

KATHERINE GIRÓN PÉREZ

**Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* a Cry1Ab e comportamento larval
em cana-de-açúcar**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

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

T

G527s
2013 Girón Pérez, Katherine, 1978-
Suscetibilidade de *Diatrea saccharalis* a Cry1Ab e
comportamento larval em cana-de-acúcar / Katherine Girón
Pérez. – Viçosa, MG, 2013.

70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Eliseu J. G. Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Diatrea saccharalis*. 2. Cana-de-acúcar - Doenças e
pragas. 3. *Bacillus thuringiensis*. 4. Pragas - Controle integrado.
5. Broca-da-cana. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em
Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 596.78

KATHERINE GIRÓN PÉREZ

Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* a Cry1Ab e comportamento larval em cana-de-açúcar

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

APROVADA: 30 de Novembro de 2013

Raul Narciso Carvalho Guedes
(Coorientador)

Weyder Cristiano Santana

Eugênio Eduardo Oliveira

Mateus Ribeiro de Campos

Eliseu José Guedes Pereira
(Orientador)

**A Deus, meu tudo,
À minha avó, Ana Luisa Córdoba (*In Memoriam*) e
À minha mãe, Lilia Isabel Pérez, gratidão eterna!
Ao meu maravilhoso país, Colômbia.**

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida, a Deus, meu motivo, meu sentido, meu estandarte,

À minha avó, Ana Luisa Córdoba (*In memoriam*), amor perfeito, incondicional que alimentou minha juventude e alimenta minha vida,

À minha mãe, Lília Isabel Pérez, minha força, incentivo, suporte e exemplo,

Ao Marcelo Mascarenhas, pelo apoio, amizade, companhia e por me ajudar a levantar quando senti desfalecer,

Ao convenio PEC-PG (Capes) pela concessão da bolsa de Doutorado,

Às minhas amigas Marcela Ceballos e Carolina Galarza, longe, mas sempre perto aquecendo meu coração, sinto sua falta,

Ao Alejandro Pabón, Vivian Sandoval, Silvana Souza, Andreza Kerr Fantine, por terem me ajudado e recepcionado quando cheguei em Viçosa, pelo apoio e cuidados,

Aos amigos que conquistei em Viçosa, Bruno Soares, Juliana Morales, Felipe Sánchez Barrera, Maria Bianney Bermudez, Karen Marimón e Gustavo Marin, obrigada pelos bons momentos, risadas, tristezas, companhia e carinho,

Às minhas amigas Natália Alves e Roberta Leme, fundamentais durante minha passagem pela UFV,

Às minhas amigas Aline Pedrosa, Elisa Faria, Juliana Fonseca, Morgana, Natália Vicente, Pollyana, Renata de Fernandes, Sharrine Oliveira pelos bons momentos, churrascos e conversas,

Ao Professor Raul Guedes pela acolhida, ajuda e amizade e por ser exemplo de profissionalismo e humildade,

Aos amigos e colegas do laboratório de Ecotoxicologia, Alberto Soares Corrêa, Conrado Denadai, Daiane Celestrini, Eduardo Góes, Erick Góes, Hudson Ventura, Kleber Pereira, Laura Pantoja, Lirio Junior, Lucas Braga, Lessando Gontijo, Mateus Campos, Marcos Mendes, Milaine Fernandes, Ronnie Von Veloso, Wagner Barbosa, Vinicius D'Avila,

Ao Professor Eliseu Pereira pela orientação e ensinamentos,

Aos colegas do laboratório de Interação inseto-planta, Adriano Tomaz, Fernanda Freitas, Nilson Rodrigues, Oscar Santos, Mauricélia Almeida, Matheus Waquil e especialmente aos estagiários, Anderson Oliveira, André

Ferraz, Clebson Tavares, Gustavo Valicente, Thais Moreira, Hugo Monteiro e Henriette Garijo,

Ao Professor Gustavo Martins e colegas do laboratório de Biologia Molecular de Insetos, pela ajuda, orientação e bons momentos,

À equipe técnica do núcleo de Microscopia da UFV,

Aos colegas do laboratório de Bioquímica Camila Rocha, Eduardo e Renata Celly pela ajuda nos experimentos e disposição, além das boas risadas,

À CPV e IPV pela acolhida, foram uma família para mim,

Ao Edgard, Edna Alves e família, vocês me ensinaram que existem verdadeiras famílias que são gestadas no coração, amo suas vidas!

Ao César, Rozane, Lara, Diego e Victor Pimentel, mais do que amigos uma família, vocês forma muito importantes durante esses quase quatro anos, saudades de vocês,

Ao Allan, Cristina, Daniel e Alana Werneck, vocês são fantásticos, obrigada pelos bons momentos, apoio e pelo carinho,

Às amigas Ana Lidia Galvão, Chryistina Rosa, Denise Fernandes, Fernanda Fernandes, Katryne Goulart, Mauricélia Almeida, Vanessa Lana, Rafaela Araújo, Silma Leite, parceiras de luta e oração, obrigada pelo apoio,

A todos os que de maneira direta ou indireta fizeram parte desta conquista.

Sonhos, o motor da vida.

Pegue sua bagagem, siga em frente e vença. Obstáculos e dificuldades farão parte da travessia, pessoas diferentes e indiferentes, também. Não precisa ser igual a ninguém, apenas seja você. Ouça, aprenda, pense e observe, e pegue para si aquilo que há de melhor. Com o resto, aquilo que não te acrescenta, aquilo que te puxa para baixo, use como um desafio e construa uma escada para chegar até onde você sempre quis.

(Katherine Girón Pérez)

RESUMO

GIRÓN PÉREZ, Katherine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* a Cry1Ab e Comportamento Larval em Cana-de-açúcar**. Orientador: Eliseu J.G. Pereira. Coorientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e Gustavo Ferreira Martins.

A cana-de-açúcar no Brasil representa um das principais culturas em expansão dado o aumento da importância do etanol como biocombustível. Em decorrência disso, existe a necessidade de ações proativas que retardem o surgimento e intensificação da incidência de pragas e doenças. A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), é a principal praga da cultura e as principais estratégias de manejo de suas populações são o uso de controladores biológicos e variedades resistentes. O uso da transgenia tem sido estudado nos últimos anos com expectativas promissoras na cultura da cana-de-açúcar. Nos Estados Unidos, a pró-toxina Cry1Ab tem sido usada com sucesso no controle da praga em milho, porém teme-se pelo problema de resistência da praga a Bt. No presente trabalho foram testadas as hipóteses que populações provenientes de vários locais do Brasil apresentariam diferenças na suscetibilidade à toxina Cry1Ab; que a espécie responderia ao regime de seleção em laboratório usando como fonte de seleção plantas de milho expressando a pró-toxina; que populações com diferentes graus de suscetibilidade apresentariam diferenças na ativação do sistema imune e na morfologia das células principais no intestino médio, alvo da toxina ativada; e que o comportamento das larvas com diferentes graus de suscetibilidade apresentaria mudanças em resposta à resistência varietal. Os resultados obtidos demonstraram que há variação na suscetibilidade entre as diferentes populações e que a espécie responde à seleção ao usar como pressão de seleção folhas de milho Bt Cry1Ab. A ativação da resposta imune pela ingestão da toxina Cry1Ab não variou com grau de suscetibilidade das populações estudadas, porém a morfologia das células principais do intestino médio sofreu alterações, possivelmente refletindo a intoxicação pela toxina. Finalmente o comportamento das larvas nos diferentes genótipos de cana-de-açúcar foi afetado pelo grau de suscetibilidade exibido pelas plantas. Esses resultados

em conjunto levam a preocupações em relação à futura utilização de milho e cana-de-açúcar transgênicos expressando Cry1Ab no Brasil, porque o aumento da resistência à broca para esta toxina pode ser rápida à exposição aos cultivos transgênicos em larga escala em campo, o que vai necessitar de táticas de manejo da resistência para maximizar o uso sustentável destas culturas.

ABSTRACT

GIRÓN PÉREZ, Katherine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2013. **Susceptibility of *Diatraea saccharalis* to Cry1Ab and Larval Behavior in Sugarcane.** Adviser: Eliseu J.G. Pereira. Co-advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes and Gustavo Ferreira Martins.

The sugarcane in Brazil is one of the cultures in expansion due to the increasing importance of ethanol as biofuel. Consequently, pro-active actions are needed to slow the emergence and intensification of pests and diseases incidence on sugarcane culture. The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), is the main pest of this culture and the use of biological controllers and resistant varieties is the main strategies to manage their populations. Transgenic plants have been studied in recent years with promising expectations for sugarcane culture. In the United States of America, the pro-Cry1Ab toxin has been successfully used to control the pest in corn, but there are concerns on the problem of pest resistance to Bt. In this study, some hypothesis were tested, such as: (1) populations from different parts of Brazil would show differences in susceptibility to Cry1Ab toxin; (2) the species would respond to system selection in laboratory using corn plants as selection source expressing the pro-toxin; (3) populations with different susceptibility degrees would show differences in the immune system activation and in the morphology of principal cells of middle intestine, target of the activated toxin, and; (4) the larval behavior with different susceptibility degrees alter in response to varietal resistance. Results showed that there is variation in susceptibility among different populations and the species responds to the selection when using Cry1Ab Bt corn leaves as selection pressure. Activation of the immune response by the Cry1Ab toxin ingestion did not vary with the susceptibility degree of the studied populations, but the principal cells morphology of the middle intestine unchanged reflecting poisoning by the toxin possibly. Finally, the larval behavior on different sugarcane genotypes was affected by the susceptibility degree exhibited by plants. These results together lead to concerns about the future usage of transgenic corn and sugarcane expressing Cry1Ab in Brazil, because increased borer resistance to this toxin can be rapid

to exposure to transgenic crops in large-scale in field, which will require resistance management tactics to maximize the sustainable use of these crops.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS	6
CHAPTER I	10
Abstract	10
1. Introduction	11
2. Material and Methods	13
2.1. Insects	13
2.2. Concentration-response bioassays	14
2.3. Selection for Cry1Ab resistance	15
1. Results	16
3.1. Susceptibility of the sugarcane borer populations to Cry1Ab	16
3.2. Selection for Cry1Ab resistance	18
4. Discussion	20
5. References	22
CAPITULO II	27
Resumo	27
1. Introdução	28
2. Material e Métodos	30
2.1. Coleta da hemolinfa e do intestino médio	30
2.2. Atividade das fenoloxidasas	34
2.3. Contagem total de hemócitos	35
2.4. Alterações das células principais no intestino médio	35
3. Resultados	36
3.1. Atividades das fenoloxidasas	36
3.2. Contagem total de hemócitos	38

3.3. Alterações das células principais no intestino médio	39
4. Discussão	41
5. Referências	42
CAPITULO III	47
Resumo	47
1. Introdução	48
2. Material e Métodos	50
2.1. Criação do inseto	50
2.2. Manutenção das plantas	50
2.3. Oviposição	51
2.4. Movimentação larval	51
2.5. Consumo alimentar e interação larval	53
3. Resultados	54
3.1. Oviposição e movimentação larval	54
3.2. Consumo alimentar e interação larval	58
4. Discussão	61
5. Referências	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	69

INTRODUÇÃO GERAL

A broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), é considerada praga importante da cana-de-açúcar além de outras gramíneas, como arroz, milho, pastagens, sorgo e trigo. Em decorrência dessa expansão, as populações de insetos aumentam, sendo necessário adotar medidas de manejo duradoras e eficazes, levando em consideração os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

A distribuição de *D. saccharalis* compreende desde a região sul dos Estados Unidos da América até a Argentina (Martins, 1983). No Brasil, as espécies do gênero *Diatraea* são pragas-primárias na cana-de-açúcar, incluindo as espécies *D. saccharalis* e *D. flavipennella* (Box, 1931). *D. saccharalis* tem ocorrência mais generalizada, enquanto que *D. flavipennella* predomina nos estados da Região Nordeste (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011). Segundo Nakano (2011), a broca infesta plantas durante todo o desenvolvimento da cultura, sendo que a colonização se inicia desde a formação dos internódios. O ciclo completo do inseto varia de 53 a 60 dias, podendo ter de quatro a cinco gerações por ano dependendo das condições climáticas. Após sete dias da oviposição, as larvas recém-eclodidas inicialmente se alimentam do parênquima das folhas e depois penetram no colmo pela região dorsal da folha junto à bainha. No interior do colmo as larvas constroem galerias, onde permanecem até a pupação. No fim do desenvolvimento larval, que dura cerca de 40 dias, a lagarta abre um orifício no colmo e fecha-o com fios de seda e serragem. Catorze dias após, emerge o adulto, que sai por esse orifício (Nakano, 2011).

A construção de galerias dentro dos colmos pela broca ocasiona perdas importantes em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura. Infestações nos estádios iniciais pode causar morte apical da planta, sintoma conhecido como coração morto. Entretanto, em cana de açúcar, o principal dano é causado pela colonização das galerias da broca pelos fungos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*, que ocasionam, respectivamente, a podridão-de-fusarium e a podridão-vermelha. Isso leva à inversão e perda de sacarose no colmo, diminuição da pureza do caldo, além de problemas de

contaminação no processo de fermentação alcoólica, perda de peso devido ao mau desenvolvimento das plantas atacadas, seca dos ponteiros, enraizamento aéreo, brotação lateral, morte de algumas plantas atacadas, quebra do colmo na região da galeria e redução da quantidade de caldo (Nakano, 2011). Segundo a Associação dos Fornecedores de Cana de Piracicaba e Região (AFOCAPI¹), o prejuízo na cana-de-açúcar é em média 0,77% de redução de produtividade agrícola a cada 1% de intensidade de infestação, ou seja, se a cada 100 internódios examinados houver um colmo broqueado.

O controle da praga é difícil devido à localização de suas larvas no interior dos colmos. Atualmente, 24 inseticidas sintéticos estão registrados para o controle de *D. saccharalis* em cana-de-açúcar no Brasil e dois no milho (Agrofit²); no entanto, são utilizados apenas em caráter emergencial, mediante surtos populacionais da praga, pois não são compatíveis com os principais agentes de controle, os micro-himenópteros *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) controladores de larvas e ovos respectivamente.

A resistência de plantas tem sido uma das principais estratégias de manejo de *D. saccharalis* na maioria das regiões produtoras de cana no mundo (Mathes e Charpentier, 1969). Compatível com outros métodos, a resistência varietal normalmente exibe efeitos sinérgicos na redução das populações da praga em campo (Lara, 1991). No entanto, o melhoramento da cana para fins de seleção e obtenção de cultivares resistentes ao ataque de insetos broqueadores é um processo difícil, principalmente devido ao limitado conhecimento sobre caracteres de resistência do hospedeiro e sobre características-chave da bioecologia da praga, incluindo o comportamento larval de colonização e alimentação larval (Bessin *et al.*, 1990).

