carlinhos, Christiane, Andréia, Octávio e Tatiane pela essencial ajuda nos ensaios realizados na confecção deste trabalho.

A toda minha família, irmãos, primos, tios e avós, principalmente aos meus tios Magid e Ângela que foram os meus segundos pais.

Ao Roberto pelo carinho, paciência e força que me ajudaram muito nessa jornada.

Aos meus pais Antônio e Ana, que sempre acreditaram que o estudo é a maior herança que poderiam deixar aos seus filhos.

Muito obrigada a todos!

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1. Origem e manutenção de <i>S. frugiperda</i> em laboratório	5
2.2. Seleção para a resistência a Cry1F	6
2.3. Sobrevivência em folhas de milho Cry1F após seleção	8
2.4. Resistência cruzada em casa de vegetação	9
2.5. Herança da resistência e custo adaptativo.....	10
2.6. Análises dos dados	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Seleção para a resistência a Cry1F	12
3.2. Sobrevivência em folhas de milho Cry1F após seleção	14
3.3. Resistência cruzada em casa de vegetação	15
3.4. Herança da resistência e custo adaptativo.....	16
4. DISCUSSÃO	21
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

LEITE, Natália Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Seleção e caracterização da resistência de uma linhagem de *Spodoptera frugiperda* ao milho transgênico expressando Cry1F.** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientadores: Simone Martins Mendes e Raul Narciso Carvalho Guedes.

A obtenção de linhagens resistentes de insetos-praga em laboratório pode ser usada como uma importante ferramenta na análise de risco de resistência de insetos e na elaboração, teste e aprimoramento de estratégias de manejo da resistência de insetos às plantas transgênicas. No Brasil, desde a safra 2009/2010 tem-se utilizado com eficiência o milho expressando a toxina Cry1F, derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), para o manejo da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). O fato de *S. frugiperda* ser multivoltina no Brasil, associado ao seu histórico de desenvolvimento de resistência a diferentes classes de inseticidas sintéticos, a constante exposição de populações a toxinas *Bt* em eventos transgênicos e a elevada adoção da tecnologia gera preocupação relacionada ao potencial de evolução de resistência dessa praga a toxinas *Bt*, especialmente em áreas em que práticas de manejo de resistência não sejam adotadas adequadamente. Nesse sentido, objetivou-se nesse trabalho obter uma linhagem resistente de *S. frugiperda* à toxina Cry1F, a fim de determinar a herança da resistência, o seu custo adaptativo e a resistência cruzada a outras toxinas de *Bt*. Durante o processo de seleção em laboratório, a exposição crônica de *S. frugiperda* a folhas de milho expressando a toxina Cry1F foi mais eficiente que a exposição gradual na seleção de indivíduos resistentes, sendo que com apenas quatro gerações de seleção foi obtida uma linhagem com elevada sobrevivência a exposição a Cry1F, semelhante a insetos controle mantidos sem pressão de seleção. Os dados de sobrevivência de insetos recuperados de plantas de milho expressando Cry1F em casa de vegetação comprovaram o sucesso da seleção dos mesmos. Ensaio de resistência cruzada em casa de vegetação demonstraram que a seleção para resistência a Cry1F não afetou a sobrevivência da linhagem selecionada no milho que expressa Cry1Ab e naquele que expressa conjuntamente Cry1Ab.105 e Cry2Ab2, indicando não haver resistência cruzada entre tais toxinas e Cry1F. Cruzamentos recíprocos entre as linhagens susceptível e selecionada para resistência a Cry1F e cálculos de dominância revelaram que a resistência é de caráter autossômico e incompletamente recessivo ou aditivo. Entretanto, é possível que o cálculo de dominância esteja superestimado devido à origem da linhagem susceptível. Além disso, não foi detectado custo adaptativo associado à resistência. Este é o primeiro estudo realizado no Brasil que mostra que *S. frugiperda* responde a pressão de seleção para

resistência à toxina Cry1F e os resultados dessa investigação têm implicações práticas ao manejo da resistência, os quais são discutidos nessa dissertação. A disponibilidade dessa linhagem resistente possibilitará o seu uso para refinar recomendações de estratégias de manejo da resistência de *S. frugiperda* ao milho transgênico expressando toxinas de *Bt*.

ABSTRACT

LEITE, Natália Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Selection and characterization of resistance in a strain of *Spodoptera frugiperda* to transgenic corn expressing Cry1F.** Advisor: Eliseu José Guedes Pereira. Co-advisors: Simone Martins Mendes and Raul Narciso Carvalho Guedes.

The availability of laboratory resistant strains of insect pests is important to analyze the risk of insect resistance and to elaborate, test, and improve resistance management strategies to transgenic plants. In Brazil, maize expressing the Cry1F toxin, derived from the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), for management of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), has been used effectively since the 2009/2010 season. The fact that *S. frugiperda* is multivoltine in Brazil, associated with its history of developing resistance to different classes of synthetic insecticides, the constant exposure of populations to *Bt* toxins in transgenic events, and the high adoption of this technology raises concern related to the potential evolution of resistance to *Bt* toxins in this pest, especially in areas where resistance management practices are not taken properly. In this regard, this work aimed to establish a resistant strain of *S. frugiperda* to the Cry1F toxin in order to determine the inheritance of the resistance, its fitness costs and cross-resistance to other *Bt* toxins. During the selection process in the laboratory, chronic exposure of *S. frugiperda* to maize leaves expressing Cry1F toxin was more effective than gradual exposure in the selection of resistant individuals, and with only four generations of selection a strain with a high survival rate when exposed to the toxin was obtained, with similar survivorship of a control strain maintained without selection pressure. The survival data of insects recovered from maize plants expressing Cry1F in the greenhouse showed the success of selection for resistance to the toxin. Cross-resistance essays in the greenhouse showed that selection for Cry1F resistance did not affect the survival of selected strain in maize hybrids expressing Cry1Ab or Cry1Ab.105 and Cry2Ab2 together, indicating no cross-resistance between those toxins and Cry1F. Reciprocal crosses between the unselected and the Cry1F-selected strains revealed that the resistance is autosomal and incompletely recessive or additive. However, it is possible that the dominance calculation is overestimated due to the origin of susceptible strain utilized. Furthermore, there was no apparent fitness costs associated with resistance. To my knowledge, this is the first study in Brazil showing that *S. frugiperda* responds to selection pressure for Cry1F resistance, and the results have important practical implications for resistance management, which are discussed in this thesis. The availability of this resistant strain will allow its use to refine recommendations for resistance management strategies of *S. frugiperda* to transgenic maize expressing *Bt* toxins.

1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é endêmica no continente Americano (Johnson, 1987) causando perdas importantes em diversas culturas como: milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossipium* spp. L.), alfafa (*Medicago sativa* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e gramíneas em geral (Sparks, 1986). Na cultura do milho, no Brasil, estas perdas podem chegar a 39% da produção (Cruz *et al.*, 1999). *Spodoptera frugiperda* é considerada praga de grande importância econômica, não somente pelos danos provocados, mas especialmente pela dificuldade de seu controle (Leiderman & Sauer, 1953; Cruz & Turpin, 1983).

A disponibilidade de milho transgênico resistente a lagartas auxiliou no manejo dessa praga, o que foi possível pela expressão heteróloga de proteínas inseticidas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (*Bt*) nas plantas. As toxinas de *Bt* podem ser expressas constitutivamente em concentrações relativamente constantes ou podem ser restritas a estádios da planta, tecidos, ou ambos (Cerdeira & Paoletti, 2004). No entanto, eventos transgênicos de milho atualmente disponíveis no mercado brasileiro expressam a toxina de forma constitutiva. As toxinas de *Bt* predominantes nas culturas transgênicas são do tipo Cry, abreviação dada a toxinas de *Bt* que formam cristais durante a fase de esporulação dessa bactéria. No estado solúvel, essas toxinas matam os insetos susceptíveis por se ligarem a receptores específicos na membrana das células epiteliais do mesêntero, desestruturando esse tecido pela abertura de poros na membrana das células (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2005) ou desencadeando mecanismo de morte celular (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Outras proteínas, também produzidas por essa bactéria, são as proteínas citolíticas (Cyt), proteínas inseticidas da fase vegetativa (VIP), entre outras (Glare & O'callaghan, 2000). Em 2002, o milho expressando a proteína Cry1F foi, pela primeira vez, comercializado nos Estados Unidos da América para o controle da broca-européia-do-milho, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Chambers *et al.*, 1991). No ano de 2009, essa proteína foi introduzida e comercializada em híbridos de milho no mercado brasileiro. Estudos prévios mostram que essa proteína é relativamente mais eficiente do que Cry1Ab e Cry1Ac para *S. frugiperda* (Waquil *et al.*, 2002).

Os benefícios da adoção das culturas *Bt* variam no tempo e no espaço dependendo da abundância e susceptibilidade das pragas e características da cultura. Tais benefícios podem incluir redução de populações de pragas-alvo em escala regional, aumento da produtividade e redução no uso de inseticidas (Hunt *et al.*, 2007; Buntin, 2008; Ma *et al.*, 2009), o que, conseqüentemente, reduz o risco destes compostos à saúde humana e ao ambiente. O impacto negativo em insetos não-alvo são, geralmente, menores com a utilização de culturas

Bt em relação a inseticidas de amplo espectro de ação (Romeis *et al.*, 2006; Wolfenbarger *et al.*, 2008; Naranjo, 2009). Assim, espera-se que híbridos expressando a toxinas de *Bt* sejam seguros e efetivos como opção no manejo de *S. frugiperda*.

A evolução da resistência, em populações de pragas-alvo de controle pelas culturas *Bt*, é uma grande ameaça ao uso sustentável dessa tecnologia (Ferré & Van Rie, 2002; Manyangarirwa *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008a). O alto risco ocorre devido à expressão contínua de proteína inseticida ao longo do desenvolvimento fenológico das plantas *Bt*, exercendo uma elevada pressão de seleção sobre as populações de insetos, favorecendo o desenvolvimento de biótipos resistentes das espécies-alvo (Ferré & Van Rie, 2002; Pereira *et al.*, 2008b). A evolução da resistência a uma cultura *Bt* implica na diminuição da susceptibilidade de uma população de um inseto alvo a mesma (Tabashnik *et al.*, 2009), e consequente redução na eficácia de controle. Os insetos praga são muito bem sucedidos na adaptação a inseticidas e outras táticas de controle (Palumbi, 2001; Onstad, 2008). No caso de *S. frugiperda*, há vários relatos de resistência a inseticidas utilizados no seu controle no Brasil e nos EUA (Mccord & Yu, 1987; Yu, 1991; Omoto & Diez-Rodríguez, 2001). Além disso, foi documentado um caso de resistência ao milho transgênico expressando a proteína Cry1F, no campo, em Porto Rico (Storer *et al.*, 2010).

Assim como no caso de inseticidas sintéticos, para retardar a evolução da resistência em insetos praga às culturas *Bt*, é necessário o desenvolvimento de estratégias de manejo apropriadas. O manejo da resistência de insetos a inseticidas refere-se a um conjunto de procedimentos proativos aplicados em áreas agrícolas com a finalidade de prevenir, retardar, detectar e mitigar a evolução da resistência das pragas aos agentes empregados no seu controle (Roush, 1997; Onstad, 2008; Machado & Fiuza, 2011). Uma etapa importante no auxílio da determinação de estratégias de manejo da resistência de insetos a plantas transgênicas expressando toxinas *Bt* é a obtenção de populações em laboratório apresentando elevados níveis de resistência a estas toxinas (Pereira *et al.*, 2008a; Pereira *et al.*, 2008b). Populações resistentes são importantes na análise de risco de resistência de insetos e na elaboração, teste, desenvolvimento e aprimoramento de estratégias de manejo da resistência de insetos às plantas transgênicas. Na maioria dos relatos de resistência a *Bt*, as populações de insetos foram selecionadas para resistência sob condições de laboratório. Esses experimentos de seleção têm sido realizados usando-se uma variedade de produtos de *Bt*, entre eles misturas formuladas de cristais e esporos, células encapsuladas de *Pseudomonas fluorescens* expressando proteínas Cry, protoxinas Cry, toxinas Cry e materiais derivados de plantas transgênicas expressando proteínas *Bt* (Ferré & Van Rie, 2002). Respostas variadas a seleção têm sido obtidas em experimentos conduzidos com populações de Lepidoptera,

Diptera e Coleoptera (Macgaughey, 1985; Tabashnik *et al.*, 1990; Whalon *et al.*, 1993; Gould *et al.*, 1995; Wirth *et al.*, 1997; Tabashnik *et al.*, 2000; Chaufaux *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2008b).