Embora *D. saccharalis* seja uma espécie sobre a qual existem vários estudos sobre a biologia do inseto, comportamento, interação com a planta e resistência varietal associada ao ataque da espécie, poucos resultados são conclusivos. Alguns estudos utilizando diferentes genótipos de cana-de-açúcar confirmam que os principais mecanismos de resistência em cana a insetos do

¹ http://www.cana.com.br/biblioteca/cartilha_praga/broca.pdf

² http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

tipo broqueador, são antibiose e antixenose ou não-preferência (Meagher *et al.*, 1996). A resistência na cana-de-açúcar se divide em duas partes a resistência da folha e a do caule, ambas as partes podem apresentar barreiras físicas e químicas ou diferenças na qualidade nutricional podendo afetar o comportamento e a biologia do inseto respectivamente.

A resistência foliar reúne características tais como diferenças na arquitetura da planta (White *et al.*, 2006), pilosidade das folhas e colmos, esta última relatada por Sosa (1988) como uma das principais barreiras físicas que afeta a oviposição de *D. saccharalis*, pois as fêmeas tem preferência em ovipositar sobre canas glabras do que em canas com tricomas. De acordo com Smith (2005), a antixenose ocasionada pela presença de tricomas é um mecanismo de defesa que algumas plantas, incluindo a cana-de-açúcar, apresentam contra o ataque de insetos da família Pyralidae e Crambidae.

Adicionalmente, a resistência do caule envolve fatores que afetam a habilidade da larva para penetrar, se estabelecer, formar galerias dentro do colmo e obter suficientes nutrientes para se desenvolver e completar seu ciclo de vida. Características como alto conteúdo de fibra e maior dureza dos internódios também estão associadas com a resistência da cana à broca (White *et al.*, 2006).

No paradigma de controle fitossanitário de baixa poluição ambiental, as pesquisas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de variedades de cana e milho geneticamente modificadas para minimizar as perdas com o ataque de pragas. As primeiras plantas de cana-de-açúcar resistentes à broca foram produzidas pela transformação com uma versão truncada do gene cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*, embora as plantas resultantes expressassem quantidades muito baixas da proteína (Arencibia *et al.*, 1997). Braga *et al.*, (2003) relataram a obtenção de um significativo número de eventos transgênicos resistentes à broca da cana-de-açúcar, em duas variedades comerciais usando o gene Cry1Ab. Como resultado, as plantas foram altamente resistentes ao ataque do inseto sob condições semi-controladas e a campo. Mais recentemente, uma versão truncada do gene Cry1Ac de *B. thuringiensis* foi inserida em plantas de cana-de-açúcar por Weng *et al.*, (2006),

em que níveis significativos da proteína foram expressos em pelo menos dois clones de cana-de-açúcar.

Nos Estados Unidos desde o ano de 1999, o milho Bt que expressa a toxina Cry1Ab tem sido uma das ferramentas de sucesso no manejo de lepidóteros da família Crambidae, todos eles broqueadores de colmo, incluindo *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea grandiosella* e *D. saccharalis* (Castro *et al.*, 2004b). No Brasil o plantio do milho Cry1Ab (evento MON810) foi autorizado em 2007 pela CTNBio para controle da broca-do-colmo (*D. saccharalis*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

Para qualquer estratégia de manejo de pragas adotada, aspectos como a evolução de resistência nas populações que sofrem pressão de seleção devem ser considerados. Resistência é definida como mudanças nas frequências alélicas em uma população de organismos vivos, favorecendo a expressão alelos que conferem vantagem no ambiente frente a uma determinada pressão de seleção. Esses alelos são herdados de geração a geração, e assim diz-se que resistência é uma característica que evolui em resposta à pressão de seleção (Pittendrigh *et al.*, 2008). No caso dos cultivos de plantas Bt, a resistência pode surgir devida principalmente ao uso inadequado da tecnologia. Com o aumento da área plantada com culturas transgênicas, a alta pressão de seleção exercida é um dos fatores que aceleram o aumento da resistência, principalmente quando não há estabelecimento de áreas de refúgio. Até o ano 2011, no Brasil foram plantados 30,3 milhões de hectares com cultivos transgênicos, havendo um aumento de 19,3% (ou 4,9 milhões de hectares) em relação ao ano de 2010 (Céleres, 2012)³.

O primeiro relato de resistência de insetos a *Bacillus thuringiensis* data do ano 1985 no Havaí, onde populações de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) após 15 gerações de seleção em laboratório com Dipel® (*Bt* var. *kurstaki*) (Ferré e Van Rie, 2002) houve aumento a resistência ao produto. Mais recentemente em Porto Rico, Storer *et al.*, (2010) relataram e caracterizaram a resistência em populações de campo de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

³ http://www.celeres.com.br/pdf/RelBiotecBrasil_1201_vf.pdf

Noctuidae) coletadas em milho expressando a toxina Cry1F. No ano de 2004 no estado de Louisiana (EUA) foi documentada a primeira população de *D. saccharalis* resistente em milho (Huang *et al.*, 2007). Ao longo dos anos, *D. saccharalis* tem se expandido para outras regiões da região sul dos Estados Unidos, assumindo o status de praga dominante em várias regiões do país (Castro *et al.*, 2004a, Huang *et al.*, 2006).

Um dos mecanismos de resistência a Bt melhor elucidado e mais frequente é a alteração nos receptores proteicos no intestino médio dos insetos, onde as toxinas Cry se ligam para exercer a toxicidade (Ferré e Van Rie, 2002). Em insetos resistentes às toxinas Cry1Ab e Cry1Ac, tem se observado o códon de parada precoce no processo de transcrição do gene aminopetidase ou de caderina, resultando em receptores truncados e/ou com mudanças na conformação (Schnepf *et al.*, 1998; Pittendrigh *et al.*, 2008). No caso específico da broca-da-cana, o mecanismo de resistência à toxina Cry1Ab é a diminuição na expressão do receptor caderina (Yang *et al.*, 2011). Essas alterações moleculares que ocorrem nos receptores resultam em redução na afinidade das toxinas *Bt* aos receptores localizados nas microvilosidades da membrana apical do intestino médio, o qual é experimentalmente observado em preparados desses tecidos (Bravo e Soberón, 2010).

Outro mecanismo que pode estar associado à resistência são mudanças na resposta imune e no aumento da atividade enzimática de fenoloxidasas (Ma *et al.*, 2005). Compostos que participam na ativação do sistema imune, tais como fenoloxidasas, são transportados por meio do envoltório intestinal até o intestino médio e funcionam como elicitores que podem induzir o sequestro de toxinas no lúmen intestinal. O mecanismo de sequestro pode estar associado com aumento na atividade de manose-fosfatase-isomerases, esterases e serino-proteases, tal como observado em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), em que tais enzimas ligam-se com alta afinidade à toxina de *Bt* evitando sua ligação aos receptores específicos (Herrero *et al.*, 2001; Gunning *et al.*, 2005; Milne *et al.*, 1998).

Dado a importância econômica da broca *D. saccharalis*, a escassez de estudos sobre o seu comportamento larval no interior do colmo da planta e a

crescente utilização de cultivos *Bt* no Brasil, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar a resposta toxicológica e imune de populações de *D. saccharalis* à exposição à proteína inseticida Cry1Ab de *B. thuringiensis*, associadas a níveis de suscetibilidade à toxina, assim como caracterizar a resistência varietal de genótipos de cana-de-açúcar a partir da interação inseto-planta e as mudanças comportamentais nas larvas.

A tese foi escrita em três capítulos sendo que o primeiro deles trata de suscetibilidade de populações de *Diatraea saccharalis* à toxina Cry1Ab e seleção, o segundo aborda aspectos associados à ativação da resposta imune e morfologia das células do intestino médio de duas populações do inseto após ingerirem a toxina Cy1Ab e o terceiro sobre a resposta comportamental das larvas associada à resistência varietal em dois genótipos de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- Arencibia A., R. I. Vazquez, D. Prieto, P. Tellez, E. R. Carmona, A. Coego, L. Hernandez, G.A. Delariva, Selmanhousein G. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack Mol Breeding 3 (4): 247-255.
- Bakhsh, A; Siddique, S; Husnain, T. 2012. A molecular approach to combat spatio-temporal variation in insecticidal gene (Cry1Ac) expression in cotton. Euphytica, 183:65-74.
- Bessin, R.T; Reagan, T.E.; Martin, F.A. 1990. A moth production index for evaluating sugarcane cultivars for resistance to the sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 83:221-225.
- Braga, D; Arrigoni, E.B; Silva-Filho, M.C; Ulian, E.C. 2003.Expression of the Cry1Ab Protein in Genetically Modified Sugarcane for the Control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).Journal of New Seeds 5(1-3): 209-221.

- Bravo, A; Soberón, M. 2010. *Bacillus thuringiensis*: Mechanism and use. In: Insect control biological and synthetic agents. Eds: Gilbert, L e Gill. S. Academic Press UK. 470p.
- Castro, B.A; Riley T.J; Leonard, B.R; Baldwin, J. 2004a. Borers galore: emerging pest in Louisiana corn, grain sorghum and rice. Louisiana Agriculture 47(1): 4-6.
- Castro, B. A.; Leonard, B. R.; Riley, T. J. 2004b. Management of feeding damage and survival of southwestern corn borer and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) with *Bacillus thuringiensis* transgenic field corn. Journal of Economic Entomology, 97(6): 2106-2116.
- Cheavegatti-Gianotto A; Couto de Abreu, H.M; Arruda, P; Bespalhok Filho, J.C; Burnquist, W.L; Creste,S; Di Ciero, L; Ferro, J.A; Figueira, A.V.O; Filgueiras, T.S; Grossi-de-Sá, M.F; Guzzo, E.Z; Hoffmann, H.P; Landell, M.G.A; Macedo, N; Matsuoka, S; Reinach, F.C; Romano, E; Da Silva, W.J; Silva Filho, M.C; Ulian, E.C. 2011. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. Tropical plant biology. 4:62-89.
- Ferré, J; Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetic of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual review entomology 47:501-533.
- Gunning, R.V; Dang, H.T; Kemp, F.C; Nicholson. I.C; Moores, G.D. 2005. New resistanc mechanism in *Helicoverpa armigera* threstens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Applied and Environmental Microbiology, 71: 2558-2563.
- Herrero, S; Escrache, B. 2001. Mannose phosphateisomerase isoenzymes in *Plutella xylostella* support common genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in Lepidopteran species. Applied and Environmental Microbiology, 67: 979-981.
- Huang, F.N., Leonard, B.R., Gable, R.H., 2006. Comparative susceptibility of European corn borer southwestern corn borer, and sugarcane borer

- (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab protein in a commercial *Bt*-corn hybrid. J. Econ. Entomol. 99, 194-202.
- Huang, F; Ghimire, M.N; Leonard, R.R; Zhu, Y-C ;Head, G.P. 2012. Susceptibility of field populations of sugarcane borer from non-*Bt* and *Bt* maize plants to five individual Cry toxins. Insect Science 19, 570–578
- Lara, F. M. 1991. Princípios de resistência de plantas aos insetos. 2. ed. São Paulo: Ícone, 336p.
- Ma, G; Srajan. M; Preston. Ch; Asgari, S; Schmidt, O. 2005b. Mechanism of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in
- Maagd, R.A; Bravo, A; Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in genetics 17(4): 193-199
- Martins, J. F. da S. 1983. Resistência de variedades de arroz à *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) e sua associação com características biofísicas e bioquímicas das plantas. Tese (Doutorado em Ciências, Área de concentração em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Mathes, R. ; Charpentier, L. J. 1969. Varietal resistance in sugar cane to stalk moth borers, pp. 175-188. In J. R. Williams, J. R. Metcalfe, R. W. Mungomery & R. Mathes [eds.], Pests of Sugar Cane. Elsevier, New York.
- Meagher, R. L., Jr., J. E. Irvine, R. G. Breene, R. S. Pfannenstiel; M. Gallo-Meagher. 1996b. Resistance mechanisms of sugarcane to Mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economic Entomology, 89: 749-760
- Milne, R; Wright, T; Kaplan, H; Dean, D.1998. Spruce budworm elastase precipitates *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by specifically recognizing the C-terminal region. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28: 1013-1023.

- Nakano, O. Entomologia Econômica. 2011. Piracicaba: FEALQ, 464p.
- Pittendrigh, B.R.; Margam, V; Sun,L; Huesing, J. 2008. "Insecticide resistance in the post-genomics era", Em: Insect Resistance Management. Ed. David Onstad. p. 39-68.
- Schnepf, E.; Crickmore, N; Van Rie, J; Lereclus, D; Baum, J; Feitelson, J; Zeigler, D.R; Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and molecular biology reviews 62(3): 775-806.
- Smith, C.M. 2005. Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches. The Netherlands: Springer, 2005. 423p.
- Storer, N; Babcock, J.M; Schlenz, M, Meade, T, Thompson, G.D, Bing, J.W; Huckaba, R.M. 2010. Discovery and Characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) in Puerto Rico. Journal of Economic Entomology, 103(4): 1031-1038
- Yang, Y; Zhu, Ch.Y; Ottea, J; Husseneder, C; Leonard, B.R; Abel, C; Luttrell, R; Huang, F. 2011. Down Regulation of a Gene for Cadherin, but Not Alkaline Phosphatase, Associated with Cry1Ab Resistance in the Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis*, Plos One, 6(10):1-12.
- Weng, L., Deng, H., Xu, J., Li, Q., Wang, L., Jiang, Z., Zhang, H., Li, Q. and Zhang, L. 2006. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. Pest Management Science 62 (2): 178-187
- White, W.H; Tew, T.L; Richard, E.P. 2006. Association of sugarcane pith, rind hardness, and fiber with resistance to the sugarcane borer. Journal American Society Sugar Cane Technologists, 26:87-100.

CHAPTER I

Susceptibility to Cry1Ab of Brazilian populations of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* and response to selection for resistance

Abstract

Insect resistance to transgenic plants is a serious concern that may prevent their use for pest management. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins (Bt-toxins) have been widely used in Brazil primarily for caterpillar control in a high-selection pressure scenario, particularly in the absence of refuge. The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (F.) is a key pest of sugarcane and other grasses, which is a current focus of research for the development of transgenically resistant genotypes. Despite its importance for the field use of transgenic resistance, the current susceptibility status of field populations of the sugarcane borer to Bt-toxins is unknown. Laboratory studies were carried out to characterize the susceptibility of this species to the Bt toxin Cry1Ab and subsequently to select a resistant strain for additional studies of Cry1Ab resistance in the sugarcane borer. The susceptibility characterization was performed using insect colonies from different Brazilian laboratories whose neonate larvae were exposed to different Cry1Ab concentrations by introducing the toxin into an artificial diet. The selection for Cry1Ab resistance was carried out by exposing the larvae to Cry1Ab-expressing maize (MON 810). The results indicated that there was variable susceptibility to Cry1Ab populations reaching up to approximately 30-fold at LC₅₀ and EC₅₀. The larvae responded positively to Cry1Ab selection and showed a 55-fold increase in resistance after four generations. This suggests the suitability of using Bt-expressing leaves for selection and the existence of variability for Bt-resistance in populations of the sugarcane borer.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Bt-toxin selection, Bt-resistance, *Saccharum officinarum*.

1. Introduction

The durability and efficacy of the use of genetically modified plants in agriculture as an insect-pest management tool are potentially compromised by several factors. Among them, lack of suitable refuge areas to either prevent or delay the raise of resistant insect populations, low toxin expression in the transgenic plants subjected to highly tolerant pest species, and high selection pressure are particularly important (Ferré and Van Rie, 2002; Tabashnik *et al.*, 2009). Although the frequency of resistant allele(s) is usually low in native conditions (Huang *et al.*, 2006), the frequency can quickly increase and may compromise this management technology within a few generations, leading to control failures if preventive procedures are neglected (Ferré and Van Rie, 2002).

Estimating the susceptibility is a fundamental step for characterizing the inheritance of resistance, adaptive cost of resistance and its underlying mechanisms, which are important for the eventual large-scale commercial use of insect resistant transgenic plants delaying potential problems such as resistance evolution (Gould *et al.*, 1995; Marçon *et al.*, 1999; Ferré and Van Rie, 2002; Huang *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008).

The expression of insecticidal toxins in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) has been studied since the 1990s and has focused on the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner (Braga *et al.*, 2003). This effort is due to the economic importance of sugarcane, as this crop is responsible for 70% of the world sugar production and is currently under expanded cultivation and increased investments for biofuel production, with Brazil as the world-leading producer (Piperidis *et al.*, 2010). The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* Fabricius, (1794) is the main insect pest of sugarcane and also affects maize, sorghum and rice (Ferreira *et al.*, 2004). Therefore, current research is focused on the development of transgenic sugarcane varieties expressing Bt toxins against the sugarcane borer (Arencibia *et al.*, 1997; Braga

et al., 2003); these crops are expected to be commercial available within the next decade.

The transgenic maize that expresses the pro-toxin Cry1Ab (MON 810) is the most widely cultivated crop around the world that controls lepidopteran borers, which was introduced in the US in 1999 as a preventative measure against *Diatraea saccharalis* and the southwestern corn borer *D. grandiosella* Dyar (Castro *et al.*, 2004a). Bt-transgenic plant varieties were allowed in Brazil in 2008, and in 2009, nearly 70% of the maize cultivated in the country was one of the Bt-transgenic varieties. The maize expressing Cry1Ab has been reported to be not as efficient against *D. saccharalis* as for the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) (Huang *et al.*, 2007). This correlates with evidence that the sugarcane borer has evolved detectable levels of resistance in the laboratory as well as the initial detection of high field resistance to Cry1Ab in the state of Louisiana in the US (Huang *et al.*, 2007).

The sugarcane borer appears to have adapted well to maize plants in the southern US, where it is a prevailing pest species to this crop (Castro *et al.*, 2004a; Huang *et al.*, 2006, 2007). Curiously, this species is only a secondary maize pest in Brazil, leading to concerns of overlap in maize and sugarcane cultivation. The shift in host preference observed in the US may also take place in Brazil, but this is unlikely because of the abundance of sugarcane (the primary host plant) in Brazil.

Selection for Bt-toxin resistance in field-collected insects is possible using Bt-expressing plant varieties, various parts of the plant, and Bt-contaminated diet as well as other alternatives (Gould *et al.* 1995; Ferré and Van Rie, 2002; Pereira *et al.*, 2008). However, the production of purified toxin is expensive in contrast to Bt toxin-expressing plants (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2013). Therefore, the objective of our study was to assess the variability in Cry1Ab susceptibility among Brazilian populations of the sugarcane borer and to select a mixed population for resistance to this toxin in the laboratory. We expected natural variability in Cry1Ab susceptibility among populations of the sugarcane borer, as well as the possibility of selection for resistance to this toxin prior to the commercial use of transgenic sugarcane expressing this toxin.

2. Materials and methods

2.1. Insects

Insect populations maintained in the laboratory were obtained from the Federal University of Alagoas (Aracaju, AL, Brazil) and the Federal University of Lavras (Lavras, MG, Brazil), as well as from the sugarcane mills in Santa Helena (Santa Helena, GO, Brazil), São Paulo (São Paulo, SP, Brazil) and Campo Novo de Parecis (Campo Novo de Parecis, MT, Brazil). Upon arrival, the eggs were disinfected in sequential solutions of formaldehyde (1%), distilled water, and copper sulfate pentahydrate (1%). After air drying, between 200 and 300 eggs were placed in 500 ml glass jars with a perforated lid sealed with a metallic net containing 250 ml of artificial diet (King and Hartley, 1985). If larvae were received instead of eggs, they were directly placed in the glass jars containing diet; whereas eventual pupae that were received were contained in polyvinyl chloride (PVC) cages (20 cm x 10 cm) until adult emergence and mating. The inner surface of the PVC cages was covered with sulfite paper as an egg-laying substrate.

The eggs and larvae were maintained in a rearing room at constant temperature and relative humidity (27°C and a 14:10 h L:D cycle), whereas the adults were maintained in a rearing room at 26°C and a 14:10 h L:D cycle. A fine-mist humidifier was turned on within the rearing rooms to provide a minimum of 60% relative humidity during the dry season. The twenty-day old larvae were transferred to Petri dishes (15 cm diameter) containing King and Hartley's artificial diet until they pupated. The pupae were subsequently sexed and transferred to the adult PVC cages (120 adults per cage with a sex ratio of 1 female to 1.5 males). The larvae obtained from the eggs laid were used for colony maintenance, susceptibility bioassays and selection for Cry1Ab resistance.

2.2. Concentration-response bioassays

Concentration-response bioassays were established for each insect population obtained (as well as from the mixed populations obtained from the original populations) and used for Cry1Ab resistance selection. The purified Cry1Ab toxin was obtained from Prof. Blair Siegfried (Department of Entomology, University of Nebraska-Lincoln, NE, USA). The concentration-response experiments were carried out using neonate larvae from different cages to minimize their relatedness, and each assay was replicated between three and four times for each population. The 128-well bioassay trays (C-D International, New Jersey, USA) received 1 ml of diet per well, which allowed for simultaneously testing of seven toxin concentrations and a control treatment (i.e., no toxin) for each population. The toxin was solubilized with 0.1 M sodium bicarbonate (sodium carbonate solution (pH 10.4) containing 0.1% Triton X-100) and applied to the surface of the diet within the tray wells (30 μ l/well) to ensure uniform application of the toxin. The range of toxin concentrations tested (2 -128 ng toxin/cm²) was based on the LC₅₀ and LC₉₀ values estimated by Tan *et al* (2011) and established from a stock solution of 0.43 μ g toxin/ μ l. Each tray well containing both diet and toxin received a single neonate larvae (24 h old) transferred with a fine hairbrush, and the entire tray was sealed with transparent adhesive tape once all the larvae had been transferred.

Sixteen larvae were tested at each toxin concentration for each population (128 larvae per tray). The trays were maintained under controlled conditions (27°C, 60% relative humidity and 24 h dark) for seven days, after which larvae mortality was recorded by observing if they moved when touched by the tip of a fine hairbrush and/or if they did not molt to the 2nd instar. The live larvae were subsequently weighted. The data regarding the mortality and growth inhibition were subjected to probit analyses (PROC PROBIT; SAS Institute 2008). The LC₅₀ and EC₅₀ estimates obtained were used to estimate the resistance ratios and respective 95% confidence intervals as described by Robertson *et al* (2007).

2.3. Selection for Cry1Ab resistance

The selection for Cry1Ab resistance was performed by selecting the surviving neonate larvae of the sugarcane borer feeding on MON 810 maize leaves (cultivar DKB 390 Yg). The transgenic maize and its non-transgenic isolate were both planted in 7 liter plastic pots fertilized with 20 g/l of “Super Simples” mix (20% P₂O₅, 28% CaO, 12% S) in addition to 20 g/l of ammonium sulfate and 18 g/l of potassium chloride. The younger maize leaves from plants at the V3 and V5 stages were harvested and transversally cut into four portions (5 cm length) for subsequent placement into 16-cell plastic trays (5.5 x 3.5 cm). One hundred and sixty neonate larvae from each population were placed in the trays and fed for two days with 3 to 4 leaf fragments (ca. 160 g) with either transgenic or non-transgenic maize leaves (i.e., 160 larvae per plant type). The surviving larvae were subsequently weighted on the third day using an analytical balance (Shimadzu AUW220D, Shimadzu®, Kyoto, Japan). The expression levels of the Bt toxin in the transgenic plants were measured using the AgraStrip® Cry1Ab strip test (Romer Labs do Brasil, Campinas, Brazil).

The larvae from each population surviving the exposure to transgenic maize were collected upon reaching the 2nd instar and transferred to 16-cell plastic trays (5 x 3 cm) containing 50 ml diet/cell and were maintained under controlled conditions (27°C and 14:10 h L:D cycle) until pupate. The surviving pupae from each population were counted, sexed and eventually mixed to create a single population with higher genetic diversity (here referred to as mixed population). Fifteen couples from each population were mixed and randomly divided into two groups, with each group placed in a mating PVC cage maintained under controlled environmental conditions (27°C, 60-70% r.h., and 14:10 h L:D cycle). Eggs were used for the selection process for Cry1Ab resistance. The effect of the different portions of the young maize (whorl) leaves on larval survival and development was subjected to analysis of variance (PROC GLM; SAS Institute, 2008).

The eggs obtained from the adult cages of the mixed population were placed on plastic Petri dishes (9 cm diameter) with filter paper moistened in distilled water covering the bottom to stimulate egg hatching. The neonate

larvae were fed for two days with either Cry1Ab transgenic or non-transgenic (isoline) maize and subsequently subjected to selection as previously described. The procedure was replicated with three consecutive generations besides the initial selection. The survival and growth inhibition results, as well as the heritability data, were subjected to regression analysis (PROC GLM; SAS Institute 2008).

3. Results

3.1. Susceptibility of the sugarcane borer populations to Cry1Ab

The concentration-response curves obtained for larval survival and growth inhibition were fitted into the probit model ($\chi^2 < 8.5$, $P > 0.05$) allowing the proper estimation of the toxicological parameters LC_{50} and EC_{50} with their respective 95% fiducial limits and resistance ratios (and 95% confidence intervals) (Tables 1 and 2). The LC_{50} values obtained ranged from 0.32 ng/cm² (São Paulo) to 10.32 ng/cm² (CECA-UFAL), which corresponds to a 32-fold variation on the resistance ratios at LC_{50} (RR_{50}) (Table 1). There was significant variation in the Cry1Ab susceptibility among populations of the sugarcane borer and relatively low variation of the intra-population heterogeneity among populations, with the slopes from the concentration-mortality curves ranging from 1.11 to 2.17. Similar results were also obtained with the larval growth inhibition, with little variation of intra-population heterogeneity among the populations and resistance ratios reaching approximately 12-fold (CECA-UFLA) (Table 2). The mixed population was 10-fold more resistant than the more susceptible population when larval mortality was considered and 30-fold more resistant when larval growth inhibition was considered (Tables 1 and 2).

Table 1. Relative susceptibility of populations of the sugarcane borer to the Cry1Ab pro-toxin from *Bt*

Population	Generation	N	Slope (+/- SE)	LC ₅₀ ng/cm ² (FL ₉₅)	LC ₉₀ ng/cm ² (FL ₉₅)	x ²	p	RR ₅₀ (FL ₉₅)
Campo novo	11	496	1.29 (0.14)	7.60 (5.48-10.02)	74.54 (50.38-129.98)	7.430	0.190	23.99 (6.06-94.90)
CECA-UFAL	37	378	2.17 (0.24)	10.32 (8.08-12.82)	40.13(30.45-58.61)	7.646	0.177	32.56 (8.33-127.13)
Santa Helena	5	432	1.90 (0.22)	2.84(2.11-3.56)	13.45(10.48-19.00)	3.258	0.660	10.09 (0.73-12.47)
UFLA	15	416	2.05 (0.20)	5.15 (4.13-6.23)	21.73(17.07- 29.91)	7.474	0.188	14.7 (4.17-63.19)
Mixed population F1	1	512	1.11 (0.13)	3.19(2.01-4.47)	45.97 (31.27-79.99)	2.138	0.830	10.06 (5.85-18.86)
São Paulo	32	512	1.20(0.28)	0.32(0.027-0.81)	3.69(2.009-5.81)	8.037	0.154	1.00 (0.15-6.69)
Mixed population F4	4	512	1.27 (0.15)	17.55(13.06-23.18)	179.33(111.47 - 366.01)	3.806	0.578	55.33 (32.71-93.54)

Table 2. Relative growth inhibition of populations of the sugarcane borer exposed fed on diet containing the Cry1Ab pro-toxin of *Bt*

Population	Generation	N	Slope (+/- SE)	EC ₅₀ ng/cm ² (FL ₉₅)	EC ₉₀ ng/cm ² (FL ₉₅)	x ²	p	RR ₅₀ (FL ₉₅)
Campo novo	11	496	1.16(0.13)	2.43(1.46-3.47)	30.84(21.76-50.18)	8.468	0.132	7.67(1.91-30.69)
CECA-UFAL	37	378	1.76(0.20)	3.86(2.84-4.92)	20.66(15.41-31.17)	3.476	0.627	12.18(3.09-47.91)
Santa Helena	5	432	1.32(0.23)	0.82(0.26-1.50)	7.68(5.41-11.58)	6.572	0.254	2.59(0.63-13.56)
UFLA	15	416	1.48(0.27)	0.77(0.26-1.33)	5.64(4.08-8.37)	3.486	0.625	2.43(0.53-11.11)
Mixed population F1	1	512	0.92(0.27)	4.20(3.09-5.38)	33.10(24.43-49.87)	2.115	0.833	29.58(20.09-43.18)
São Paulo	32	512	0.92(0.29)	0.14(0.02-0.70)	4.15(1.046-8.25)	1.007	0.962	1.00(0.03-35.04)
Mixed population F4	4	512	1.21(0.14)	2.86(1.76-4.04)	32.96(23.37-53.50)	3.089	0.686	20.14(12.38-20.14)

3.2. Selection for Cry1Ab resistance

Larval survival and growth after ingestion of different parts of the whorl leaves were similar ($F_{3, 383} = 0.70$; $P = 0.55$), indicating similar expression of the Cry1Ab toxin throughout these leaves. The mixed population of the sugarcane borer that was subjected to selection for Cry1Ab resistance responded to this four-generation selection, reaching a 55-fold increase of resistance (Table 1). Larval survival from the Cry1Ab-selected strain reached levels similar to the non-selected larvae maintained on the non-transgenic isoline after four generations of selection (Fig. 1A). Larval weight gain was also different between the Cry1Ab-selected and non-selected insects, with the former not exhibiting any significant variation with successive generations of selection for Cry1Ab resistance, unlike the non-selected insects (Fig. 1B). The gain of selection based on the survivorship data indicated significant gain of Cry1Ab resistance upon selection (Fig. 2).