A disponibilidade de populações resistentes fornece material para estudo da resistência antes que ela ocorra no campo, permitindo o estudo da herança e do custo da resistência, determinação das bases bioquímicas e fisiológicas, a obtenção de estimativas de frequência de alelos de resistência em populações de campo e, potencialmente, o desenvolvimento de ferramentas moleculares para monitorar a evolução da resistência no campo. A implementação de estratégias de manejo da resistência de pragas a pesticidas, o que se aplica também a plantas *Bt*, depende do conhecimento de fatores genéticos, biológicos e operacionais que influenciam no processo da evolução da resistência (Georghiou & Taylor, 1977). A determinação da herança da resistência e do custo adaptativo dos indivíduos resistentes em relação aos susceptíveis são importantes componentes para a elaboração e refinamento de programas de manejo da resistência (Tabashnik, 1991; Mckenzie, 2000). De acordo com Roush & Daly (1990), para um completo estudo da resistência são necessários avaliar o número de genes envolvidos, as relações de dominância e as bases genéticas da resistência cruzada entre os diversos inseticidas, nesse caso, toxinas de *Bt*.

O estudo da herança da resistência permite conhecer a base genética associada a um dado mecanismo de resistência, isto é, se a resistência é dominante ou recessiva, autossômica ou ligada ao sexo, monogênica ou poligênica (Roush & Mackenzie, 1987). Cruzamentos recíprocos entre linhagens susceptíveis e resistentes são utilizados para determinar a dominância (Tabashnik, 1991; Mckenzie, 2000). A obtenção de uma população resistente também permite conhecer se há custo associado à resistência (Coustau *et al.*, 2000). O custo da resistência ocorre quando, na ausência de toxinas, o valor adaptativo (i.e., *fitness*) de indivíduos com alelos de resistência é menor que aquele de indivíduos sem alelos de resistência. Os alelos que conferem resistência a toxinas de *Bt*, pelo menos em estágios iniciais, podem ter efeitos pleiotrópicos negativos que causam um custo adaptativo ao indivíduo (Carrière *et al.*, 1994), o que pode levar à baixa frequência de alelos de resistência nas populações que não tenham sido expostas a culturas *Bt* (Coustau *et al.*, 2000; Gassmann *et al.*, 2009). É incerto se a resistência a xenobióticos está sempre associada a custo adaptativo. No entanto, algumas estratégias de manejo propostas assumem sua presença (Tabashnik, 1994; Gould, 1998; Onstad, 2008). Assim, é importante documentar o custo adaptativo em populações de insetos a fim de desenvolver estratégias de manejo adequadas.

Entre as estratégias propostas para o manejo da resistência em milho transgênico, a alta dose/refúgio e a combinação (piramidação) de mais de uma toxina com diferentes sítios

de ação têm sido apontadas como as mais eficientes (Roush, 1997; Gould, 1998; Roush, 1998; Zhao *et al.*, 2005). A alta-dose/refúgio pressupõe um padrão recessivo de herança, ou seja, a expressão de altas doses deve eliminar a grande maioria dos indivíduos heterozigotos, de modo que a resistência torne-se funcionalmente recessiva (Roush & Mackenzie, 1987). Essa tem sido a estratégia predominante proposta para manejo da resistência das pragas alvo das culturas *Bt* (Gould, 1998). Entretanto, dependendo do nível de tolerância das pragas alvos às toxinas, como é o caso de algumas lagartas Noctuidae, uma alta dose é difícil de ser atingida com a expressão heteróloga na planta transgênica e a saída é a adoção de estratégias de manejo alternativas (Bates *et al.*, 2005; Martinelli & Omoto, 2005). Já na estratégia de piramidação não deve haver resistência cruzada entre as toxinas expressas na planta transgênica (Zhao *et al.*, 2005), sendo que essa estratégia permite a potencial redução no tamanho da área de refúgio mantendo ou aumentando o potencial de durabilidade dessas toxinas (Caprio, 1998; Gould, 1998).

Desse modo, a disponibilidade e a caracterização de linhagens de genótipos reconhecidamente susceptíveis e resistentes em laboratório fornecem informações essenciais para o desenvolvimento e aprimoramento de um plano racional de manejo de resistência (Gould, 1998). Além disso, populações resistentes podem ainda ser úteis como ferramenta para validação experimental de táticas de manejo de resistência propostas (Liu & Tabashnik, 1997; Perez *et al.*, 1997; Shelton *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2001).

Em se tratando de *S. frugiperda*, o hábito polífago das lagartas aliado à alta capacidade de reprodução e dispersão dos adultos e também de resposta a pressão de seleção para resistência a inseticidas indicam uma alta capacidade para adaptação de populações dessa espécie-praga aos métodos de controle usados contra ela. Assim, faz-se necessário a condução de estudos visando determinar o risco de desenvolvimento de resistência a toxinas *Bt* produzidas em plantas transgênicas. Desse modo, fornecendo dados que venham permitir a escolha de estratégias adequadas ao manejo da resistência dessa espécie-praga no Brasil. Portanto, o presente trabalho, teve como objetivo selecionar uma linhagem de *S. frugiperda* à toxina Cry1F, a fim de determinar a herança da resistência (i.e., dominante ou recessiva, autossômica ou ligada ao sexo), o seu custo adaptativo e a resistência cruzada a outras toxinas *Bt*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem e manutenção de *S. frugiperda* em laboratório

Os insetos selecionados para resistência a Cry1F foram coletados em dois municípios de Minas Gerais: Matozinhos (mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte; 19°33'50"S, 44°3'39"W) e Iraí de Minas (mesorregião do Triângulo Mineiro; 18°59'5"S, 47°27'51"W). Lavouras de milho transgênico Cry1F foram localizadas por técnicos da Embrapa Milho e Sorgo em novembro de 2010 e as plantas com sintomas de ataque de *S. frugiperda* foram examinadas para coleta dos indivíduos eventualmente presentes. Foram coletadas 121 lagartas em Matozinhos e 96 lagartas em Iraí, as quais foram acondicionadas individualmente em recipientes de 50 mL. Os recipientes foram identificados, colocados em caixa de isopor e levados ao laboratório. Posteriormente, uma triagem foi realizada para seleção dos indivíduos sadios, os quais deram origem a duas populações [Iraí (Ir) e Matozinhos (Ma)] que foram mantidas no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos da Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo (CNPMS), em Sete Lagoas, MG.

Os insetos foram mantidos com dieta artificial adaptada de Kasten Jr. *et al.* (1978) sem exposição a nenhum inseticida, por cinco gerações até o início do experimento de seleção. Lagartas neonatas (< 24h de idade) foram transferidas ao acaso para 24 recipientes plásticos de 50 mL contendo em média sete gramas de dieta artificial. Os recipientes foram vedados com tampas de acrílico e após sete dias foi feita nova repicagem, colocando-se duas lagartas por recipiente num total de 168 recipientes e assim foram mantidas até a fase de pupa. Os adultos, cerca de 100 a 150 indivíduos, foram transferidos para uma gaiola de PVC de 40 cm h x 30 cm Ø, recoberta internamente com folhas de papel sulfite para oviposição. Estes foram alimentados com uma solução a base de açúcar (10%) e ácido ascórbico (5%). Do mesmo modo que as lagartas, os adultos foram acondicionados em ambiente controlado com temperatura de 26 ± 3 °C, umidade relativa de 70 ± 15 % e fotofase de 12 horas. As massas de ovos foram coletadas, após cinco dias da montagem das gaiolas, e armazenadas em saco plástico (10 L), no mesmo ambiente controlado, até eclosão das lagartas.

2.2. Seleção para a resistência a Cry1F

O processo de seleção foi realizado de abril a outubro de 2011 utilizando-se folhas de milho *Bt* do evento TC1507 (híbrido 30F35H da Pioneer), que expressa à forma ativa da toxina Cry1F. O milho foi semeado, semanalmente, no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo a partir de 17 de março de 2011. Cada semeadura constituiu-se de uma parcela com cinco linhas de 20 m com cinco plantas/metro. Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para o cultivo do milho (Cruz, 2010), sem aplicação de inseticidas, fungicidas e herbicidas, sendo o controle de plantas daninhas realizado por capina manual.

Para se obter a população base para seleção com maior variabilidade genética, foi efetuado cruzamento dos insetos de Iraí e Matozinhos. Um total de 144 adultos, 80 fêmeas e 64 machos de cada população, foram acondicionados numa gaiola de PVC descrita anteriormente. A progênie deste cruzamento foi dividida em três sub-populações ou linhagens. Uma linhagem denominada IrmaC foi mantida na ausência de pressão de seleção com Cry1F (controle), sendo alimentada apenas com dieta artificial como descrito anteriormente. Outra linhagem, IrmaF, foi submetida à pressão de seleção com folhas de milho Cry1F, estágio V4-V9, durante toda a fase larval, a cada geração. A última linhagem, IrmaD, foi selecionada com folhas de milho Cry1F, estágio V4-V9, por tempos crescentes de exposição durante o desenvolvimento larval, a cada geração (Tabela 1). Assim, duas metodologias de seleção foram testadas: i) larvas se alimentando em tempo integral de milho Cry1F e 2) larvas se alimentando gradualmente de milho Cry1F. Esses dois regimes de seleção foram utilizados para representar condições de alta e baixa pressão de seleção respectivamente, esperando-se obter respostas distintas como prevê a teoria (Roush & Mackenzie, 1987). Os insetos foram mantidos em ambiente controlado conforme descrito anteriormente.

O experimento de seleção para resistência a Cry1F foi iniciado na primeira geração após o cruzamento dos indivíduos de Matozinhos e Iraí, sendo conduzidos com as três linhagens como descrito a seguir. A linhagem IrmaC foi usada como controle para obtenção de estimativas de mortalidade natural durante todo o experimento. Foram transferidas cinco lagartas neonatas (< de 24h de vida) por recipiente plástico de 50 mL contendo sete gramas de dieta artificial totalizando 240 lagartas. Após 72 h, foi anotado o número de lagartas sobreviventes e estas foram individualizadas, para evitar o canibalismo, em recipientes (50 mL) contendo a mesma dieta. Outra parte das lagartas eclodidas (aproximadamente 1000

indivíduos) foi transferida para recipientes (50 mL) e após 72 h sem terem sido avaliadas foram individualizadas a fim de manter um alto número de indivíduos (Tabela 1).

Para a linhagem IrmaD, uma parte das lagartas neonatas (aproximadamente 1000 indivíduos) foi acondicionada em dois potes cilíndricos (1,5 L), cada um contendo 70 g de folhas do milho Cry1F para se obter um número suficiente de sobreviventes e dar prosseguimento ao experimento. Outra parte foi transferida para recipientes de 50 mL, também contendo folhas do milho Cry1F (preenchendo o volume do recipiente, em forma de cartucho), na quantidade de cinco lagartas por recipiente. Estas totalizando 240 indivíduos que foram avaliados para estimar mortalidade. Na primeira geração de seleção e após 72 horas de exposição a Cry1F os sobreviventes foram individualizados em recipientes de 50 mL contendo dieta artificial sem a toxina até a pupação. Nas demais gerações do experimento, procedimento semelhante foi realizado nas primeiras 72 h e depois as lagartas foram individualizadas em recipientes contendo folhas de milho Cry1F, sendo que a cada geração o tempo de exposição as folhas de milho Cry1F foi aumentado gradualmente (Tabela 1). Após o período de exposição a Cry1F, os sobreviventes foram transferidos para recipientes contendo dieta artificial, exceto na quinta geração quando estiveram expostos à toxina por todo período larval. As folhas de milho foram substituídas a cada dois dias e o número de lagartas individualizadas variou a cada geração dependendo da sobrevivência, mas nunca foi inferior a 480 (Tabela 1).