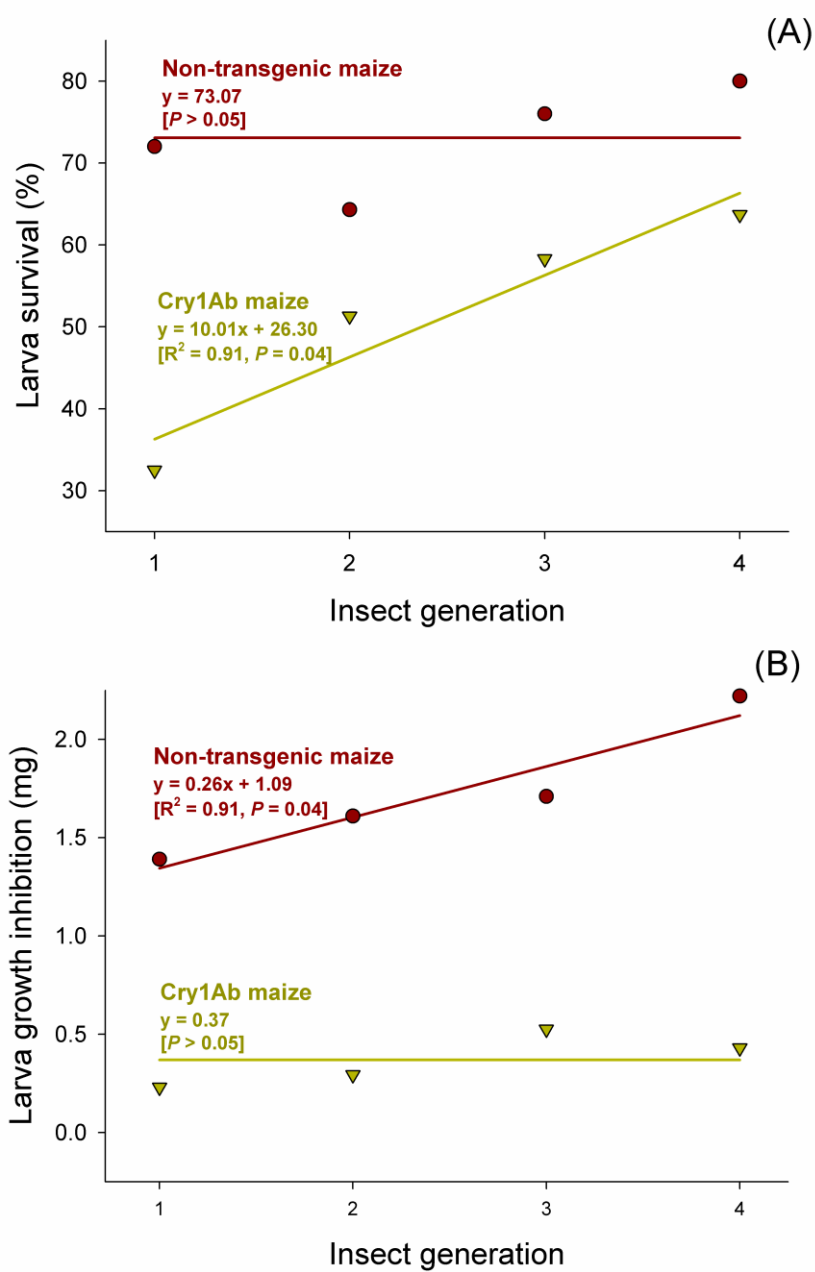


Figure 1. Larval survival (A) and larval weight (B) from a mixed population of the sugarcane borer *D. saccharalis* exposed to either maize leaves expressing the pro-toxin Cry1Ab or maize leaves from a non-transgenic isolate

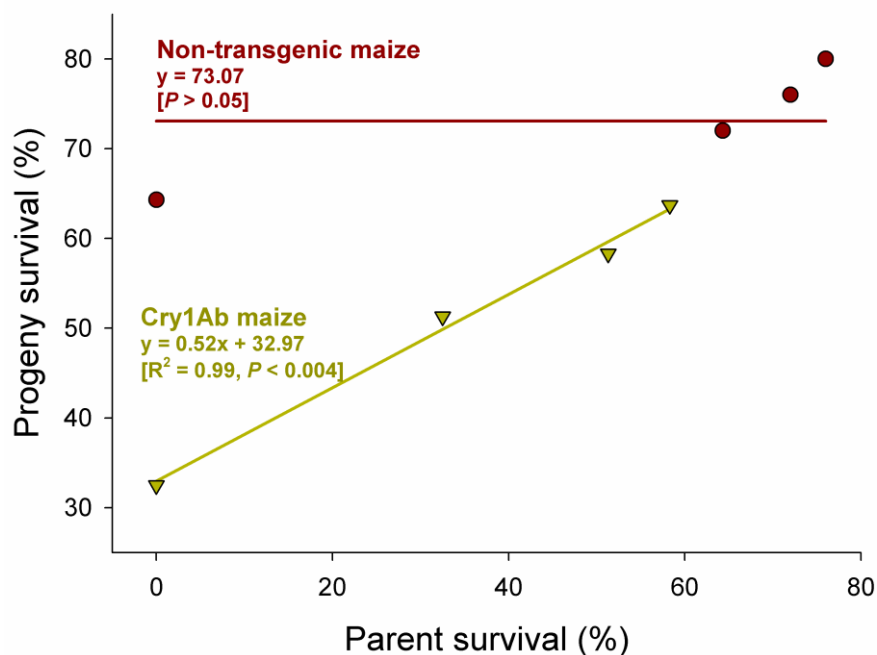


Figure 2. Gain by selection after each generation of selection of a mixed population of the sugarcane borer *D. saccharalis* exposed to either maize leaves expressing the pro-toxin Cry1Ab or maize leaves from a non-transgenic isolate.

4. Discussion

The concentration-response susceptibility estimates of the Brazilian sugarcane borer populations indicate up to 30-fold variability in the range of the LC_{50} and EC_{50} estimates, which overlap with those reported by Tan *et al.* (2011). Such variability is frequent and likely due to many factors, including geographic origin, host, previous selection procedures and mating patterns (Roush and McKenzie, 1987; Marçon *et al.*, 1999; Huang, 2006; Huang *et al.*, 2008; Gassmann *et al.*, 2009; Carrière *et al.*, 2010; Crespo *et al.*, 2010). The knowledge of the existing population variability to Cry1Ab susceptibility is important to allow proper management of this control tool in minimizing the risk of selection and growth of Cry1Ab resistance (Roush and McKenzie, 1987; Gassmann *et al.*, 2009; Carrière *et al.*, 2010; Crespo *et al.*, 2010).

The toxin expression in the different parts of the plant potentially affects selection for resistance (Castro *et al.*, 2004b; McAllister *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007). Such variation has been reported in maize leaves during the

reproductive stage (Székács *et al.*, 2010; Bakhsh *et al.*, 2011); however, we did not observe any significant variation in Cry1Ab expression in maize leaves during the vegetative stage of the plant. The use of the Cry1Ab-expressing leaves from transgenic maize allowed for the successful selection of resistance to this toxin in a mixed population of the sugarcane borer. Larval survival under Cry1Ab exposure reached levels resembling that of larvae maintained in non-transgenic isoline after four generations of selection. Therefore, the pre-existence of Cry1Ab resistant alleles does not appear to be particularly rare in Brazil, and the use of a mixed population for Cry1Ab resistance selection allowed for relatively quick selection, as would be expected in such cases (Tabashnik *et al.*, 1992). The selection for Cry1Ab resistance using maize leaves expressing the toxin was also successfully achieved in the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) (González-Cabrera *et al.*, 2013), but this technique is still uncommon in the laboratory despite its potential, as demonstrated in our study with the sugarcane borer.

Some physiological insect traits may be affected by the selection for either insecticide or toxin resistance (Cousteau *et al.*, 2000; Guedes *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008ab; Gassmann *et al.*, 2009). The sugarcane borer exhibited a decrease in weight when maintained with an artificial diet without selection for Cry1Ab resistance, which led to smaller adults with reduced egg production and thus reduced fecundity (data not shown). In contrast, the insects selected for Cry1Ab resistance did not exhibit a significant decline in weight gain with selection, indicating an apparent lack of adaptive costs associated with Cry1Ab resistance at least for the resistance levels obtained, which was unexpected based on previous studies (Carrière *et al.*, 2001; Taashnik *et al.*, 2000, 2003). Such non-detectable expression of adaptive costs is sometimes observed for insecticide resistance (e.g., Guedes *et al.*, 2006) and has even been minimized in the sugarcane borer by the transfer of the larvae feeding on maize leaves to an artificial diet for the completion of development, a possibility that has already been reported in other species (Cousteau *et al.*, 2000; Gassmann *et al.*, 2009). This may occur because an artificial diet tends to favor the development and survival of the insects because of its superior nutritional quality (Schoonhoven *et al.*, 2005). Therefore, the transfer of the resistant

insects from the host leaves to an artificial diet may have minimized the effects of Cry1Ab resistance costs while potentially relaxing the adverse effects of the host plant on the larval development by preventing a longer exposure to the host defensive phytochemicals, which favors improved larval development (Carrière *et al.*, 2001; Janmmant *et al.*, 2003).

In conclusion, we observed significant variations in the susceptibility of Brazilian populations of the sugarcane borer to Cry1Ab, which reached levels as high as 30-fold when larval mortality and growth inhibition were assessed. These findings spark concerns regarding the future use of transgenic maize and sugarcane expressing Cry1Ab toxins in Brazil because the evolution of sugarcane borer resistance to this toxin is likely to be rapid upon their large-scale field use, which would require resistance management tactics to maximize the sustainable use of these transgenic crops. The mixing of the gathered populations allowed for sufficient variability for quick (four-generation) laboratory selection for Cry1Ab resistance in larvae of the sugarcane borer, thus reinforcing the risk of its fast evolution in Brazil. Cry1Ab resistance in the sugarcane borer does not appear to be associated with fitness cost, thus making the management of this resistant population more difficult.

References

- Araújo, R.A., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008a. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Bull. Entomol. Res. 98, 417-424.
- Araújo, R.A., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008b. Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. J. Stored Prod. Res. 44, 354-359.
- Arencibia, A., Vazquez, R.I, Prieto, D., Tellez, P., Carmona, E.R., Coego, A., Hernandez, L., de la Riva, G.A., Selman-Housein, G., 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. Mol. Breed. 3, 247-255.

- Bakhsh, A, Siddique, S, Husnain, T., 2011. A molecular approach to combat spatio-temporal variation in insecticidal gene (Cry1Ac) expression in cotton. *Euphytica* 183, 65–74.
- Braga, D, Arrigoni, E.B, Silva-Filho, M.C, Ulian, E.C., 2003. Expression of the Cry1Ab Protein in Genetically Modified Sugarcane for the Control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. New Seeds* 5, 209-221.
- Carrière, Y, Ellers-Kirk, C, Liu, Y.B, Sims, M.A, Patin, A.L, Dennehy, T.J., Tabashnik, B.E., 2001. Fitness costs and maternal effects associated with resistance to transgenic cotton in the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*. 94, 1571-1576.
- Carrière, Y, Crowder, D.W, Tabashnik, B.E., 2010. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. *Evolutionary Application*. 3, 561-573.
- Castro, B.A, Riley T.J, Leonard, B.R, Baldwin, J., 2004a. Borers galore: emerging pest in Louisiana corn, grain sorghum and rice. *Louisiana Agric.* 47, 4-6.
- Castro, B.A., Leonard, B.R., Riley, T.J., 2004b. Management of feeding damage and survival of southwestern corn borer and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) with *Bacillus thuringiensis* transgenic field corn. *Journal of Economic Entomology* 97, 2106-2116.
- Cousteau, C., Chevillon, C., French-Constant, R.H., 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecol. Evol.* 15, 378–383.
- Crespo, A., Spencer, T., Tan, S.Y, Siegfried, B.D., 2010. Fitness costs of Cry1Ab resistance in a field-derived strain of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 103, 1386-1393.
- Ferré, J, Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetic of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533.
- Ferreira, E., Barrigossi, J.A.F., Castro, E. da M. de., Santos, AB. dos, 2004. Perdas de produção pela broca-do-colmo (*Diatraea saccharalis* Fabr. 1794)

- (Lepidoptera: Pyralidae) em genótipos de arroz de terras altas. *Pesq. Agropec. Trop.* 34, 99-103.
- Gassmann, A.J, Carrière, Y, Tabashnik, B.T., 2009. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 147–63.
- González-Cabrera, J, García, M, Hernández-Crespo, P, Farinós, G.P, Ortego, F, Catañeda, P., 2013. Resistance to Bt maize in *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) is mediated by alteration in Cry1Ab protein activation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 635-643.
- Gould, F., Anderson. A., Reynolds, A., Bumgarner, L., Mar, W., 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88, 1545-1559.
- Guedes, R.N.C., Oliviera, E.E., Guedes, N.M.P., Ribeiro, B., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiol. Entomol.* 31, 30-38.
- Huang, F.N., 2006. Detection and monitoring of insect resistance to Bt crops. *Insect Science.* 13, 73-90.
- Huang, F.N., Leonard, B.R., Gable, R.H., 2006. Comparative susceptibility of European corn borer southwestern corn borer, and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab protein in a commercial Bt-corn hybrid. *Journal of Economic Entomology.* 99, 194-202.
- Huang, F.N., Leonard, B.R., Andow, D.A., 2007. F₂ screen for resistance to a *Bacillus thuringiensis*-maize hybrid in the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *Bulletin of Entomology. Res.* 97, 437-444.
- Huang, F., Leonard, R., Moore, S., Yue, B., Parker, R., Reagan, T., Stout, M., Cook, D., Akbar, W., Chilcutt, Ch., White, W., Lee, D., Biles, S., 2008. Geographical susceptibility of Louisiana and Texas populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein. *Crop Prot.* 27, 799-806.