O procedimento de seleção da linhagem IrmaF foi semelhante ao anterior, exceto que foi realizada exposição crônica dos indivíduos ao milho Cry1F durante toda fase larval. Para as três linhagens e em cada geração do experimento, foi avaliada a sobrevivência larval às 72 h com base numa amostra de 240 indivíduos, dos quais, no mínimo 48 foram avaliados para estimativa da sobrevivência até adulto.

Os adultos das três linhagens foram mantidos conforme descrito anteriormente, sendo contabilizado o número de adultos liberados por gaiola em cada geração de seleção. Daqueles avaliados que chegaram à fase adulta obteve-se a razão sexual (RS = número de fêmeas/número de machos + fêmeas) (Tabela 1). O procedimento de coleta das posturas também foi o mesmo descrito anteriormente.

Tabela 1 – Histórico da seleção realizada nas linhagens IrmaF e IrmaD e manutenção da linhagem IrmaC, de *Spodoptera frugiperda* durante cinco gerações.

Geração	Tempo em Cry1F (dias)			Nº adultos (por gaiola)			Nº lagartas individualizadas			Nº indivíduos adultos (amostra)			Razão Sexual ⁴		
	F*	D*	C*	F	D	C	F	D	C	F	D	C	F	D	C
	1 ^a	t ¹	3	0	-	144 ²	-	720	480	360	34	66	46	0,32	0,47
2 ^a	t	6	0	103	110	103	600	480	360	71	71	61	0,45	0,56	0,48
3 ^a	t	8	0	130 ³	160	160	600	432	360	49	41	68	0,39	0,46	0,51
4 ^a	t	10	0	156	122	140	480	600	432	72	48	66	0,44	0,44	0,47
5 ^a	t	t	0	144	144	168	720	480	600	79	46	73	0,42	0,57	0,59

* F, D, e C representam as linhagens IrmaF, IrmaD e IrmaC, respectivamente.

¹t = tempo total (indivíduos alimentados durante toda fase larval).

²Uma gaiola contendo 144 indivíduos adultos deu origem as três populações Irma.

³Dois gaiolas, cada qual com 130 indivíduos adultos.

⁴Razão Sexual (RS = número de fêmeas/número de machos + fêmeas).

2.3. Sobrevivência em folhas de milho Cry1F após seleção

Na sexta geração após seleção, as linhagens IrmaC, IrmaD e IrmaF foram avaliadas quanto ao desempenho no híbrido de milho P30F35H expressando Cry1F e o seu isogênico não-*Bt* (P30F35) (Pioneer Sementes, Santa Cruz do Sul, RS). O procedimento se deu da mesma forma como descrito anteriormente para seleção da linhagem IrmaF. Todavia, as lagartas foram mantidas em recipientes contendo folhas de milho Cry1F e controle de acordo com o tratamento. Às 72 h foi avaliada a sobrevivência em 48 recipientes contendo cinco lagartas para cada tratamento. Posteriormente as lagartas foram individualizadas em 48 recipientes para quantificação da sobrevivência até adulto (até a fase adulta). A sobrevivência até adulto contabilizou a sobrevivência às 72 h. O valor foi estimado a partir da multiplicação da média da sobrevivência às 72 h pelas quatro médias geradas pela sobrevivência após esse período (de 48 indivíduos foram retiradas quatro médias a cada 12 indivíduos).

As plantas de milho de onde foram retiradas as folhas ofertadas aos insetos foram testadas para expressão qualitativa de Cry1F. Semanalmente, foram retiradas amostras de folhas dos cartuchos de 10 plantas. Essas amostras foram submetidas à imunodeteção da proteína de interesse usando tiras ImmunoStrip STX 10301/0050 (Agdia Inc., Elkhart, IN,

EUA) conforme instruções do fabricante. Todos os testes foram normais para ausência ou presença da proteína (Figura 1).

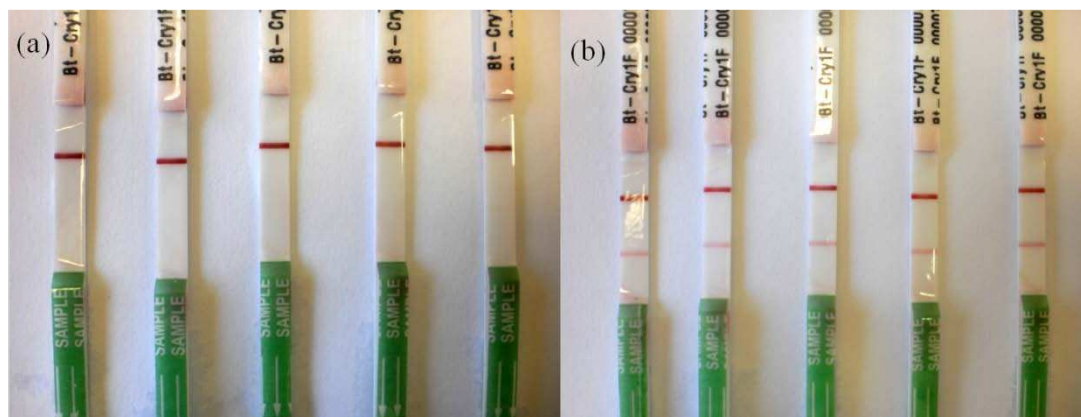


Figura 1. Fitas do teste de imunodeteção de Cry1F em folhas de plantas de milho usadas neste trabalho. a) Tiras de cinco amostras de plantas de milho P30F35 (controle, i.e. não-Cry1F) mostrando apenas as linhas controle. b) Tiras de amostras de cinco plantas de milho P30F35H mostrando as linhas controle (superiores) e as linhas indicadoras da presença de Cry1F (inferiores).

2.4. Resistência cruzada em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, no período de dezembro de 2011 a janeiro de 2012, com temperatura de 25 ± 5 °C, umidade relativa de 70 ± 15 %. Dez tratamentos foram combinados em esquema fatorial: cinco híbridos de milho [(i) P30F35H (Cry1F) (ii) P30F35Y (Cry1Ab) (iii) P30F35, não-*Bt* isogênico dos dois híbridos anteriores, (iv) DKB390 Cry1A.105+ Cry2Ab2, e (v) DKB390, não-*Bt*] e duas linhagens de *S. frugiperda* (IrmaF e IrmaC na sétima geração após a seleção para resistência a Cry1F). As plantas foram semeadas em vasos de 20 L preenchidos com solo e adubados com 50 g de NPK 08-28-16 e 0,3% de Zn por 100 Kg de solo. Foram semeadas seis sementes por vaso e após desbaste, foram deixadas quatro plantas por vaso, as quais foram irrigadas diariamente. Ao atingir o estágio V4, as plantas passaram a ser adubadas semanalmente com o fertilizante BIOFERT plus (Natural Rural, Araraquara-SP) diluindo-se 30 mL do produto em 20 L de água e aplicando 0,5 L em cada vaso. As plantas dos híbridos P30F35H e P30F35 foram testadas quanto a expressão da toxina Cry1F usando o kit ImmunoStrip STX 10301/0050 (Agdia Inc., Elkhart, IN, EUA).

A linhagem IrmaF, na sexta geração, foi mantida expondo-se as larvas a folhas de milho Cry1F por três dias e selecionando-se os sobreviventes, que foram transferidos para dieta artificial até a pupação. A IrmaC foi mantida em dieta artificial sem pressão de seleção. As larvas da sétima geração ao eclodirem foram usadas para infestação manual das plantas (cinco neonatas/planta) no estágio V4-V6 usando-se um pincel fino, sendo as plantas de quatro vasos (repetições) infestadas com cada linhagem de *S. frugiperda*, totalizando 20 insetos/vaso/híbrido de milho. Os vasos foram cobertos com gaiolas de ferro revestidas com tecido *voil*. Quatorze dias após a infestação, foi avaliado o número de lagartas sobreviventes.

2.5. Herança da resistência e custo adaptativo

A herança da resistência de *S. frugiperda* ao milho expressando a proteína Cry1F foi estudada na sexta geração após a seleção usando cruzamentos recíprocos massais da linhagem selecionada (IrmaF) e controle (IrmaC) (Alves *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008a; Crespo *et al.*, 2009). A determinação do sexo das linhagens parentais se deu nas pupas e foi confirmado a partir da coloração das asas dos adultos. Os adultos apresentam dimorfismo sexual nas asas anteriores. As fêmeas têm coloração marrom acinzentada uniforme, com as manchas orbicular e reniforme pouco nítida. Nos machos, a coloração é mais escura, com manchas brancas características no ápice e entre as manchas orbicular e reniforme (Romano, 2002). Para cada cruzamento recíproco (IrmaF♂ x IrmaC♀ e IrmaF♀ x IrmaC♂) foram utilizados 60 indivíduos de cada linhagem.

A progênie F₁ foi testada para avaliar se a resistência é autossômica ou ligada ao sexo e sua dominância. O bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições em esquema fatorial de quatro linhagens de *S. frugiperda* (IrmaC, IrmaF e as duas progênies do cruzamento recíproco) por dois genótipos de milho (P30F35H e P30F35), perfazendo oito combinações de tratamentos. A unidade experimental foi constituída de uma seção de um suporte de isopor com 12 recipientes de plástico de 50 mL. Cinco neonatas foram acondicionadas em cada recipiente contendo folhas de milho, totalizando 240 indivíduos avaliados de cada linhagem em cada milho. Após 72 h, o número de larvas sobreviventes foi avaliado e estas foram individualizadas em novos recipientes de 50 mL contendo folhas milho Cry1F ou controle. Deste estágio adiante, para cada combinação dos tratamentos foram avaliados 48 indivíduos distribuídos aleatoriamente em quatro seções de 12 recipientes, a qual constituiu a unidade experimental (repetição). As folhas foram substituídas a cada dois dias até que se completasse o período larval ou até a morte do inseto.

Os parâmetros avaliados foram: (i) sobrevivência larval aos 14 dias; (ii) biomassa de larva aos 14 dias; (vi) biomassa de pupa, determinada no primeiro dia em que ela foi observada no recipiente de criação; e (iii) período de desenvolvimento até adulto, calculado com base no dia da eclosão das lagartas até a emergência do adulto. Para considerar conjuntamente algumas características fenotípicas de *S. frugiperda* avaliadas, foi calculado o Índice de Adaptação pela fórmula [(sobrevivência larval × biomassa pupal) ÷ período de desenvolvimento larval] (Boregas, 2009). Esse é baseado no Índice de Susceptibilidade de Penceo & Martins (1982) e pressupõe que biomassa de pupa se correlaciona com fecundidade (Leuck & Perkins, 1972).

A manutenção dos insetos utilizados durante todo o bioensaio, bem como das gaiolas e oviposições, se deu em ambiente controlado como descrito no item 2.2.

2.6. Análises dos dados

A média de sobrevivência e seu erro padrão foram plotados para cada geração de seleção. Para obter a resposta à seleção, a sobrevivência até adulto das linhagens parentais IrmaF e IrmaD foram submetidas a análise de regressão linear (PROC REG) (Sas Institute, 2002) pelo ajuste da sobrevivência das respectivas progênes.

Os resultados do ensaio de sobrevivência em folhas de milho Cry1F foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial (3 linhagens de *S. frugiperda* x 2 híbridos milho) e posteriormente ao teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD ou teste t, $P < 0,05$) (PROC GLM) (SAS Institute, 2002).

No experimento de resistência cruzada em casa de vegetação, os dados de sobrevivência nos genótipos de milho *Bt* foram ajustados pela sobrevivência nos respectivos genótipos de milho isogênicos controle usando a correção de Abbott (1925). Esses dados foram então submetidos à análise de variância a $P < 0,05$ (PROC MIXED) (SAS Institute, 2002) para comparação da sobrevivência das linhagens de *S. frugiperda* dentro de cada genótipo de milho *Bt*.

Nos bioensaios de herança da resistência e custo adaptativo, os dados de sobrevivência biomassa individual, período de desenvolvimento e índice de adaptação foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial (4 genótipos de *S. frugiperda* x 2 híbridos milho) e posteriormente ao teste da diferença mínima significativa de Fisher (LSD ou teste t, $P < 0,05$) (PROC GLM) (SAS Institute, 2002).

Para todas as análises estatísticas nesta dissertação, os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias (PROC MIXED seguido de PROC UNIVARIATE e PROC GPLOT) (SAS Institute, 2002).

A dominância efetiva (Dx) da resistência de *S. frugiperda* relativa à concentração de toxina expressa nas plantas de milho Cry1F foi calculada como: $Dx = (X_{RR} - X_{SS}) / (X_{RS} - X_{SS})$, onde X_{RR} , X_{RS} , e X_{SS} são os valores quantitativos para um caráter X para homozigotos resistentes, heterozigotos, e homozigotos susceptíveis, respectivamente (Liu & Tabashnik, 1997; Bourguet *et al.*, 2000). Os valores de Dx podem variar de 0 (resistência completamente recessiva) a 1 (resistência completamente dominante). Quando Dx é 0,5, a resistência é referida como codominante ou aditiva. As características utilizadas para o cálculo da dominância 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 à toxina. A escolha da sobrevivência aos 14 dias também foi auxiliada pela análise de correlação de Pearson das sobrevivências em vários estádios da fase larval ($P < 0,05$) (PROC CORR) (SAS Institute, 2002). Para os dados dos indivíduos F_1 , utilizou-se a média das duas progênes F_1 dos cruzamentos recíprocos, dado a semelhança observada na resposta delas. O *fitness* dos indivíduos não selecionados foi estimado como o valor fenotípico de uma característica para os indivíduos controle (IrmaC) dividido pelo valor fenotípico da característica para os indivíduos selecionados (IrmaF). Da mesma forma, o *fitness* dos indivíduos híbridos F_1 foi estimado como o valor fenotípico de uma característica para a progênie F_1 dividido pelo valor fenotípico da característica para indivíduos selecionados (IrmaF). Para cada genótipo de *S. frugiperda* (IrmaC, F_1 e IrmaF), a estimativa de sobrevivência no milho Cry1F foi ajustada pela sobrevivência no milho controle usando a correção de Abbott (1925). Procedimento semelhante foi realizado para a porcentagem de ganho de peso, a qual foi calculada em relação ao ganho de peso de cada genótipo no milho controle e para o índice de adaptação relativo, que foi calculado em relação ao índice de adaptação de cada genótipo no milho controle.

3. RESULTADOS

3.1. Seleção para a resistência a Cry1F

A sobrevivência média, a cada geração, das linhagens IrmaC (controle), IrmaD e IrmaF está representada na Figura 2. Como esperado, a sobrevivência da linhagem IrmaC em dieta, mantida na ausência de pressão de seleção durante o experimento, se manteve

relativamente constante a cada geração. Na primeira geração e segunda gerações de seleção, a sobrevivência das linhagens IrmaF e IrmaD foi crescente e de modo semelhante (18% e 30%, respectivamente). Entretanto, a sobrevivência dessas linhagens foi significativamente menor que da linhagem IrmaC em dieta, demonstrando que houve resposta sob pressão de seleção. A partir da terceira geração a sobrevivência da linhagem IrmaF foi significativamente diferente da linhagem IrmaD, sendo que esta teve uma pequena elevação na sobrevivência apenas na quinta geração. Já na quarta geração, a sobrevivência da linhagem IrmaF foi semelhante à da IrmaC, o que demonstra o sucesso na seleção.

Na Figura 3 observa-se a resposta à seleção das linhagens IrmaD e IrmaF, através regressão da sobrevivência até adulto da progênie pela sobrevivência dos genitores. A linhagem IrmaF apresentou significativo ganho de sobrevivência a exposição à toxina Cry1F no decorrer do experimento, porém o mesmo não ocorreu para a linhagem IrmaD, a qual não apresentou significativo ganho em sobrevivência. Isso indica que o método de seleção da IrmaD foi menos eficiente que o método usado na outra linhagem, sendo que apenas o ganho de sobrevivência na segunda geração aparenta ter sido significativo (Figura 2).

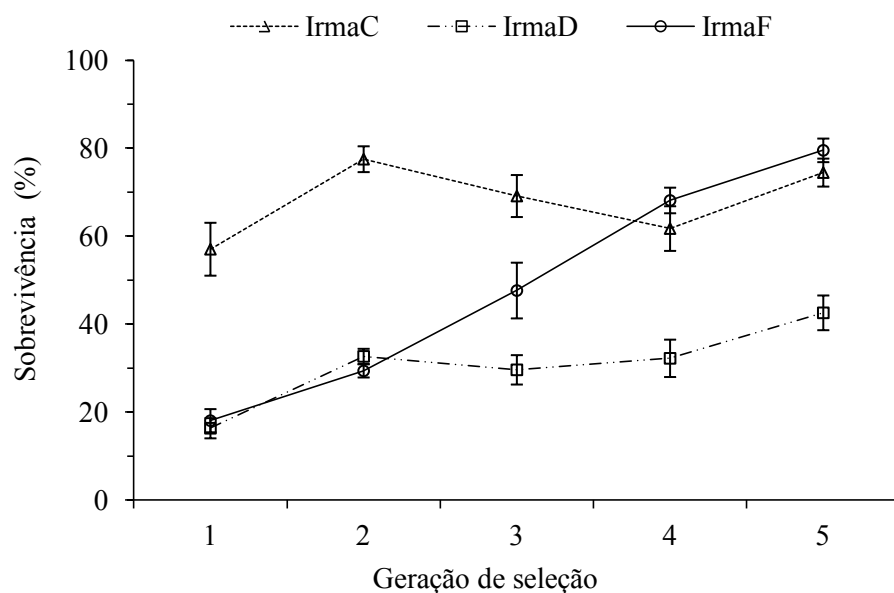


Figura 2. Sobrevivência até adulto (média \pm erro padrão) em cinco gerações de seleção para resistência à toxina Cry1F. A linhagem IrmaF foi mantida com exposição crônica à toxina, enquanto que na linhagem IrmaD, a exposição à toxina foi gradual. A linhagem IrmaC (controle) foi mantida em dieta artificial sem pressão de seleção.

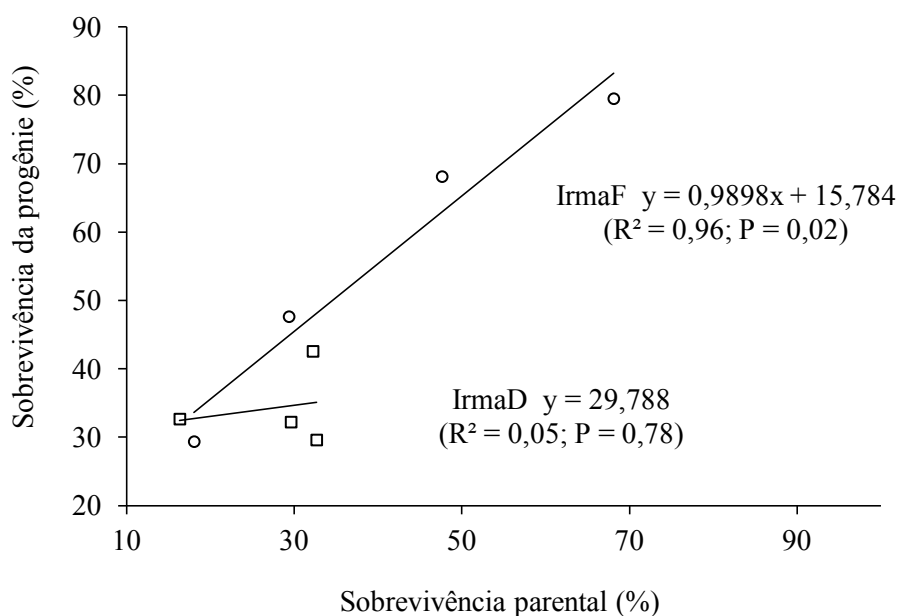


Figura 3. Resposta à seleção de *Spodoptera frugiperda* para resistência a Cry1F nas cinco gerações de seleção em laboratório. A linhagem IrmaF foi mantida com exposição crônica à toxina, enquanto que na linhagem IrmaD, a exposição à toxina foi aumentada gradativamente. O número de repetições foi de 12 para cada média calculada das duas linhagens.

3.2. Sobrevivência em folhas de milho Cry1F após seleção

Na sexta geração, a sobrevivência até adulto das linhagens IrmaC, IrmaD e IrmaF foram avaliadas em milho Cry1F e seu isogênico não-*Bt* (Figura 4). A análise de variância indicou que houve interação significativa entre as linhagens de *S. frugiperda* e os genótipos de milho avaliados ($F_{2,18} = 9,16$; $P = 0,002$). A linhagem IrmaF teve suas médias de sobrevivência semelhantes nos dois genótipos de milho, demonstrando seu significativo nível de resistência a Cry1F. A linhagem IrmaD apresentou sobrevivência menor que da IrmaF no milho Cry1F, porém seu desempenho foi semelhante nos dois genótipos de milho. A linhagem IrmaC, no milho não-*Bt*, apresentou sobrevivência semelhante a linhagem IrmaD. No milho Cry1F, IrmaC obteve a menor média de sobrevivência entre as linhagens, porém houveram sobreviventes, o que indica a possível presença de alguns insetos resistentes nessa linhagem derivada do campo.

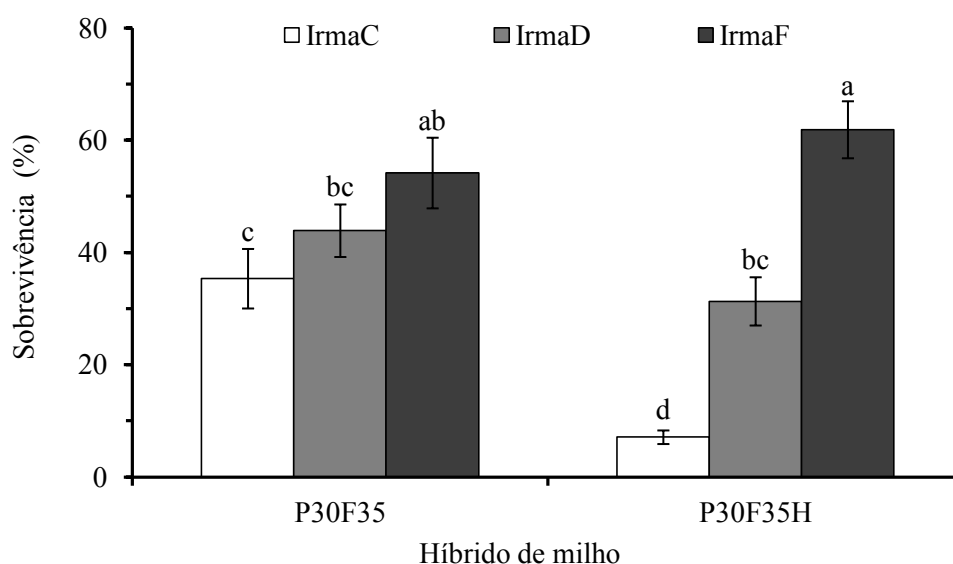


Figura 4. Sobrevivência até adulto das linhagens Irma-C, Irma-D e Irma-F de *Spodoptera frugiperda* em folhas dos híbridos de milho P30F35 (não-Bt) e P30F35H (Cry1F) após as cinco gerações de seleção em laboratório para resistência a Cry1F. Médias (\pm erro padrão) com mesma letra não diferem entre si 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 240 para cada linhagem, distribuídos em quatro repetições de 60 indivíduos.

3.3. Resistência cruzada em casa de vegetação

A sobrevivência (média \pm erro padrão) da linhagem IrmaC nos híbridos de milho não-Bt P30F35 e DKB390 foi respectivamente de $38 \pm 3,2\%$ e $51 \pm 1,4\%$, enquanto que a sobrevivência da linhagem IrmaF foi de $24 \pm 2,4\%$ e $36 \pm 2,0\%$, respectivamente. Assim, larvas das duas linhagens colonizaram efetivamente os híbridos de milho não-Bt usados como controle no bioensaio e essas estimativas foram utilizadas para corrigir a mortalidade natural para avaliação de resistência cruzada, resultados que estão apresentados na Figura 5. No milho expressando Cry1F, a linhagem IrmaF apresentou alta sobrevivência relativo à linhagem IrmaC (i.e., não-selecionada), novamente evidenciando o significativo nível de resistência à toxina, apesar da não-negligenciável sobrevivência de IrmaC observada. Entretanto, a seleção para resistência a Cry1F não afetou significativamente a sobrevivência da linhagem selecionada no milho que expressa Cry1Ab e naquele que expressa conjuntamente Cry1Ab.105 e Cry2Ab2 como evidenciado pela semelhante taxa de sobrevivência larval das linhagens IrmaC e IrmaF nas plantas aos 14 dias após infestação. Deste modo, as evidências indicam não haver resistência cruzada entre Cry1F e as toxinas

avaliadas embora sejam necessários mais estudos a respeito da especificidade da resistência a Cry1F na linhagem IrmaF.