- Janmmat, A.F., Myers, J., 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proc. Royal Soc. London 270, 2263–2270.
- King, E.G, Hartley, G.G., 1985. *Diatraea saccharalis*In: Singh, P., Moore, R.F. (Eds.), Handbook of Insect Rearing. Elsevier, New York, Elsevier, pp. 265-270.
- McAllister, C.D., Gravois, K., Schexnayder, K.P., Reagan, T.E., 2004. Transgenic Bt-corn affects sugarcane borer in Louisiana. Southwestern Entomology. 29, 263-269.
- Marçon, P.C.R, Young, L.J, Steffey, K.L, Siegfried, B.D., 1999. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. Journal of Economy Entomology. 92, 279-285.
- Pereira, E.J.G., Lang, B.A, Storer, N.P, Siegfried, B.D. 2008. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. Entomologia Exerimentalis et Applicatta 126, 115-121.
- Piperidis, G., Piperidis, N., D’Hont, A., 2010. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. Mol. Gen. Genom. 284, 65–73.
- Roush, R.T., McKenzie, J.A., 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annual Review of Entomology 32, 361-380.
- Robertson, J.L., Russell, R.M., Priesler, H.K., Savin, N.E., 2007. Bioassay with Arthropods, 2nd ed. CRC p Boca Raton.
- SAS Institute, 2008. SAS/STAT User`s Guide. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M., 2005. Insect-Plant Biology. University Press, Oxford.
- Székács, A., Lauber, É., Takács, E., Darvas, B., 2010. Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize. Anal. Bioanal. Chem. 396, 2203–2211.

- Tan, S.Y., Cayabyab, B.F., Alcantara, E.P., Ibrahim, Y.B., Huang, F., 2011. Comparative susceptibility of *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Crop. Prot.* 30, 1184–1189.
- Tabashnik, B.E., 1992. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamond moth (Lepidoptera: Plutellidae), Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 85, 1551-1559.
- Tabashnik, B.E., Roush, T.R., Earle, E.D., Shelton, A.M., 2000. Resistance to Bt toxins. *Science* 287, 42.
- Tabashnik, B.E.; Carrière, Y.; Dennehy, T.J., Morin, S., Sisterson, M.S., Roush, R.T., Shelton, A.M., Zhao, J-Z., 2003. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 96, 1031-1038.
- Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J., Carrière, Y., 2009. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. *J. Econ. Entomol.* 102, 2011-2025.
- Wu, X., Huang, F., Leonard, B.R., Moore, S.H., 2007. Evaluation of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn hybrids against Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 100, 1880-1886

CAPÍTULO II

Resposta imune de *Diatraea saccharalis* associada a diferentes níveis de suscetibilidade à toxina Cry1Ab

Resumo

Os insetos respondem de maneiras diversas ao ataque de patógenos. Essas respostas dependem de vários fatores, dentre eles, características herdáveis dentro das populações que conferem vantagens. A ativação do sistema imune nos insetos pode estar associada ao tipo de substância ou patógeno e ao nível de resistência da população alvo, existindo diferenças na resposta dentro de uma mesma população. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se há ligação entre o grau de suscetibilidade de duas populações de *D. saccharalis* e a ativação da resposta imune após a ingestão de concentrações letais e subletais da toxina purificada Cry1Ab, assim como observar as diferenças morfológicas nas células principais do intestino médio, principal alvo da toxina. Larvas de quarto instar foram expostas em laboratório a diferentes concentrações da toxina (CL₅; CL₅₀ e CL₉₀). Quarenta e oito horas depois as larvas foram dissecadas, extraíndo a hemolinfa para mensurar a atividade das fenoloxidasas em presença do Dihidroxifenilalanina (DOPA) contabilizar o número de hemócitos. Além disto, as mudanças morfológicas nas células do epitélio (altura). Os resultados indicaram que há diferenças na atividade das fenoloxidasas dependentes da concentração da toxina na qual as larvas foram expostas como da população testada e as diferenças morfológicas nas células do epitélio do intestino médio também dependeram de ambos os fatores. Já contrário da quantidade de hemócitos na hemolinfa que só dependeu da concentração. As duas populações de *D. saccharalis* mantidas em laboratório por várias gerações, exibiram diferenças que podem ser detectadas em laboratório e que estão associadas à resistência.

Palavras-chave: Fenoloxidasas; Intestino médio; *Bacillus thuringiensis*; Broca-da-cana.

1. Introdução

A imunidade inata se refere à defesa constitutiva desencadeada nos organismos vivos logo após a invasão de substâncias estranhas e patógenos. A resposta imune nos insetos pode ser classificada em celular e humoral (Tsakas e Marnaras, 2010) cuja principal diferença está na ativação que se dá por diferentes estímulos (Lavine e Strand, 2002). A resposta celular está associada com participação dos hemócitos, células que circulam na hemolinfa e são responsáveis pelos processos de fagocitose, encapsulação, nodulação e coagulação. Já a resposta humoral resulta na produção de proteínas (ex: fenoloxidase) e peptídeos antimicrobianos sintetizados pelo corpo gorduroso e pelos hemócitos e liberados na hemolinfa (Cytryn'skaa *et al.*, 2007; Feldhaar e Gross, 2008).

A enzima fenoloxidase é considerada um dos ativadores mais importantes da resposta imune em vários organismos, incluindo plantas e vertebrados. Também conhecida como tirosinase, é armazenada no complexo de Golgi de maneira inativa (profenoloxidase), sintetizada nos hemócitos e regulada por serino-proteases (Soderhall *et al.*, 1994). Precursores de fenoloxidase (profenoloxidase) podem ser secretados pelos hemócitos ou circular livremente na hemolinfa, antes de serem ativados por serino proteases (Beckage, 2006). Em Lepidoptera a ativação da profenoloxidase se dá pela ação de glicoproteínas do tipo imunolectinas, importantes moléculas de reconhecimento de açúcares, e uma vez ativada transforma a tirosina em dihidroxifenilalanina (DOPA) que por sua vez é oxidada a quinona-DOPA pela ação da difenoloxidase para finalmente formar melanina (Tsakas e Marmaras, 2010), polímero associado à nodulação e encapsulação (Nappi e Vass, 1993). Em lepidópteros um dos sítios de síntese da profenoloxidase são os oenocitoides (Jiang *et al.*, 1997).

A resistência a Bt em alguns insetos está associada com aumento na resposta imune e tal característica pode ser herdável e cuja magnitude é

determinada por mais de um gene (Rahman *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005b). O sistema imune dos lepidópteros pode ser ativado inclusive após a ingestão de doses subletais de formulados a base de *Bacillus thuringiensis*, provavelmente devido ao dano ocasionado no intestino médio. Esses danos ocorrem no nível celular, expondo a hemolinfa e hemócitos a ativadores da resposta imune (Ma *et al.*, 2000), que reagem de maneira a inativar tanto toxinas quanto esporos do patógeno (Rahman *et al.*, 2004).

Em larvas de Lepidoptera ocorre o aumento da atividade da fenoloxidase de acordo com o aumento do nível de resistência da larva a toxinas *Bt* (Ma *et al.*, 2005; Ericsson, 2009). Em *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) a atividade da enzima (492nm) foi maior em larvas resistentes a *Bt* tratadas com *B. thuringiensis kurstaki* (Dipel®) comparadas com larvas suscetíveis (Ericsson *et al.*, 2009). Em *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) a taxa de melanização de larvas resistentes após a ingestão de doses subletais da toxina Cry1Ac foi maior do que nas suscetíveis (Ma *et al.*, 2005). A resposta celular também exhibe diferenças, dependendo da espécie e da dose subministrada. Por exemplo, em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) houve aumento na atividade fagocítica e no encapsulamento em decorrência da ingestão de quantidades subletais de *Btk* (Dubovskiy *et al.*, 2008).

No intestino médio o alvo principal das toxinas Cry são as células principais especificamente os receptores localizados nas microvilosidades da membrana apical. Contudo muitas das células apresentam alta capacidade regenerativa dependendo da dose ou concentração subministrada (Chapman, 2008). Minutos após a ingestão de doses subletais de toxinas Cry injúrias nas células do intestino médio podem ser observadas. Em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) as toxinas inseticidas Cry1C e Cry1D promoveram alterações no epitélio intestinal nos primeiros 15 minutos após a exposição; uma hora depois o citoplasma das células principais estava vacuolizado e a borda em escova destruída. Duas horas depois da exposição, houve lise celular (Aranda *et al.*, 1996). Em alguns casos, as larvas são expostas a doses subletais de toxinas Cry, sendo que o dano às células principais é reparado e há recuperação do tecido epitelial permitindo a continuação do processo de alimentação e digestão (Spies e Spence 1985).

A broca-da-cana *Diatraea saccharalis* pode exibir diferentes níveis de suscetibilidade à toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* (*Bt*). Essa variação foi estudada em laboratório usando populações oriundas de diversos locais do Brasil. Em alguns indivíduos acontecem mudanças na conformação dos receptores e a diminuição da interação da toxina com o receptor intestinal. Além disso, outros mecanismos bioquímicos podem estar envolvidos direta ou indiretamente no aparecimento da resistência, tais como: (1) falha na clivagem da toxina por proteases intestinais; (2) inativação da toxina por esterases; (3) diferença no perfil proteico (Tabashnik, 1994) e/ou mecanismos envolvidos com a ativação da resposta imune após ruptura de células pela toxina e (4) regeneração celular (Griffitts e Aroian, 2005), dentre outros.

A maioria dos estudos associados à resistência de Lepidoptera às toxinas Cry são principalmente focados nas alterações nos receptores do intestino médio, na inativação de proteases secretadas, e mais recentemente no efeito de doses subletais na ativação do sistema imune do inseto em populações naturais com altos níveis de suscetibilidade ou resistência ou selecionadas em condições de laboratório para toxinas Cry, mas não em populações naturais na ausência de pressão de seleção. Nesses casos, espera-se que haja diferenças na ativação da resposta imune em decorrência da ingestão da toxina. O objetivo do estudo foi investigar o efeito da toxina Cry1Ab no intestino médio de larvas de *D. saccharalis* e na resposta imune de diferentes populações com níveis de suscetibilidade variados, expostas a concentrações letais e subletais da toxina Cry1Ab.

2. Material e métodos

2.1 Coleta da hemolinfa e do intestino médio

Larvas farato de quarto instar de duas populações coletadas em campo, diferentes quanto à suscetibilidade à toxina Cry1Ab, Campo novo de Parecis (MT), considerada resistente e São Paulo (SP) considerada como suscetível. Indivíduos de ambas as populações foram mantidas em laboratório (27°C;

14:10) em dieta artificial (King e Hartley, 1985) e foram retiradas do alimento antes de serem expostas à toxina Cry1Ab. Para cada população testada três concentrações da toxina Cry1Ab estimadas previamente em laboratório foram solubilizadas em dispersante não-iônico Triton x-100 (1%) e ministradas para cada população (CL₅, CL₅₀ e CL₉₀) (Tabela 1).

As CL₅, CL₅₀ e CL₉₀ para cada população foram 0.013, 0.8 e 5 ng/cm², na população suscetível (SP) e na resistente (MT) 2, 10 e 100 ng/cm² respectivamente. Trinta µl de cada concentração foram espalhados na superfície da dieta depositada previamente em bandejas de 128 células (C-D International, New Jersey, EUA) usadas para bioensaio, duas horas antes das larvas serem expostas, tempo suficiente para a superfície secar. Uma vez seca e endurecida, o substrato foi tratado com 30 µl de cada concentração/célula preparadas a partir do estoque original da toxina (0.4303 µg/µl), a qual foi produzida em cepas bacterianas de *Escherichia coli* e solubilizada em tampão Bicarbonato de Sódio: Carbonato de Sódio 0.1 M (pH 10.4) a temperatura ambiente.

As bandejas foram mantidas em sala climatizada (27°C) durante 48 horas em completa escuridão. Após esse tempo as larvas que sobreviveram e que tinham se alimentado foram colocadas dentro de microtubos de centrifuga e refrigeradas em gelo por cinco minutos, desinfetadas em etanol 70% (5 min) e lavadas duas vezes em tampão fosfato- PBS (0,1 M de fosfato de sódio, pH 7,6; 0,9% (p/v) de NaCl) antes da retirada a hemolinfa.

O controle esteve representado pela dieta artificial tratada com 30 µL de Triton-100X (0,1%). Um grupo de sete a oito larvas escolhidas aleatoriamente foram dissecadas para cada concentração utilizada. As pseudopernas anteriores foram retiradas com uma mini-tesoura para permitir a saída da hemolinfa e coleta desta. Com o auxílio de uma micropipeta (P-1000 µL) foram coletados 80 µL de hemolinfa por indivíduo e imediatamente transferidos para microtubos de centrifuga, previamente siliconizados com Sigmacote® (Sigma-Aldrich) para diminuir a adesão das células ao tubo. As amostras de hemolinfa foram diluídas em 240 µl de PBS (1:3) e o tubo foi armazenado a -80°C para conservação da amostra e destruição total dos hemócitos até serem analisadas.

Tabela 1. Razão de resistência (RR_{50}) e concentrações letais de Cry1Ab estimadas em larvas neonatas de *D. saccharalis* oriundas de duas populações, uma população suscetível (SP) e outra resistente (MT).

População	N	Inclinação (+/- EP)	CL ₅₀ ng/cm ² (IC ₉₅)	CL ₉₀ ng/cm ² (IC ₉₅)	X ²	P	RR ₅₀ (IC ₉₅)
São Paulo (SP)	512	1.20(0.28)	0.32(0.03-0.81)	3.69(2.01-5.81)	8.04	0.15	1.00 (0.15-6.69)
Campo novo (MT)	496	1.29 (0.14)	7.60 (5.48-10.02)	74.54 (50.38-129.98)	7.43	0.19	23.99 (6.06-94.90)

2.2 Atividade das fenoloxidasas

A atividade das fenoloxidasas foi medida na hemolinfa armazenada e determinada em espectrofotômetro de absorvância em microplacas (Thermo Scientific Multiskan GO) com o programa computacional Skanit 3.2 (Thermo Scientific). Para cada concentração de toxina foram consideradas três repetições independentes por população, sendo cada uma correspondente à hemolinfa de um grupo de seis a sete larvas. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5418R) a 16000 G por quatro minutos (4°C) para remoção total dos hemócitos, *debris* celulares e separação do *pellet*. Com o auxílio de uma micropipeta (p-200) foram coletados 50 µl de sobrenadante por amostra e transferidos para microplacas de fundo chato (96 células), usadas nos testes de ELISA. A placa foi refrigerada até o momento da adição do substrato L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina, 100 µl) por amostra. Para o controle foram adicionados 50 µl de PBS aos 100 µl de DOPA. As leituras foram realizadas durante 90 minutos com intervalos de dois minutos, no comprimento de onda 492 nm e à temperatura ambiente (25°C) de acordo com o próprio protocolo do software Skanit 3.2 para determinação da cinética de proteínas. A atividade foi expressa em variação de unidades de absorvância lidas a 492 nm, por minuto por mg de proteína.