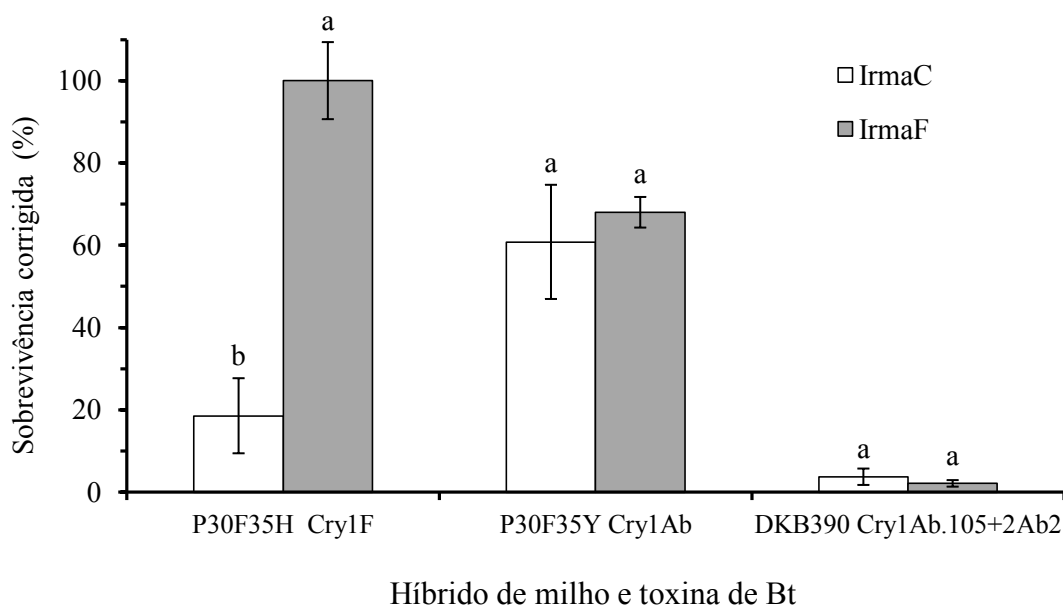


Figura 5. Sobrevivência larval corrigida após 14 dias de infestação artificial de plantas de milho em casa de vegetação com duas linhagens de *Spodoptera frugiperda*, uma selecionada para resistência a Cry1F (IrmaF) e outra controle não-selecionada (IrmaC). Para cada híbrido de milho, médias (\pm erro padrão) com mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD protegido por ANOVA, $P > 0,05$. Para cada linhagem, a estimativa de sobrevivência foi ajustada pela sobrevivência no milho controle isogênico correspondente (i.e., P30F35 ou DKB390) usando a correção de Abbott, sendo avaliados 80 indivíduos distribuídos em quatro repetições de 20 indivíduos.

3.4. Herança da resistência e custo adaptativo

Para a determinação da herança da resistência, várias características fenotípicas das linhagens IrmaC e IrmaF e das progênies F_1 FR e F_1 MR foram comparadas nos milhos P30F35H (Cry1F) e P30F35 (Figuras 6-9). A análise de variância indicou interação significativa entre os genótipos de *S. frugiperda* e os de milho para sobrevivência ($F_{3,24} = 19,64$; $P < 0,001$) (Figura 6) e índice de adaptação ($F_{3,24} = 15,65$; $P = 0,001$) (Figura 9). No entanto, somente os genótipos de *S. frugiperda* afetaram a biomassa larval ($F_{3,24} = 7,69$; $P <$

0,001) (Figura 9) e o período de desenvolvimento ($F_{3,24} = 23,29$; $P < 0,001$) (Figura 8). Não houve diferença significativa na sobrevivência das duas progênies no milho Cry1F, indicando que o sexo dos pais não influenciou nesta característica (Figura 6). Além disso, não foram observadas diferenças entre as duas progênies no período de desenvolvimento até adulto e no índice de adaptação no milho P30F35H, o qual combina vários parâmetros (Figura 6 e 9). Na biomassa larval pode-se observar diferença entre as duas progênies, entretanto essa diferença ocorreu tanto na ausência quanto na presença de Cry1F indicando que não há influência dessa toxina na biomassa das duas progênies. Esses resultados indicam que a capacidade da linhagem IrmaF de sobreviver em folhas de milho Cry1F é um caráter geneticamente determinado por um locus autossômico.

Também foi observado não haver custo adaptativo associado à resistência quando avaliadas a sobrevivência e o índice de adaptação (Figuras 6 e 9). A sobrevivência da linhagem IrmaF foi semelhante à da linhagem IrmaC no milho P30F35, isto é, na ausência de Cry1F. O índice de adaptação resume três parâmetros em um só, e evidencia qual genótipo de *S. frugiperda* está mais adaptado a cada genótipo de milho. Assim, pode ser observado que a linhagem IrmaF teve os maiores valores de índice de adaptação nos dois genótipos de milho. Pelo contrário, a linhagem IrmaC teve os piores desempenhos nos dois genótipos de milho, de acordo com esse parâmetro.

Foi observada correlação significativa ($r > 0,81$; $P < 0,027$) entre as sobrevivências em diversos estágios de fase imatura, particularmente entre sobrevivência até adulto e aquela aos 14 dias ($r = 0,93$; $P = 0,006$). Assim, a essa sobrevivência aos 14 dias, bem como a biomassa nessa idade e o índice de adaptação foram utilizadas como características fenotípicas no cálculo da dominância da resistência na dose da toxina expressa em folhas de milho Cry1F (Tabela 2). Os cálculos efetuados para a dominância efetiva, baseados na concentração da toxina presente na planta de milho Cry1F, sugerem que a resistência é recessiva incompleta ou aditiva, sendo que os valores variaram de 0,30 a 0,50 para as características fenotípicas avaliadas (Tabela 2). Talvez mais representativa, é a dominância de 0,36, obtida através da porcentagem do índice de adaptação, por este ser composto de três componentes de desempenho larval. Essa variação se deve ao parâmetro utilizado e, principalmente, ao fato de que a linhagem IrmaC aparentemente não ser completamente homocigota susceptível, já que uma pequena parte dos seus indivíduos são capazes de sobreviver no milho Cry1F (Figura 6).

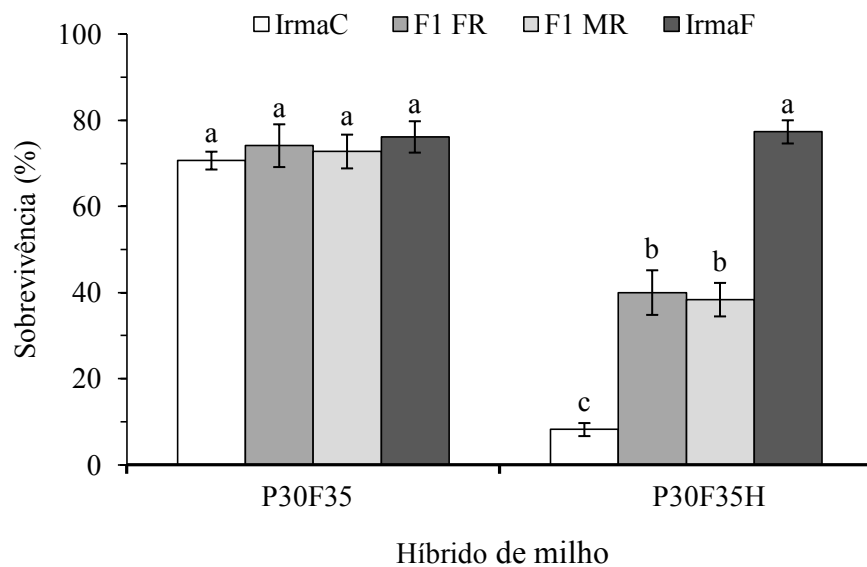


Figura 6. Sobrevivência aos 14 dias das linhagens Irma-C e Irma-F e das progêneses F₁FR (IrmaF_♀ x IrmaC_♂) e F₁MR (IrmaF_♂ x IrmaC_♀) de *Spodoptera frugiperda*, nos híbridos de milho P30F35 e P30F35H (Cry1F), na sexta geração. As médias (\pm erro padrão) como mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD protegido por ANOVA, $P > 0,05$. O número de indivíduos de cada genótipo de *S. frugiperda* avaliados foi de 240 para cada híbrido de milho, distribuídos em quatro repetições de 60 indivíduos.

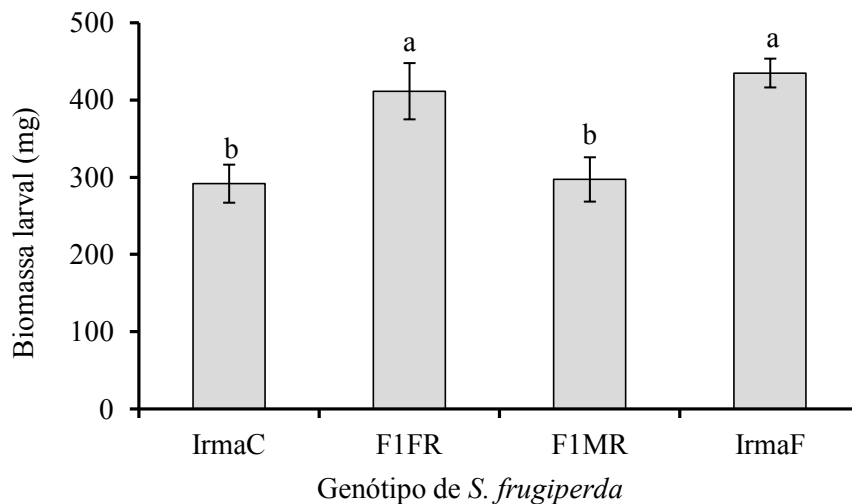


Figura 7. Biomassa larval aos 14 dias das linhagens Irma-C e Irma-F e das progêneses F₁FR (IrmaF_♀ x IrmaC_♂) e F₁MR (IrmaF_♂ x IrmaC_♀) de *Spodoptera frugiperda* após a quinta geração de seleção. A biomassa larval dos genótipos de *S. frugiperda* foi semelhante no híbrido de milho P30F35H e no seu isogênico não-Bt ($P > 0,05$). 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* avaliado foi de 480 em dois híbridos de milho, distribuídos em oito repetições de 60 indivíduos.

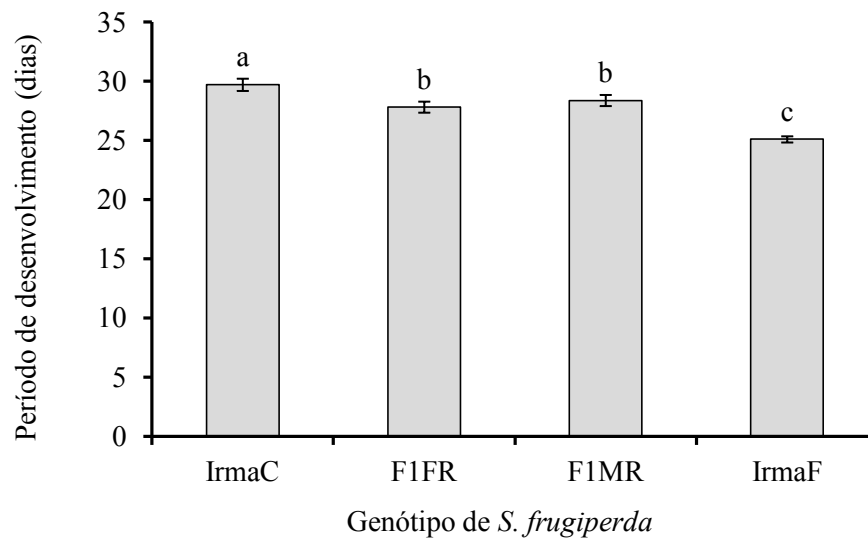


Figura 8. Período de desenvolvimento até adulto das linhagens Irma-C e Irma-F e das progênies F₁ FR (IrmaF_♀ x IrmaC_♂) e F₁ MR (IrmaF_♂ x IrmaC_♀) de *Spodoptera frugiperda*, o qual foi semelhante no híbrido de milho P30F35H e no seu isogênico não-Bt ($P > 0,05$). As médias (\pm erro padrão) como mesma 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* avaliado foi de 480 em dois híbridos de milho, distribuídos em oito repetições de 60 indivíduos.