A concentração das proteínas foi determinada através de teste colorimétrico, utilizando-se de produto comercial (Coomassie Brilliant Blue BG-250), baseado no teste de Bradford (1976). As amostras (10 µl) foram misturadas a 300 µl do reagente, agitadas em vórtex e a absorvância lida a 595 nm. Albumina de soro bovino foi utilizada para a determinação da curva padrão. A partir dos valores obtidos foi calculada a quantidade de proteína por amostra por cada leitura (Δ Absorvância/tempo) por meio da equação da curva padrão. Com os dados da quantidade total de proteínas na hemolinfa por população foi traçada a reta de melhor ajuste dos dados por meio de regressão linear (PROC GLM, SAS 9.1, SAS System, 2001). Já os dados da atividade das fenoloxidasas foram submetidos à análise de covariância e traçada a reta de

melhor ajuste dos dados por meio de regressão linear (PROC GLM, SAS 9.1, SAS System, 2001).

2.3 Contagem total de hemócitos

A quantificação dos hemócitos totais foi feita em larvas de ambas as populações alimentadas em dietas artificiais, tratada e não tratada como descrito no item 2.1. A coleta da hemolinfa foi feita individualmente para cada larva, retirando uma das pseudopernas anteriores com o auxílio de mini-tesoura, coletando-se 10 µl de hemolinfa com uma pipeta de deslocamento de ar (P-200) e misturando-os em um tubo de centrifuga, previamente siliconado (Sigmacote®) com 20 µl de solução anticoagulante refrigerada (pH 4.5) (Mead *et al.*, 1986). Após homogeneizar a solução, 20 µl dela foram depositados em câmara de Neubauer aprimorada e cobertos com uma lamínula. A contagem total dos hemócitos foi feita com o auxílio de um contador manual. Para cada concentração foram consideradas 10 larvas, perfazendo ao todo 40 larvas por população. Os dados resultantes foram submetidos à análise de covariância e traçada a reta de melhor ajuste dos dados por meio de regressão linear (PROC GLM, SAS 9.1, SAS System, 2001).

2.4 Alterações das células principais no intestino médio

As mudanças no epitélio intestinal após a ingestão da toxina Cry1Ab nas diferentes concentrações foi realizada por meio da medição da espessura das células principais do intestino médio 24 horas após a exposição. Das mesmas larvas em que foi retirada a hemolinfa (itens 2.2 e 2.3), foram retirados os intestinos na presença de PBS 0.1M (pH 7.6). Com o auxílio da mini-tesoura e de uma pinça foi retirada a cabeça e o tórax da larva e a parte posterior do abdome e o intestino médio foi dissecado por inteiro e colocado em solução fixadora Stefanini-Zamboni, pH 7.3 (Zamboni *et al.*, 1967) e armazenados a 4°C. Os intestinos foram lavados três vezes em PBS e em seguida desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 95 %), por

cinco minutos para cada concentração e depois pré-infiltrados em etanol 95%/historesina Leica® (1:1) por cinco minutos. Após esse tempo, os intestinos foram embebidos em historesina pura por 24 horas. Os intestinos foram transferidos para moldes plásticos (um por molde) e embebidos com historesina misturada ao endurecedor. A polimerização da historesina foi feita num dissecador sob vácuo. Os blocos de resina polimerizada foram seccionados (quatro μm) com auxílio de micrótomo rotativo (Leica RM2255). Secções foram coradas com Hematoxilina-Eosina (8:0.5 min) e após a secagem, foram montados em meio de montagem Eukitt® (Fluka). As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de luz (Zeiss-Primo Star) com câmera digital acoplada (Zeiss AxioCam ERc5s). As imagens foram salvas com o auxílio do software Axiovision 2010 (versão 4.8.12). A mensuração da altura das células principais do epitélio digestivo foi feita com o auxílio do programa Image Pro Plus (Versão 6.0). Os dados foram submetidos à análise de covariância, complementados com regressão linear, quando pertinente (PROC GLM, SAS 9.1, SAS System, 2001).

3. Resultados

3.1. Atividade das fenoloxidasas

A quantidade de proteína total na hemolinfa das larvas diferiu entre as populações, na população suscetível não houve diferenças significativas ($F_{1,11}= 0.699$; $P= 0.42$), diferente da população resistente ($F_{1,11}= 11.62$; $P= 0.007$), onde a quantidade de proteína foi diminuindo à medida que a concentração aumentava (Figura 1).

Em ambas as populações, e para todas as concentrações de Cry1Ab testadas em *D. saccharalis*, as profenoloxidasas reagiram positivamente à presença do substrato L-DOPA observado pelo aumento da absorbância ao longo do tempo, o que significa ativação da profenoloxidase e maior quantidade de melanina produzida no final da reação (Figura 2). A atividade das fenoloxidasas na hemolinfa das larvas em ambas as populações, diminuiu à medida que as concentrações da toxina Cry1Ab aumentaram

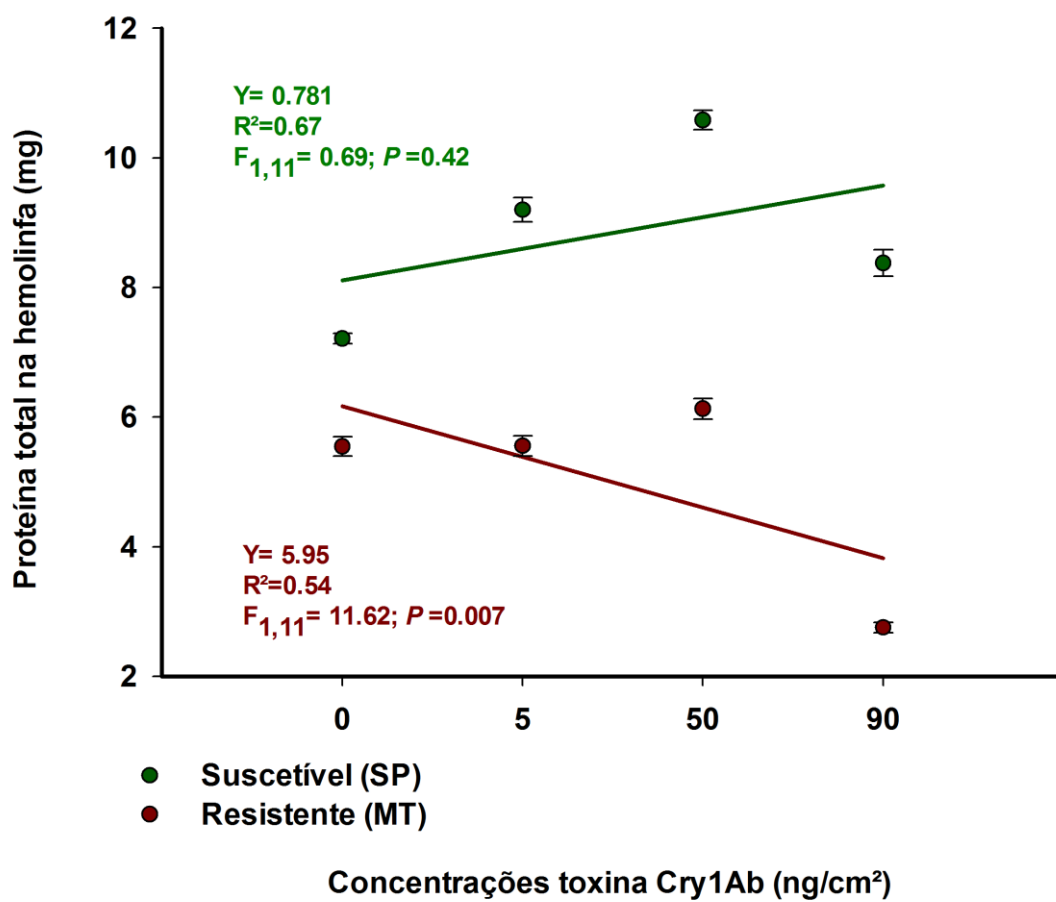


Figura 1. Quantidade da proteína total (mg) na hemolinfa de larvas de quarto instar de *D. saccharalis* de uma população suscetível (SP) e outra resistente (MT), expostas a diferentes concentrações da toxina Cry1Ab (absorbância a 595nm).

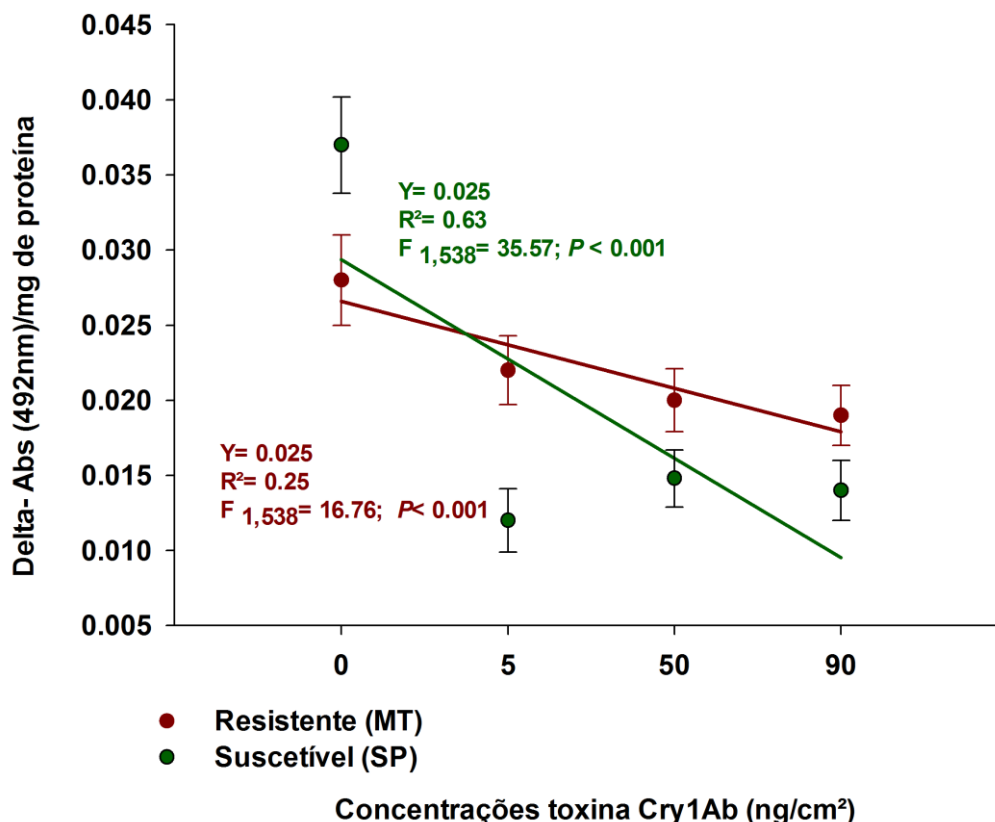


Figura 2. Atividade das fenoloxidas na hemolinfa de larvas de quarto instar de *D. saccharalis* de uma população suscetível (SP) e outra resistente (MT), expostas a diferentes concentrações da toxina Cry1Ab.

3.2 Contagem total de hemócitos

O número total de hemócitos foi diferente entre as concentrações de toxina ($F_{1,76}=4.16; P=0.001$), mas não entre as populações de *D. saccharalis* ($P=0.98$) (Figura 3). Embora as populações exibissem níveis de suscetibilidade diferentes à toxina Cry1Ab, o número de hemócitos não foi refletivo no grau resistência entre elas, embora alguns autores tenham associado o aumento do número de hemócitos em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes ao vírus da poliedrose nuclear (AgMNPV) (Abot *et al.*, 1996; Negreiro *et al.*, 2009). As concentrações de Cry1Ab acima de 10 ng/cm² estimularam o aumento de hemócitos na hemolinfa em larvas de quarto instar para ambas as populações. O aumento do número de hemócitos após a

ingestão de baixas concentrações de Cry1Ab foi baixo não apresentou diferenças significativas em relação a testemunha (Figura 3).

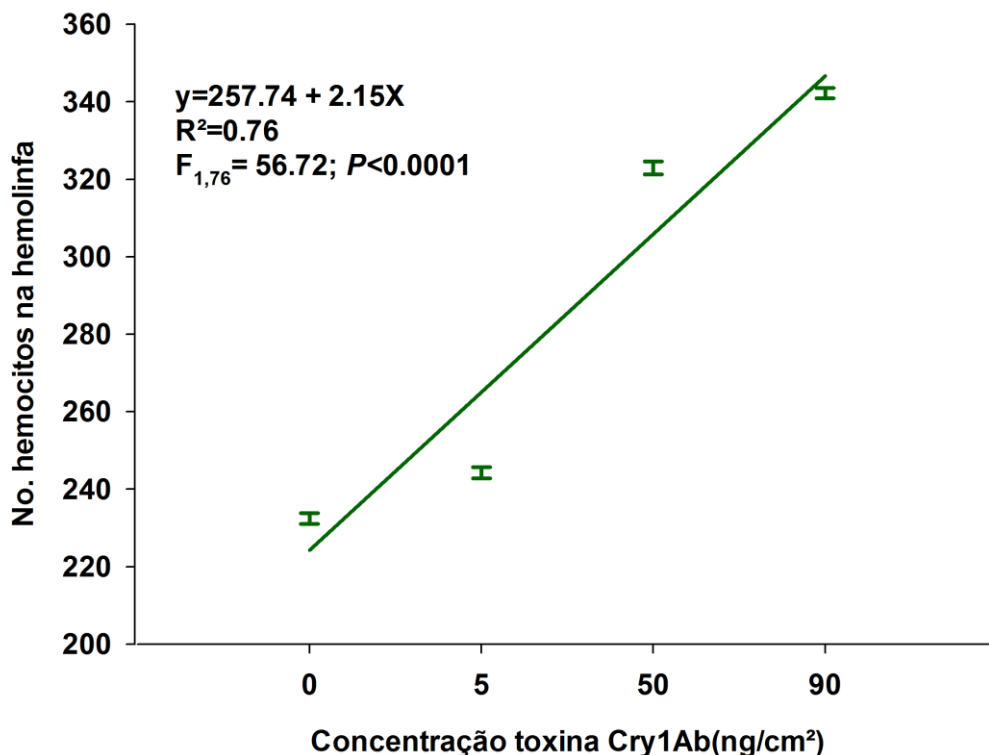


Figura 3. Número de hemócitos de larvas de quarto instar de *D. saccharalis* de uma população suscetível (SP) e outra resistente (MT), expostas a diferentes concentrações da toxina Cry1Ab.