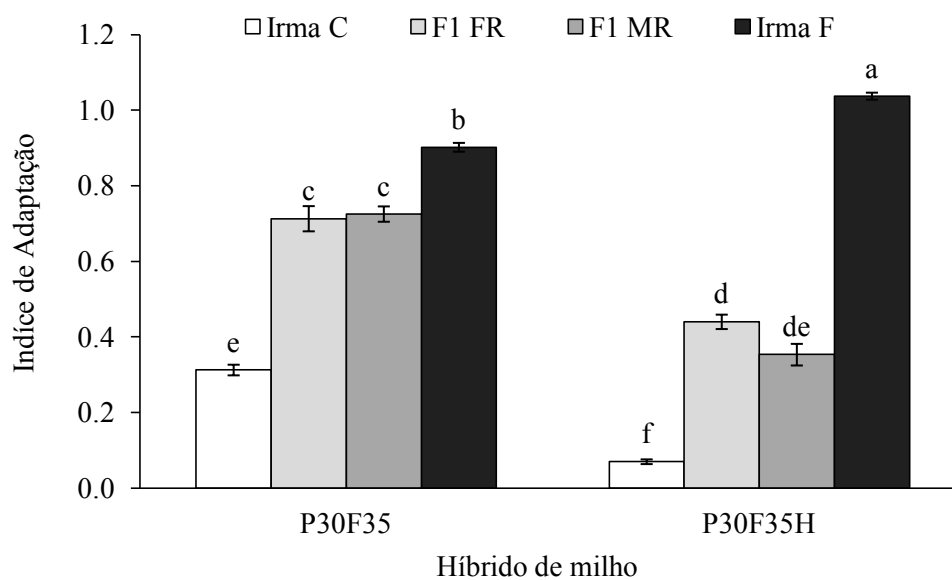


Figura 9. Índice de Adaptação das linhagens Irma-C e Irma-F e das progênies F₁ FR (IrmaF[♀] x IrmaC[♂]) e F₁ MR (IrmaF[♂] x IrmaC[♀]) de *Spodoptera frugiperda*, nos híbridos de milho P30F35 e P30F35Cry1F, na sexta geração. Médias (± erro padrão) como mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD protegido por ANOVA, $P > 0,05$. O número de indivíduos de cada genótipo de *S. frugiperda* avaliado foi de 240 para cada híbrido de milho, distribuídos em quatro repetições de 60 indivíduos.

Tabela 2. Dominância efetiva da resistência a Cry1F em *Spodoptera frugiperda* selecionada em laboratório.

Linagem	Valor Fenotípico	<i>Fitness</i> ^a	Dominância ^b
Porcentagem de sobrevivência aos 14 dias			
IrmaC	11,7	0,120	0,50
F ₁	54,2	0,561	
IrmaF	96,6	1	
Porcentagem de ganho de peso aos 14 dias			
IrmaC	75,9	0,712	0,30
F ₁	85,1	0,798	
IrmaF	106,6	1	
Índice de Adaptação relativo ^c			
IrmaC	0,2	0,190	0,36
F ₁	0,6	0,486	
IrmaF	1,2	1	

F₁ é a progênie híbrida conjunta (F₁ FR + F₁ MR) dos dois cruzamentos massais entre as duas linhagens parentais, IrmaC e IrmaF.

Para cada linhagem de *S. frugiperda*, a estimativa de sobrevivência no milho P30F35H foi ajustada pela sobrevivência no milho P30F35 (controle) usando a correção de Abbott; a porcentagem de ganho de peso foi calculada em relação ao ganho de peso em cada linhagem no milho controle; o índice de adaptação relativo foi calculado em relação ao índice de adaptação de cada linhagem no milho controle.

^a*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 da linhagem IrmaF, selecionados com o milho P30F35 (ver Material e Métodos).

^bA dominância pode variar de 0 (resistência completamente recessiva) a 1 (resistência completamente dominante) (ver Material e Métodos).

^cO índice de adaptação combina sobrevivência, biomassa de pupa e tempo de desenvolvimento.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que *S. frugiperda* respondeu à pressão de seleção com Cry1F em laboratório, resultando em significativos níveis de resistência à toxina em quatro gerações de seleção. O significativo nível de resistência desenvolvido foi evidente nos testes de casa de vegetação, onde as larvas da linhagem IrmaF apresentaram alta taxa de sobrevivência em plantas de milho Cry1F. Tabashnik *et al.* (1992) discutem que experimentos de seleção mais curtos (4-6 gerações) e iniciados com indivíduos de linhagens de diferentes locais, têm maiores chances de detectar resistência que experimentos de seleção mais longos (> 10 gerações) com uma só linhagem. Esses autores ainda comentam que se

nenhuma resposta a seleção ocorrer depois de 4-6 gerações, os alelos de resistência podem não estarem presentes na linhagem do laboratório. No presente estudo, a linhagem Irma foi proveniente do cruzamento de populações de dois locais diferentes, o que consequentemente aumentou sua variabilidade genética possibilitando um melhor desempenho na seleção. Em estudos prévios, outras duas espécies de *Spodoptera* foram selecionadas para resistência a toxinas *Bt* com tempos variáveis. *Spodoptera exigua*, após 21 gerações de seleção, exibiu apenas 8% de mortalidade na máxima concentração da toxina Cry1Ca testada (Moar *et al.*, 1995). *Spodoptera littoralis*, após 14 gerações de seleção, com uma mistura de esporo-cristal de uma linhagem de *Bt* expressando apenas Cry1Ca exibiu níveis de resistência maiores que 500 vezes (Müller-Cohn *et al.*, 1996). A linhagem IrmaF do presente estudo, após as cinco gerações de seleção, sobreviveu igualmente na presença ou ausência da toxina.

O método de seleção da linhagem IrmaD por aumento gradual da exposição a Cry1F foi menos eficiente que o método de exposição crônica utilizado para seleção da linhagem IrmaF, demonstrado pela diferença na resposta da seleção entre as duas linhagens. As larvas de IrmaD foram selecionadas em folha de milho Cry1F e transferidas para dieta artificial, sendo que esse novo ambiente pode ter causado mortalidade dos indivíduos tolerantes à toxina e permitido seleção natural que agiu freando a resposta à seleção artificial (Falconer & Mackay, 1996). Essa hipótese parece consistente com os dados da quinta geração de seleção, na qual a linhagem IrmaD foi alimentada em tempo integral com milho Cry1F e apresentou sobrevivência maior que nas demais gerações (Figura 2). Alternativamente, a diferença na resposta observada entre as linhagens IrmaD e IrmaF pode ser devido à diferente pressão de seleção estabelecida pela duração de exposição à toxina. A curta exposição da IrmaD ao evento, principalmente nas primeiras gerações de seleção, pode ter viabilizado a perpetuação de insetos susceptíveis na linhagem, retardando o processo de seleção. Apesar da não significativa a regressão para o ganho em sobrevivência na linhagem IrmaD, sua maior sobrevivência no milho Cry1F em laboratório ao final do experimento de seleção indica que houve um ligeiro ganho de sobrevivência em relação à linhagem IrmaC. Desse modo, pode-se inferir que apesar do método não ter sido eficiente como o utilizado para a linhagem IrmaF, a linhagem IrmaD também desenvolveu algum nível de resistência e precisa ser melhor avaliada, sobretudo quanto a estabilidade de sua manutenção em relação a IrmaF.

Pela resposta à seleção obtida em curto prazo, infere-se que o alelo de resistência a Cry1F estava presente nas populações de campo que deram origem às linhagens selecionadas. Para serem detectados em experimentos de seleção iniciados com 100-1000 indivíduos, alelos de resistência devem estar em frequência de 0,005-0,0005 (Tabashnik *et*

al., 1990; Gould *et al.*, 1995). Possivelmente, os indivíduos coletados em plantas de milho Cry1F eram de fato mais tolerantes à toxina e assim é preciso estimar a frequência desses indivíduos em populações de campo de *S. frugiperda* para refinar as recomendações de manejo da resistência. Em Porto Rico, no campo, foi detectada uma população de *S. frugiperda* resistente ao milho Cry1F com níveis de susceptibilidade menores que 450 vezes quando comparados a outras populações de laboratório (Storer *et al.*, 2010). Além desse lepidóptero-praga, outras populações de campo desenvolveram resistência a toxinas de *Bt* em resposta a aplicação foliar ou transgenia, a exemplo de *Plodia interpunctella* (Mcgaughey, 1985), *Plutella xylostela* (Tabashnik *et al.*, 1990), *Tricoplusia ni* (Janmaat & Myers, 2003) e *Busseola fusca* (Van Rensburg, 2007). Tais estudos reforçam a necessidade da adoção de estratégias de manejo. Assim, em locais onde o milho *Bt* é cultivado continuamente, práticas de manejo de resistência precisam ser adotadas de forma adequada, caso contrário é alto o risco de desenvolvimento de resistência.

Com base no experimento de seleção em laboratório não se pode prever quando a resistência a Cry1F irá se desenvolver no campo. As condições de exposição em laboratório diferem daquelas encontradas em campo. Entretanto, pode-se dizer que o alelo para resistência a Cry1F estava presente em pelo menos uma das populações de campo utilizadas no cruzamento, e que a intensidade de seleção pode ser considerada similar àquela observada em campo, uma vez que a seleção em laboratório foi feita usando o evento TC1507. Contudo, uma importante distinção entre condições de seleção em laboratório e a campo, que proporciona um efeito significativo na velocidade de evolução de resistência em populações de insetos, é o fato de que, em condições de laboratório, os indivíduos são selecionados e mantidos em isolamento para cruzamentos subseqüentes, sem a introdução de indivíduos susceptíveis, os quais na natureza podem ser proporcionados pela presença de refúgio (natural ou estruturado) ou por migração. Um estudo recente indica que *S. frugiperda* pode migrar de uma distância de até 806 metros (Vilarinho *et al.*, 2011) sugerindo que insetos de outros campos de milho convencional, ou de outras culturas, podem migrar para se acasalar com insetos resistentes e dessa forma retardar a evolução da resistência. Outro estudo indica que *S. frugiperda* pode migrar grandes distância (Nagoshi *et al.*, 2008). Portanto, não é possível fazer uma avaliação robusta de como esses resultados se traduzem para condições de campo até que seja feita uma caracterização mais profunda da resistência nessa linhagem e que se entenda toda a biologia de movimento de populações nas condições de campo do Brasil. Os resultados obtidos com a seleção gradual indicam que insetos susceptíveis podem ter escapado e sobrevivido à exposição. Isso pode ser uma indicação adicional de que a presença de indivíduos susceptíveis pode reduzir a velocidade com que a resistência evolui,

ênfatizando a importância da implementação do refúgio no manejo de resistência dessa espécie. A identificação de uma linhagem resistente oferece oportunidade para a obtenção de informações que permitam a validação de pressupostos atualmente utilizados para estabelecer recomendações do manejo de resistência (Gould, 1998).

Os resultados obtidos em casa de vegetação evidenciaram não haver resistência cruzada entre as toxinas expressas no milho DKB390 e a expressa no milho P30F35H, sendo que a sobrevivência da linhagem IrmaF foi menor no milho DKB390 Cry1A.105+Cry1Ab2 que no milho P30F35H (Figuras 5). Como base nesse experimento, não se sabe se esse efeito é resultado da expressão das duas toxinas em conjunto, ou se deve a uma ou à outra. Assim, estudos com as duas toxinas purificadas, separadamente, são necessários para indicar qual das toxinas foi responsável pela ausência de resistência cruzada observada entre o milho Cry1F e o milho Cry1A.105+Cry2Ab2. O resultado de sobrevivência da linhagem IrmaF no genótipo de milho P30F35Y (Cry1Ab) deve ser visto com prudência, pois, aparentemente há indicativos de resistência cruzada entre a toxina Cry1Ab e Cry1F (Sena *et al.*, 2009). Todavia, a linhagem IrmaC teve sobrevivência semelhante a IrmaF nesse genótipo, o que indica que a toxina Cry1Ab expressa nesse híbrido não foi muito eficiente no controle dessas linhagens, ou ainda, que a linhagem Irma poderia se apresentar com algum alelo de resistência a essa toxina advindo do campo (possivelmente devido a prévia exposição a híbridos de milho expressando Cry1Ab). Em estudos prévios, outras populações de *S. frugiperda* foram avaliadas quanto a sobrevivência em milho Cry1Ab e este demonstrou ser moderadamente resistente a essa praga (Waquil *et al.*, 2002), além disso a sobrevivência até adulto variou de 14 a 57% em diferentes híbridos de milho expressando essa toxina (Mendes *et al.*, 2011). Apesar da resistência cruzada não poder ser confirmada, Gould *et al.* (1995) encontraram resistência cruzada entre as toxinas Cry1Ac e Cry1F em uma linhagem de *Heliothis virescens* selecionada para resistência a Cry1Ac. Esses autores admitiram-se surpresos com esse resultado devido a dissimilaridade na sequência de aminoácidos das duas toxinas (Höfte & Whiteley, 1989). Entretanto, comentam que pode haver alguma similaridade em alguma sequência específica ou estrutura terciária que venham a ter um papel importante na toxicidade. Os resultados do presente estudo concordam com os observados para *O. nubilalis* e *S. frugiperda* resistentes ao milho Cry1F (Pereira *et al.*, 2008a; Storer *et al.*, 2010). Para estes lepidópteros-praga foram observados nenhum e baixo nível de resistência cruzada a toxina Cry1Ab, respectivamente, sugerindo que híbridos de milho expressando as duas toxinas poderão ser compatíveis para o manejo da resistência desses insetos. Tendo sido demonstrado no nosso estudo uma alta sobrevivência das linhagens selecionada e não selecionada no milho P30F35Y, e o fato de que a resposta de *S.*

frugiperda a toxinas Cry1A ser variável em diferentes localidades (Monnerat *et al.*, 2006), mais estudos são necessários para acessar o potencial de resistência cruzada entre essas proteínas em *S. frugiperda* e os benefícios do uso de plantas de milho expressando as duas toxinas.

No presente estudo, várias características fenotípicas avaliadas nos testes com as progênies dos cruzamentos recíprocos entre IrmaC e IrmaF indicam que resistência a Cry1F é de caráter autossômico, não-dominante e herdado sem efeito materno, sendo que o desempenho das progênies foi similar para todos os parâmetros avaliados sob efeito de comparação. Esse padrão de herança é semelhante àquele observado na linhagem de *S. frugiperda* resistente ao milho Cry1F de Porto Rico (Storer *et al.*, 2010) e numa linhagem de *O. nubilalis* selecionada em laboratório (Pereira *et al.*, 2008a; Pereira *et al.*, 2008b). É importante ressaltar que a significativa sobrevivência da linhagem IrmaC em folhas de milho no laboratório e na planta de milho Cry1F (Figuras 5 e 6) indica a existência de alguns indivíduos resistentes na população. Assim, os valores de dominância efetiva da resistência apresentados na Tabela 2 devem ser interpretados com cautela, pois podem estar superestimados. Além disso, a relativa baixa sobrevivência da IrmaC em milho não-Bt, provavelmente devido ao fato de esta linhagem ter sido mantida em dieta artificial, pode ter afetado o cálculo de dominância efetiva, também superestimando o valor, uma vez que para estes cálculos as características fenotípicas foram corrigidas em relação ao milho controle. Mesmo assim, o ganho de peso das larvas e o índice de adaptação relativo indicaram que a resistência é recessiva incompleta, com valores de dominância de 0,30 e 0,36, respectivamente. Estudos futuros devem ser conduzidos utilizando-se uma linhagem homozigota susceptível para cruzamento com IrmaF a fim de determinar com mais precisão o padrão de herança encontrado nesta linhagem de *S. frugiperda*. Entretanto, os valores de dominância aqui obtidos são comparáveis aos obtidos para *O. nubilalis*, cuja dominância efetiva da resistência a Cry1F variaram de 0,07 a 0,27 dependendo do estágio fenológico da planta e da característica fenotípica utilizada (Pereira *et al.*, 2008a; Pereira *et al.*, 2008b), bem como para a linhagem de *S. frugiperda* de Porto Rico, cuja dominância da resistência na concentração de 3.333 ng/cm² de Cry1F foi de 0,07 pela inibição de crescimento larval e 0,14 com base na mortalidade (Storer *et al.*, 2010).

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados da dominância é a concentração da toxina, considerando-se que a dominância da resistência pelo método aqui utilizado depende da concentração de toxina expressa na planta (Roush & Tabashnik, 1990). Essa concentração não foi determinada para o milho P30F35H no presente estudo, sendo que se ela não for suficientemente alta, pode tornar a resistência funcionalmente menos recessiva

(Curtis *et al.*, 1978), ou até aditiva. Dessa forma, os resultados obtidos para dominância no presente estudo, sugerem que esta pode ser aditiva ou recessiva incompleta, porém as evidências indicam sua recessividade, o que implica que a estratégia de alta dose/refúgio utilizada atualmente para o manejo da resistência *S. frugiperda* ao milho Cry1F é apropriada.

O melhor desempenho da linhagem IrmaF em relação a IrmaC no milho P30F35 evidencia que não há custo adaptativo associado à resistência a Cry1F em *S. frugiperda* (Figura 4). Sendo que, considera-se haver custo quando indivíduos com alelos de resistência se mostram menos adaptados que indivíduos susceptíveis em ambientes sem toxina (Gassmann *et al.*, 2009). Outro fato que confirma não haver custo associado à resistência é que indivíduos da linhagem IrmaC, após seis gerações em laboratório, sem sofrer nenhuma pressão de seleção, conseguiram sobreviver no milho Cry1F em casa de vegetação (Figura 5). Isso indica que não houve custo para a manutenção da resistência proveniente do campo.

Em outros estudos com insetos da ordem Lepidoptera também não foi observado custo adaptativo: *B. fusca* a Cry1Ab (Van Rensburg, 2007), *Helicoverpa zea*, *P. xylostella* e *S. exigua* a Cry1Ac (Ramachandran *et al.*, 1998; Dingha *et al.*, 2004; Bird & Akhurst, 2005). No entanto, em laboratório, custo adaptativo tem sido encontrado em algumas linhagens resistentes de *P. interpunctella* (Oppert *et al.*, 2000), *P. gossypiella* (Carrière *et al.*, 2001), *P. xylostella* (Groeters *et al.*, 1994), *T. ni* (Janmaat & Myers, 2003) e *Helicoverpa armigera* (Akhurst *et al.*, 2003). Além disso, o declínio da resistência a *Bt* na ausência de seleção tem sido reportado em colônias de laboratório (revisado por Ferré & Van Rie (2002); Gassmann *et al.*(2009). Esse declínio tem sido atribuído ao custo adaptativo, como baixa taxa de crescimento larval (Liu *et al.*, 1999), sobrevivência (Groeters *et al.*, 1994), ou fecundidade e sucesso no acasalamento (Groeters *et al.*, 1993) em indivíduos resistentes na ausência de seleção. Apesar dessas evidências, o custo adaptativo tende a ser reduzido por evolução subsequente (Coustau *et al.*, 2000). Uma possibilidade é a seleção de alelos modificadores em outros genes, que minimizam os efeitos deletérios dos alelos de resistência na ausência de seleção (Roush & Mackenzie, 1987). A conclusão sobre a ausência de custo adaptativo deve ser vista com prudência. No presente estudo, foram comparadas as características de sobrevivência, período de desenvolvimento, biomassa e índice de adaptação, mas custos adaptativos podem se manifestar em outros fatores relacionados à biologia de *S. frugiperda*. Estes outros fatores não foram investigados neste estudo, como fecundidade das fêmeas e sucesso de acasalamento de indivíduos resistentes em relação aos susceptíveis na ausência de *Bt* (Groeters *et al.*, 1993).

Apesar da incerteza de haver custo adaptativo associado à resistência a Cry1F em *S. frugiperda*, algumas estratégias de manejo propostas são reforçadas por sua presença (Gould,

1998). Dessa forma, é importante estudar se há custo adaptativo relacionado à resistência para o desenvolvimento de estratégias de manejo apropriadas. Quando da ocorrência deste em ambientes sem toxina de *Bt* (i.e., áreas de refúgio, hospedeiros alternativos), os indivíduos com um ou mais alelos de resistência podem ser menos adaptados que aqueles sem esses alelos (Gassmann *et al.*, 2009). Assim, o resultado aqui encontrado pode ter aplicações práticas importantes, pois não havendo custo adaptativo em indivíduos resistentes de *S. frugiperda*, tais insetos tendem a ter desempenho (i.e., *fitness*) semelhante a indivíduos susceptíveis nas áreas de refúgio e podem persistir em pelo menos algumas populações. No entanto, a aparente ausência de custo adaptativo não afeta o manejo da resistência com base na utilização do refúgio, sendo este importante para mitigar a evolução da resistência. Assim como muitos outros estudos, este foi conduzido em condições ótimas aos insetos e conseqüentemente, pode não ter correlação com as condições de campo (Roush & Mackenzie, 1987; Roush & Daly, 1990; Fry, 1993). O custo associado à resistência pode ser mais aparente ou detectável em condições desfavoráveis aos indivíduos (Janmaat & Myers, 2005; Raymond *et al.*, 2005). Deste modo, ainda há necessidade de se estimar mais criteriosamente o custo adaptativo associado à resistência a Cry1F em *S. frugiperda*, em condições que aumentem a chance de detectá-lo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo é pioneiro no Brasil em selecionar em laboratório uma linhagem de *S. frugiperda* com resistência a toxina Cry1F. Essa linhagem é particularmente importante por ser derivada do campo e apresentar capacidade de sobreviver e desenvolver em plantas de milho Cry1F. O método de seleção utilizado também foi inovador e revelou que a exposição crônica a tecidos de milho Cry1F foi mais eficiente que a exposição gradual, sendo que com apenas quatro gerações foi obtido sucesso na seleção da linhagem IrmaF com níveis significativos de resistência. Em tal linhagem, a herança da resistência a Cry1F é autossômica, e na concentração de toxina da planta, a resistência variou de recessiva incompleta a aditiva, dependendo da característica fenotípica avaliada. A linhagem selecionada foi susceptível ao híbrido de milho que expressa as toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab2, indicando que essas toxinas são compatíveis com a Cry1F no manejo da resistência. Não foi detectado custo adaptativo associado à resistência, embora sejam necessários mais estudos delineados especificamente para investigar o fato.

Os resultados desse trabalho têm importantes implicações práticas, pois mostram que algumas das toxinas atualmente em uso em milhos *Bt* podem ser compatíveis no manejo integrado da resistência, ao mesmo tempo em que apontam o elevado risco de resistência em populações deste inseto praga no Brasil. Os resultados obtidos com a seleção gradual indicam que quando insetos susceptíveis são mantidos na população a velocidade de evolução da resistência pode ser reduzida, exemplificando a importância de se plantar o refúgio como prática de manejo de resistência. Deste modo, futuros estudos de monitoramento da frequência de alelos de resistência, ao milho Cry1F, em populações de campo de *S. frugiperda* serão de extrema importância. A disponibilidade da linhagem selecionada oferece oportunidade para estudos de resistência cruzada a outras toxinas, o que ajudará na escolha destas para a piramidação em plantas de milho e/ou para rotação de híbridos de milho expressando diferentes toxinas. Além disso, a linhagem IrmaF permitirá a caracterização genética, bioquímica e molecular da resistência, o que poderá auxiliar no refinamento de recomendações para o manejo da resistência de *S. frugiperda* ao milho Cry1F.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.
- Akhurst, R.J.; James, W.; Bird, L.J.; Beard, C. Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 1290-1299, 2003.
- 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.
- Bates, S.L.; Zhao, J.Z.; Roush, R.T.; Shelton, A.M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 57-62, 2005.
- Bird, L.J.; Akhurst, R.J. Fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) on Transgenic cotton with reduced levels of Cry1Ac. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 1311-1319, 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.; Genissel, A.; Raymond, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 1588-1595, 2000.
- Bravo, A.; Soberón, M.; Gill, S.S.; Lawrence, I.G.; Kostas, I.; Sarjeet, S.G. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. In: LAWRENCE, I.G.; KOSTAS, I.; SARJEET, S.G. (Ed). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam: Elsevier. p.175-205, 2005.
- Buntin, G.D. Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. **Florida Entomologist**, v. 91, p. 523-530, 2008.

- Caprio, M.A. Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 1021-1031, 1998.
- Carrière, Y.; Deland, J.P.; Roff, D.A.; Vincent, C. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 258, p. 35-40, 1994.
- Carrière, Y.; Ellers-Kirk, C.; Liu, Y.B.; Sims, M.A.; Patin, A.L.; Dennehy, T.J.; Tabashnik, B.E. Fitness costs and maternal effects associated with resistance to transgenic cotton in the pink bollworm (Lepidoptera : Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 1571-1576, 2001.
- Cerda, H.; Paoletti, M.G. Genetic Engineering with *Bacillus thuringiensis* and Conventional Approaches for Insect Resistance in Crops **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 23, p. 317-323, 2004.
- Chambers, J.A.; Jelen, A.; Gilbert, M.P.; Jany, C.S.; Jonhson, T.B.; Gawronburke, C. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1991.
- Chaufaux, J.; Seguin, M.; Swanson, J.J.; Bourguet, D.; Siegfried, B.D. Chronic exposure of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 1564-1570, 2001.
- Coustau, C.; Chevillon, C.; Constant, R.F. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends in Ecology & Evolution** v. 15, p. 378-383, 2000.
- Crespo, A.L.B.; Spencer, T.A.; Alves, A.P.; Hellmich, R.L.; Blankenship, E.E.; Magalhaes, L.C.; Siegfried, B.D. On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Pest Management Science**, v. 65, p. 1071-1081, 2009.
- 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, I.; Turpin, F.T. Yield impact of larval infestations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to midwhorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, p. 1052-1054, 1983.
- 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. Acessado em 19/08/2011.
- Curtis, C.F.; Cook, L.M.; Wood, R.J. Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. **Ecological Entomology**, v. 3, p. 273-287, 1978.
- 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.
- Falconer, D.S.; Mackay, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Edinburgh: Longman Group Limited. 4 ed. 1996.
- Ferré, J.; Van Rie, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501-533, 2002.
- Fry, J.D. The "general vigor" problem: can antagonistic pleiotropy be detected when genetic covariances are positive? **Evolution**, v. 47, p. 327-333, 1993.
- Gassmann, A.J.; Carriere, Y.; Tabashnik, B.E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 147-163, 2009.
- Georghiou, G.P.; Taylor, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, p. 319-323, 1977.

- Glare, T.R.; O'callaghan, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350p.
- Gould, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- Gould, F.; Anderson, A.; Reynolds, A.; Bumgarner, L.; Moar, W. Selection and genetic analyses of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 1545-1559, 1995.
- Groeters, F.R.; Tabashnik, B.E.; Finson, N.; Johnson, M.W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 1035-1039, 1993.
- Groeters, F.R.; Tabashnik, B.E.; Finson, N.; Johnson, M.W. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Evolution**, v. 48, p. 197-201, 1994.
- Höfte, H.; Whiteley, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.
- Hunt, T.E.; Bushman, L.L.; Sloderbeck, P.E. Insecticide use in Bt and non-Bt field corn in the western corn belt: reported by crop consultants in a mail survey. **American Entomologist**, v. 52, p. 86-93, 2007.
- Janmaat, A.F.; Myers, J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 270, p. 2263-2270, 2003.
- 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-Biological Sciences**, v. 272, p. 1031-1038, 2005.
- Johnson, S.J. Migration and life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in Western Hemisphere. **Insect Science and its Application**, v. 8, p. 543-549, 1987.
- Kasten Jr., P.; Precetti, A.a.C.M.; Parra, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v. 53 p. 69-78. 1978.
- Leiderman, L.; Sauer, H.F.G. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbot e Smith, 1797). **O Biológico**, v. 19, p. 105-113, 1953.
- 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.
- Liu, Y.B.; Tabashnik, B.E. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2218-2223, 1997.
- Liu, Y.B.; Tabashnik, B.E.; Dennehy, T.J.; Patin, A.L.; Bartlett, A.C. Development time and resistance to Bt crops. **Nature**, v. 400, p. 519-519, 1999.
- Ma, B.L.; Meloche, F.; Wei, L. Agronomic assessment of Bt trait and seed or soil-applied insecticides on the control of corn rootworm and yield. **Field Crop Research**, v. 111, p. 189-196, 2009.
- Macgaughey, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 229, p. 193-195, 1985.
- Machado, V.; Fiuza, L.M. Manejo da resistência: na era das plantas transgênicas. **Oecologia Australis**, v. 15, p. 291-302, 2011.
- Manyangarirwa, W.; Turnbull, M.; Mccutcheon, G.S.; Smith, J.P. Gene pyramiding as a Bt resistance management strategy: How sustainable is this strategy? **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 781-785, 2006.

- Martinelli, S.; Omoto, C. Resistência de Insetos a Plantas Geneticamente Modificadas: Relevância da Implantação de Estratégias Proativas de Manejo da Resistência. **Biociência**, v. 34, p. 67-77, 2005.
- Mccord, E.; Yu, S.J. The mechanisms of carbaryl resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 27, p. 114-122, 1987.
- Mcgaughey, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 229, p. 193-195, 1985.
- Mckenzie, J.A. The character or variation: the genetic analyses of the insecticide-resistance phenotype. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 3-7, 2000.
- Mendes, S.M.; Boregas, K.G.B.; Lopes, M.E.; Waquil, M.S.; Waquil, J.M. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 239-244, 2011.
- Moar, W.J.; Puzsai-Carey, M.; Vanfaassen, H.; Bosch, D.; Frutos, R.; Rang, C.; Luo, K.; Adang, M.J. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C Resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2086-2092, 1995.
- Monnerat, R.; Martins, E.; Queiroz, P.; Orduz, S.; Jaramillo, G.; Benintende, G.; Cozzi, J.; Real, M.D.; Martinez-Ramirez, A.; Rausell, C.; Ceron, J.; Ibarra, J.E.; Del Rincon-Castro, M.C.; Espinoza, A.M.; Meza-Basso, L.; Cabrera, L.; Sanchez, J.; Soberon, M.; Bravo, A. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera : Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7029-7035, 2006.
- Müller-Cohn, J.; Chaufaux, J.; Buisson, C.; Gilois, N.; Sanchis, V.; Lereclus, D. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to CryIC and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 89, p. 791-797, 1996.
- Nagoshi, R.N.; Meagher, R.L.; Flanders, K.; Gore, J.; Jackson, R.; Lopez, J.; Armstrong, J.S.; Buntin, G.D.; Sansone, C.; Leonard, B.R. Using Haplotypes to Monitor the Migration of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Corn-Strain Populations from Texas and Florida. **Ecology and Behavior**, v. 101, p. 742-749, 2008.
- Naranjo, S.E. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 11, p. 1-11, 2009.
- 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.
- Onstad, D.W. **Insect Resistance Management: Biology, Economics, and Prediction**. San Diego: Elsevier. ed. 2008.
- Oppert, B.; Hammel, R.; Throne, J.E.; Kramer, K.J. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 96, p. 281-287, 2000.
- Palumbi, S.R. Humans as the world's greatest evolutionary force. **Science**, v. 293, p. 1786-1790, 2001.
- 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.
- 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.
- Perez, C.J.; Shelton, A.M.; Roush, R.T. Managing diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to foliar applications of *Bacillus thuringiensis*: Testing strategies in field cages. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 1462-1470, 1997.
- Ramachandran, S.; Buntin, G.D.; All, J.N.; Tabashnik, B.E.; Raymer, P.L.; Adang, M.J.; Pulliam, D.A.; Stewart, C.N. Survival, development, and oviposition of resistant diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 1239-1244, 1998.
- 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-Biological Sciences**, v. 272, p. 1519-1524, 2005.
- Romano, F.C.B. **Esterilização da mariposa *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) através do uso de isca com diferentes inseticidas**. Piracicaba, 2002. 61p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- Romeis, J.; Meissle, M.; Bigler, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 63-71, 2006.
- 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.
- Roush, R.T. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences**, v. 353, p. 1777-1786, 1998.
- Roush, R.T.; Daly, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall. p.97–152, 1990.
- Roush, R.T.; Mackenzie, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, p. 361-380, 1987.
- Roush, R.T.; Tabashnik, B.E. (Eds.) **Pesticide Resistance in Arthropods**. New York: Chapman and Hall. 304 p. 1990.
- Sas Institute. SAS user's manual, version 9.1. In: (Ed). **SAS Institute**. Cary: NC. 2002.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775-806, 1998.
- Sena, J.a.D.; Hernandez-Rodriguez, C.S.; Ferrão, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2236-2237, 2009.
- Shelton, A.M.; Tang, J.D.; Roush, R.T.; Metz, T.D.; Earle, E.D. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 339-342, 2000.
- Siqueira, H.a.A.; Moellenbeck, D.; Spencer, T.; Siegfried, B.D. Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, p. 1049-1057, 2004.
- Sparks, A.N. Fall armyworm (Lepidoptera, Noctuidae) - potential for areawide management. **Florida Entomologist**, v. 69, p. 603-614, 1986.
- Storer, N.P.; Babcock, J.M.; Schlenz, M.; Meade, T.; Thompson, G.D.; Bing, J.W.; Huckaba, 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. Resistance Risk Assessment: Realized Heritability of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Diamondback Moth* (Lepidoptera: Plutellidae), Tobacco Budworm (Lepidoptera, Noctuidae), and Colorado Potato Beetle (Coleoptera, Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 1551-1559, 1992.
- Tabashnik, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.
- Tabashnik, B.E.; Cushing, N.L.; Finson, N.; Jonhson, M.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 1671-1676, 1990.
- Tabashnik, B.E.; Liu, Y.B.; Maagd, A.; Dennehy, T.J. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4582-4584, 2000.
- Tabashnik, B.E.; Van Rensburg, J.B.J.; Carriere, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, p. 2011-2025, 2009.
- Tang, J.D.; Collins, H.L.; Metz, T.D.; Earle, E.D.; Zhao, J.Z.; Roush, R.T.; Shelton, A.M. Greenhouse tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 240-247, 2001.
- Van Rensburg, J.B.J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt - transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 24, p. 147-151, 2007.
- Vilarinho, E.C.; Fernandes, O.A.; Hunt, T.E.; Caixeta, D.F. Movement of *Spodoptera frugiperda* Adults (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 94, p. 480-488, 2011.
- Waquil, J.M.; Vilella, F.M.F.; Foster, J.E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, p. 1-11, 2002.
- Whalon, M.E.; Miller, D.L.; Hollingworth, R.M.; Grafius, E.J.; Miller, J.R. Selection of a colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 226-233, 1993.
- Wirth, M.C.; Georghiou, G.P.; Federici, B.A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 94, p. 10536, 1997.
- Wolfenbarger, L.L.; Naranjo, S.E.; Lundgren, J.G.; Bitzer, R.J.; Watrud, L.S. Bt Crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. **Plos One**, v. 3, p. 11, 2008.
- 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, X.; Candas, M.; Gricko, N.B.; Rose-Young, L.; Bulla, L.A. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death Differentiation**, v. 12, p. 1407-1416, 2005.
- Zhang, X.; Candas, M.; Griko, N.B.; Taissing, R.; Bulla, L.A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v. 103, p. 9897-9902, 2006.
- Zhao, J.Z.; Cao, J.; Collins, H.L.; Bates, S.L.; Roush, R.T.; Earle, E.D.; Shelton, A.M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings Of The National**

Academy Of Sciences Of The United States Of America, v. 102, p. 8426-8430, 2005.