3.3 Alterações das células principais no intestino médio

A altura (μm) das células principais do intestino médio diferiu entre as duas populações quando expostas as diferentes concentrações da toxina Cry1Ab ($F=13.81$; $P<0.0001$) (Figura 4). Nas larvas da população mais resistente as células foram menores e mais conservadas apesar do aumento da concentração da toxina. Em ambas as populações observaram-se diminuição na secreção apócrina das células à medida que a concentração aumentou. Nas larvas suscetíveis a altura das células aumentou com a concentração da toxina (Figura 5).

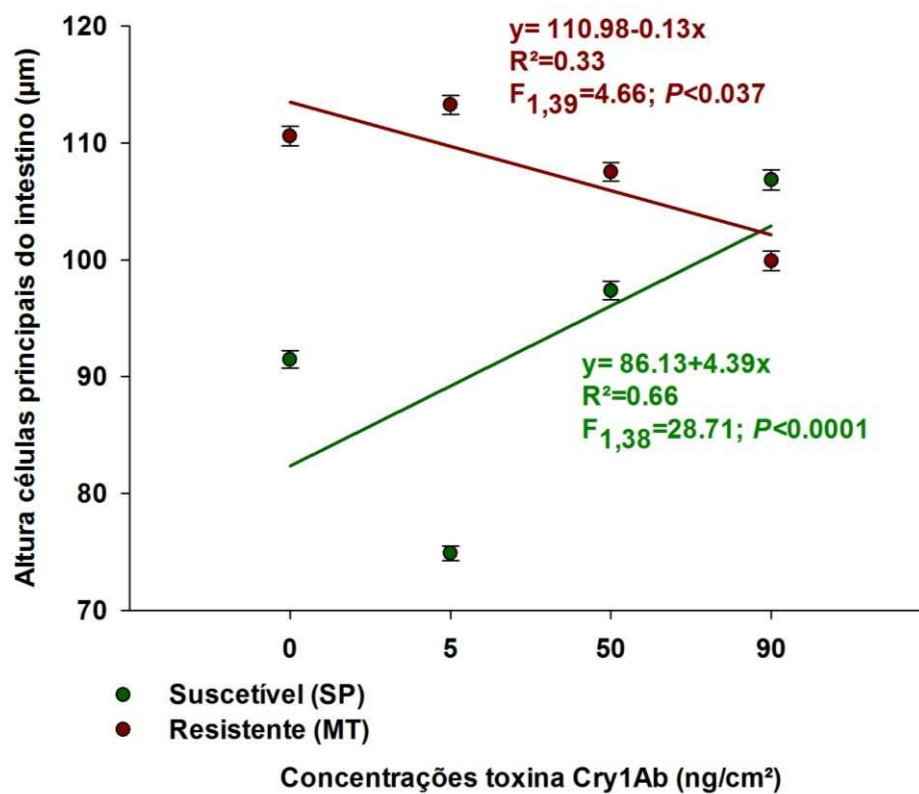


Figura 4. Altura das células principais do intestino médio de larvas de quarto instar de *D. saccharalis* de uma população suscetível (SP) e outra resistente (MT), expostas a diferentes concentrações da toxina Cry1Ab.

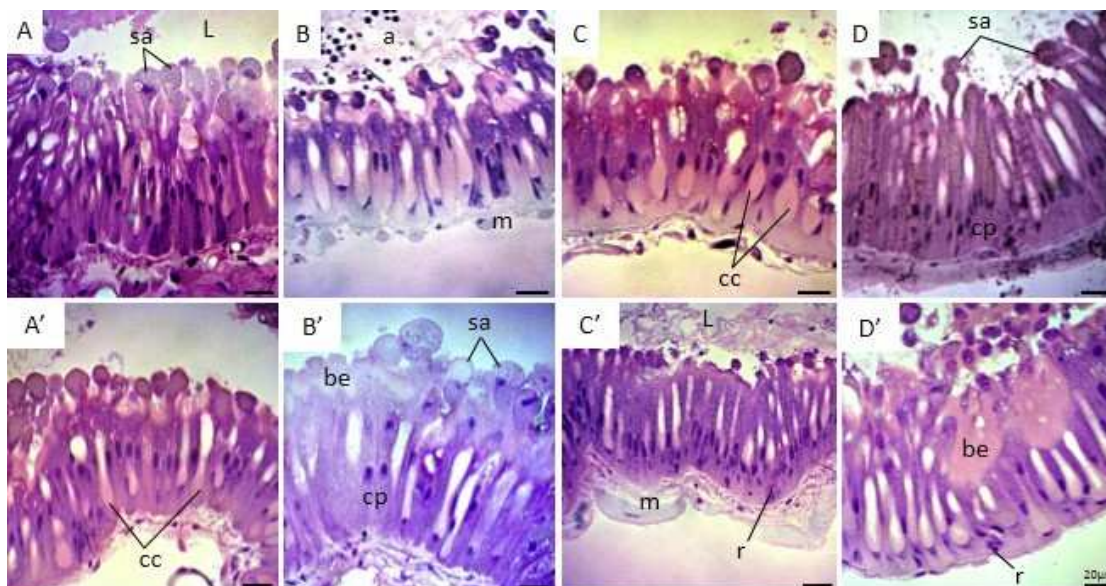


Figura 5. Visão geral do epitélio do intestino médio de *D. saccharalis* de quarto instar de duas populações com diferentes níveis de susceptibilidade à toxina Cry1Ab. Na parte superior as imagens correspondem à população SP (susceptível). A figura A mostra o epitélio da testemunha. As figuras B-D mostram epitélios de larvas tratadas com CL₅, CL₅₀ e CL₉₀, respectivamente. As figuras A'-D' mostram epitélios correspondentes da população MT (resistente). a- bolo alimentar; be- borda em escova; cc- célula caliciforme; cp- célula principal; L- lúmen; m- músculo visceral; r- ninhos de células regenerativas; sa- secreção apócrina.

4 Discussão

No presente trabalho foi comparada a resposta imune da broca-da-cana, *D. saccharalis* submetidas a concentrações crescentes da pró-toxina Cry1Ab de duas populações com diferentes níveis de suscetibilidade à mesma. Cada uma apresentou diferentes níveis de suscetibilidade, a MT, foi 24 vezes mais resistente à toxina Cry1Ab do que a população usada como referência em suscetibilidade, a SP. Larvas de quarto instar da espécie foram submetidas a concentrações subletais e letais da pró-toxina Cry1Ab estimadas em larvas neonatas da espécie.

De maneira geral, o aumento na taxa de atividade das fenoloxidasas está associado à resistência a toxinas Cry (Ma *et al.*, 2005a); mas ao contrário disso, as populações testadas não seguiram esse de padrão, em ambas a atividade da enzima diminuiu ao passar do tempo em todas as concentrações, possivelmente devido à ingestão com a toxina Cry1Ab. Essa falta de diferença

entre as populações MT e SP possivelmente se deve à diferença nos níveis de resistência entre as populações a qual não foi suficiente para ser detectada e associada à ativação diferencial das fenoloxidasas. O fato de serem populações oriundas de campo, e ainda que tenham permanecido por várias gerações no laboratório, manifestam variações em suscetibilidade, mas ainda insuficientes para detectar mudanças entre as populações que passam por longos processos de pressão seleção para resistência à Cry1Ab em laboratório ou com níveis elevados de resistência nas quais espera-se menor variabilidade genética dentro das populações e entre indivíduos.

Diversos são os fatores associados à resistência de insetos a toxinas Bt. Algumas espécies de lepidópteros apresentam redução na atividade das serino proteases, enzimas importantes na ativação das fenoloxidasas, quando expostas a concentrações subletais das toxinas Cry em geral (Soderhall *et al.*, 1994; Griffiths e Aroian, 2005). Essa redução se deve ao aumento na taxa de transcrição de inibidores após a intoxicação, bloqueando a ação de serino proteases (Soderhall *et al.*, 1994; Muenier *et al.*, 2006). Nos casos de resistência a toxinas Cry, acredita-se que a inativação das serino proteases seja um mecanismo adicional associado à redução da ativação das toxinas Bt no lúmen intestinal (Muenier *et al.*, 2006). A presença da forma inativa das fenoloxidasas na hemolinfa dos insetos, a pro-fenoloxidase, se deve principalmente à lise dos hemócitos, principal local de estocagem da pro-enzima, em resposta à interação com patógenos ou toxinas como no caso de Bt (Nielsen-LeRoux *et al.*, 2012).

Na medida em que a concentração da toxina Cry1Ab aumentou o número de hemócitos não foi afetado nas duas populações estudadas (SP e MT). Contudo existam relatos em lepidópteros, sobre as diferenças na quantidade de hemócitos após a exposição a toxinas Cry entre populações resistentes e suscetíveis, maior e menor respectivamente (Ericsson *et al.*, 2009).

Tanto a atividade de fenoloxidase quanto quantidade de hemócitos em resposta à intoxicação com toxinas Cry dependem dentre outros fatores, da espécie de inseto, do estágio de desenvolvimento, nível de resistência e da concentração da toxina à qual os insetos foram expostos (Ma *et al.*, 2005b;

Valdez-Lira *et al.*, 2011). No presente estudo, os resultados obtidos nas duas populações de *D. saccharalis*, ambas as respostas dependeram principalmente das concentrações testadas, cuja toxicidade foi estimada em larvas neonatas, o que pode gerar diferenças na ativação das fenoloxidasas e na quantidade de hemócitos após a intoxicação (Bravo *et al.*, 2011) sendo mais suscetíveis quando a ativação das fenoloxidasas é menor.

A altura das células digestivas foi maior na população suscetível (SP) à Cry1Ab. Isso possivelmente ocorre devido ao estímulo provocado pela ingestão de pequenas concentrações que ativam a reposição celular do intestino médio (Loeb *et al.*, 2001). Nas larvas resistentes (MT) de *D. saccharalis* aconteceu o contrário, provavelmente, o estímulo pela ligação da toxina foi menor devido às mudanças na ativação da toxina no lúmen intestinal ou nos receptores localizados na borda em escova.

Em conclusão, o efeito da toxina Cry1Ab esteve associado à diminuição da atividade das fenoloxidasas sugerindo algum tipo de inibição ou bloqueio do sistema imune. Já as diferenças contrastantes entre ambas as populações testadas e concentrações da toxina Cry1Ab em ambas as populações após a ingestão da toxina sugere diferenças na resistência de cada população que não foram detectadas nos parâmetros associados à resposta imune, possivelmente mais uma ferramenta a nível celular para auxiliar na detecção da resistência a toxinas *Bt*.

5. Referências

- Abot, A.R; Moscardi, F; Fuxa, J.R; Sosa-Gómez, D.R Richter, A.R. 1996. Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biological control*, 9:126-130.
- Aranda, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Guereca, L., Bravo, A., 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut

- epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68, 203–212.
- Beckage, N.E. 2006. Insect Immunology, p. 243-270. In T.D. Schowalter (ed.), *Insect Ecology: An Ecosystem Approach*. Academic Press, 572 p.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding *Analytical Biochemistry*, 72 : 248–254.
- Bravo, A; Likitvivatanavong, S; Gill, S.S; Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 423-431.
- Chapman, R.F. 1998. *The insects: Structure and function*, 4 ed, 720p.
- Cytryn'skaa, M; Makb, P; Zdybicka-Barabas , A; Suder, P; Jakubowicz, T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, 28: 533–546.
- Dubovskiy, I.M.; Krukova, N.A.; Glupov, V.V., 2008. Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98,360–362.
- Ericsson, J; Janmaat, A.F; Lowenberger, C; Myers, J. 2009. Is decreased generalized immunity a cost of *Bt* resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(2): 61-67.
- Griffitts JS, Aroian RV. 2005 Many roads to resistance: How invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays*, 27: 614–624.
- Feldhaar, H; Gross, R. 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infections*, 10: 1082-1088.

- Ha, E-M; Oh, C.T; Ryu, J.H; Bae, Y.S; Kang, S.W; Jang, I.H; Brey, P.T; Lee, W.J. 2005. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 8: 125-132.
- Jiang, H; Wang, Y. C; Kanost, M.R. 1997. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 835–850.
- Kanost, M.R; Gorman, M.G. 2008. Phenoloxidases in insect immunity. Em: *Insect Immunology* (N. Beckage, ed.) Academic Press/Elsevier, San Diego, pp. 69-96.
- King, E.G, Hartley, G.G., 1985. *Diatraea saccharalis*. Em: Singh, P., Moore, R.F. (Eds.), *Handbook of Insect Rearing*. Elsevier, New York, Elsevier, pp. 265-270.
- Lavine, M.D; Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and molecular biology*, 32: 1295-1309.
- Loeb, M; Martin, P.A.W; Hakim, R.S; Goto, Sh; Takeda, m. 2001. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Physiology*, 47:599-606.
- Mead, G.; Ratcliffe, N; Renwanz, L.R. 1986. The separation of insects haemocytes on percoll gradients; methodology and problems. *Journal of insect physiology*, 32(2): 167-177.
- Ma, C.C; Kanost, M.R. 2000. A beta 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganism and activates the phenoloxidase cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 7505-7514.
- Ma, G; Roberts, H; Sarjan, M; Featherstone, N; Lahnstein, J; Akhurst, R; Schmidt, O. 2005a. Is the mature endotoxin Cry1Ab from *Bacillus thuringiensis* inactivated by coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 729-739.

- Ma, G; Srajan. M; Preston. Ch; Asgari, S; Schmidt, O. 2005b. Mechanism of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates. *Insect Science*, 12: 319-300.
- Muenier, L; Préfontaine, G; Munster, M.V; Brousseau, R; Masson, L. 2006. Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Molecular Biology*, 15(4): 475–483.
- Nappi, A. J; Vass, E. 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research*, 6: 117–126.
- Negreiros, M.C.C; Carvalho, R.B.R; Andrade. F. G; Levy, Sh. M; Moscardi, F; Falleiros , A.M.F. 2009. Caracterização citológica dos hemócitos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: noctuidae) em larvas resistentes ao vírus AgMNPV. *Iheringia, Série Zoológica* 99(1): 66-70.
- Nielsen-LeRoux' C; Gaudriault, S; Ramarao, N; Lereclus D; Givaudan, A. 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus / Photorhabdus* occupy their hosts. *Ecology and industrial microbiology/Special section: Microbial proteomics*,15(3):220–231
- Rahman, M.M; Roberts, H.L.S; Sarjan, M; Asgari, S; Schmidt, O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proceedings of National Academic Sciences (EUA)*, 101: 1696-2699.
- Soderhall, K., Cerenius, L. and Johansson, M.W. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Annals of New York Academy of Science*, 712: 155–161.
- Spies, A.G; Spence, K.D.1985. Effect of a sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca sexta*: a SEM study. *Tissue and Cell*, 17:379-394.

- Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Tsakas, S; Marmaras, V.J. 2010. Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate survival journal*, 7: 228-238.
- Tzou, P; Ohresser, S; Ferrandon, D; Capovilla, M; Reichhart, J.M; Lemaitre, B; Hoffmann, JA; Imler, J.L. 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity*, 13: 737-748
- Valdez-Lira, J.A; Alcocer-Gonzalez, J.M; Damas, G; Nuñez-Mejia, G; Oppert, B; Rodriguez-Padilla, C; Tamez-Guerra, P. 2011. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran pest after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Science*, 12(80): 1-8.
- Zamboni, M, Martino, D.C; Stefanini, L. 1967. Fixation of ejaculated permatzoa for electron microscopy. *Nature*, 216: 173-174.

CAPÍTULO III

Resistência de cana-de-açúcar e ataque de *Diatraea saccharalis*

Resumo

A resistência varietal em cana-de-açúcar é uma importante ferramenta a ser usada no controle da broca-da-cana, porém o hábito alimentar endofítico de suas larvas dificulta as observações comportamentais, fazendo com que a maioria dos estudos estejam focado na resposta da planta ao ataque, havendo poucos trabalhos que considerem a interação inseto-planta. Neste estudo, o ataque da broca em dois genótipos de cana-de-açúcar, um resistente e um suscetível reconhecidos em campo pelas diferenças na incidência e ataque do inseto, foi avaliado. Larvas de primeiro instar provenientes de criação em laboratório foram usadas na condução dos experimentos. A avaliação comportamental foi feita tanto externa (folha) como internamente (colmos). A análise comportamental externa foi feita com observações diretas de 20 larvas em 20 plantas de cada variedade. Os parâmetros avaliados foram colonização (folhas), consumo interno dos colmos e interação entre as larvas dentro do colmo; para tal foram feitas infestações artificiais de três densidades larvas (5, 10 e 15 larvas/planta) foram feitas por variedade, perfazendo 30 repetições. As observações externas foram registradas no programa computacional JWatcher 1.0; já os parâmetros internos consumo da área e interações entre as larvas, foram observados como auxílio de aparelho de Raio X, acoplado ao programa computacional Faxitron®. Os resultados obtidos demonstraram que para todos os parâmetros houve diferenças entre as variedades ao longo do tempo. Nas observações internas o comportamento das larvas também foi diferente, a área consumida e as interações entre as larvas. Os resultados das observações demonstram que estudos comportamentais dos insetos permitem explorar mais uma ferramenta de caracterização da resistência em genótipos diferentes a partir das interações do inseto com a planta.

Palavras-chave: Comportamento, Raio X, broca-da-cana, interação larval, consumo alimentar.

1. Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é umas das principais culturas do Brasil constituindo-o como maior produtor de açúcar em nível mundial e em segundo lugar na produção de etanol. Segundo a União da Indústria da Cana-de-açúcar (UNICA⁴), a participação da cana-de-açúcar no PIB nacional no ano de 2012, foi de 2% e de 31% no PIB da agricultura no Brasil. A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no século XVI (Prado, 1970) e vem sendo melhorada ao longo do tempo, visando aumentar a produção de açúcar e mais recentemente de álcool, assim como selecionar características na planta que confirmam resistência a pragas, doenças e fatores abióticos como estresse hídrico (Biscoff *et al.*, 2009).

No que diz a respeito ao manejo de pragas, muitos estudos têm sido conduzidos com o intuito de controlar e diminuir o ataque da principal praga da cultura, a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). O principal foco tem sido o uso do controle biológico e manejo da espécie a partir da resistência varietal, sendo esta última uma alternativa ainda pouco adotada na maioria das regiões produtoras de cana de açúcar. Apesar do tempo investido, são poucas informações sobre a biologia, comportamento, interação inseto-planta, assim como identificação das características nas plantas que conferem resistência ao ataque da broca, havendo divergências entre os resultados obtidos por alguns pesquisadores (Sosa, 1988; Boiça Jr. *et al.*, 1997; White *et al.*, 2006; Silva, 2009; Dinardo-Miranda *et al.*, 2012). A adoção de outro tipo de alternativa como o uso de inseticidas é difícil, principalmente devido ao hábito e localização das larvas uma vez que penetram o colmo, além da necessidade de preservar os parasitoides da espécie *Cotesia flavipes*

⁴ www.unica.com.br

(Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), parasitóide de lagartas introduzido no Brasil na década dos anos 70 (Mendonça *et al.*, 1977) e o *Trichogramma galloi* (Zucchi) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), originário do Brasil e eficiente no controle de ovos da broca-da-cana.

Dentre os parâmetros utilizados experimentalmente para detectar resistência varietal na cana-de-açúcar ao ataque da broca, o mais usado é a contagem direta do número de colmos broqueados ou o número de colmos com furos de saída são usados para estimar o número total de adultos (Marques *et al.*, 2004). Em outros os casos são utilizadas escalas de dano e quantificação do número de larvas recuperadas após infestações artificiais, para estimar as perdas ocasionadas pelo inseto em uma determinada variedade (Bessin *et al.*, 1990; White, 1993). Porém esse tipo de estimativa é impreciso, pois há grande influência de fatores bióticos e abióticos que também participam na regulação populacional do inseto afetando a resposta final, refletida no dano ocasionado à planta, além do tempo necessário para obter a resposta. Portanto, há necessidade de buscar parâmetros e metodologias de fácil manipulação e que permitam chegar a resultados claros e rápidos.

A utilização de características comportamentais oriundas da interação inseto-planta é pouco explorada. Variáveis como comportamento do inseto em resposta ao hospedeiro, o consumo alimentar e a interação larval dentro da planta esclarecem aspectos biológicos da espécie e possibilitam caracterizar fenotipicamente variedades a partir da interação inseto-planta. Contudo, devido principalmente ao hábito alimentar das larvas de *D. saccharalis* esses parâmetros são difíceis de mensurar, tornando um desafio o desenvolvimento de metodologias e ferramentas a serem usadas para isto. A nossa hipótese é que há variações no consumo alimentar e no comportamento da broca-da-cana, antes e depois da penetração no colmo, em decorrência da variedade de cana à qual a larva é exposta e da densidade larval.

O objetivo deste trabalho foi testar se o comportamento de larvas neonatas de *D. saccharalis*, a interação larval e a área interna consumida, são influenciados por genótipos resistente de cana-de-açúcar e suscetível ao ataque do inseto.

2. Material e Métodos

2.1 Criação do inseto

Indivíduos oriundos de diversos laboratórios do país foram mantidos em sala climatizada [27°C, U.R ± 60% 14:10 (L:E)]. As larvas foram obtidas da criação artificial, a partir de ovos oriundos de adultos acasalados em laboratório que durante a fase imatura foram criados em dieta artificial de King e Hartley (1985) dentro de potes de vidro de 500 ml com tampa furada e protegida com um círculo de tecido metálico fino que facilitou a troca gasosa.

2.2 Manutenção das plantas

Gemas de duas variedades de cana-de-açúcar coletadas no banco de germoplasma do programa de melhoramento genético da UFV (CECA Oratórios-MG) foram plantadas e mantidas em casa de vegetação. As variedades escolhidas foram a SP-891115, variedade com alto teor de sacarose considerada suscetível ao ataque da broca, e a variedade RB-835486 também com alto teor de sacarose, mas resistente ao ataque da broca, segundo o histórico de observações do ataque do inseto em campo feitas durante vários anos. Em bandejas plásticas com pequenos furos no fundo, foram plantadas as gemas utilizando como substrato Tropstrato®. Após sete dias as gemas já em brotação foram adubadas com super simples (20% P₂O₅, 28% CaO, 12% S) (20 g/L em água), sulfato de amônia (20 g/L) e cloreto de potássio (18 g/L) e mantidas em casa de vegetação com sistema de irrigação acoplado. Passados 30 dias estas foram transferidas e individualizadas em copos plásticos (300 ml) e mantidas em casa de vegetação até a formação de cinco folhas completamente expandidas (45 dias após a emergência), momento em que foram iniciados os experimentos.

2.3 Oviposição

A movimentação das larvas neonatas de *D. saccharalis* foi observada em cada variedade. Para isso plantas de aproximadamente 45 dias de idade foram individualizadas em copos plásticos de 300 ml usando como substrato Tropstrato® e transportadas ao laboratório onde foram conduzidos os experimentos. Para padronizar a altura e o local onde a larva neonata seria liberada e observar a movimentação na superfície da folha, foi conduzido um experimento paralelo em laboratório. Plantas de cada variedade com cinco folhas completamente expandidas (45 dias após a emergência) foram individualizadas dentro de gaiolas feitas com garrafas *pet* (politereftalato de etileno). Lateralmente foi aberto um orifício quadrado protegido com um pedaço de organza para facilitar a ventilação e diminuir o abafamento interno.

Três casais em estado de pupa oriundos da criação mantida em laboratório foram colocados dentro de uma tampa plástica de garrafa *pet*, perto da base da planta até a emergência dos adultos ou até a finalização do experimento. No lugar da tampa da garrafa, foi disposto um pedaço de organza segurado com um elástico. As gaiolas foram dispostas sobre uma tábua que por sua vez, foi colocada encima de suportes plásticos, dispostos dentro de recipientes plásticos contendo água e sabão a fim de evitar o ataque de formigas.

O experimento foi estabelecido em casa de vegetação (30°C; 60 U.R%). Para cada variedade foram estabelecidas 15 repetições. Com o auxílio de uma lupa de mão, foi registrado o número de posturas por folha, a altura das três primeiras posturas a partir do ponto de inserção das folhas (cartucho) e a localização da postura na folha (adaxial ou abaxial). Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM, SAS 9.1) eventualmente complementada por teste de Tukey HSD ($p < 0,05$), quando apropriado (SAS System, SAS 9.1).

2.4. Movimentação larval

Após definido o local da liberação das larvas para cada variedade, uma larva neonata oriunda da criação artificial era colocada com a ajuda de um

pincel fino, na superfície abaxial da folha zero (0) de acordo com o sistema de Kuijper (1915), a 20 cm de distância tomando como referência o colar da bainha das folhas (Figura 1).

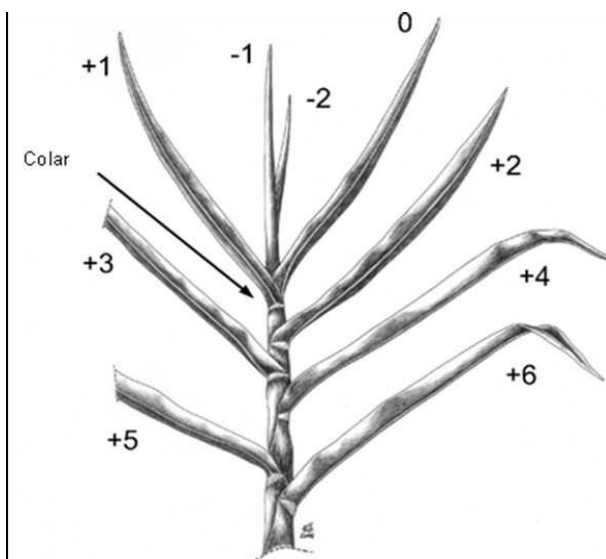


Figura 1. Numeração das folhas da cana-de-açúcar segundo o sistema Kuijper (1915) usando como referência o colar da bainha. Fonte (modificada): Cheavegatti-Gianotto *et al.*, (2011).

Antes da realização das observações, foi criado um protocolo geral sobre o comportamento larval, usando larvas neonatas diferentes daquelas usadas no experimento final. No protocolo foram considerados os comportamentos mais comuns e frequentes das larvas como caminhamento, movimentação, paradas e viradas. Com a ajuda de uma lupa de mão foi observada a movimentação da larva, registrando o seu comportamento por meio do programa JWatcher 1.0 (Blumstein e Daniel, 2007).

O tempo total de caminhamento, das viradas de uma face para outra e de parada foi registrado separadamente e em combinação com os modificadores direção (apical, basal e diagonal) e superfície da folha (abaxial e adaxial). Cada observação foi feita usando diferentes plantas e larvas até a penetração desta no cartucho. Vinte repetições por variedade foram acompanhadas.

Os dados foram submetidos à análise multivariada (MANOVA), complementada por análises de variância univariadas (ANOVA) ($P < 0.05$) (SAS System, SAS 9.1).

2.5 Consumo alimentar e interação larval

A área interna dos colmos consumida pelas larvas da broca em ambas as variedades foi quantificada, assim como a interação larval. Interação larval foi definida como o encontro de duas ou mais larvas na mesma galeria. Ambos os parâmetros foram mensurados ao longo do tempo (oito dias). Para a realização do experimento, plantas das mesmas duas variedades testadas no experimento anterior foram mantidas nas mesmas condições. Quando as plantas alcançaram o estágio de cinco folhas completamente expandidas, foram levadas ao laboratório (27°C, 14:10) para se adaptarem às condições uma semana antes de serem infestadas artificialmente.

Para cada variedade três densidades larvais foram testadas, 5, 10 e 15 larvas por planta, as quais foram colocadas no cartucho da planta com a ajuda de um pincel fino. Com um pedaço de nylon (5 cm), as folhas foram amarradas para evitar o toque aéreo entre plantas e assim a passagem das larvas de uma planta a outra. As plantas foram colocadas sobre prateleiras metálicas e foram isoladas com fita crepe, colada ao redor de cada planta. Na superfície da fita foi espalhada vaselina e na base de cada planta foi colocado um prato contendo água para evitar o ataque de formigas.

Dois dias após a infestação foram iniciadas as leituras, cada planta sendo fotografada individualmente em aparelho de raio-X digital (26 Kva, Faxitron MX 20, Bioptics, EUA), com intervalos de leitura de dois dias, durante o tempo em que a planta se manteve viva ou até quando não se registrou mais a presença das larvas no interior do colmo. A mensuração das áreas consumidas foi feita no programa computacional Image Pro Plus®, assim como o número de interações entre as larvas (encontros na mesma galeria). Os resultados da área consumida e a interação larval foram submetidos à análise de variância em medidas repetidas no tempo (SAS System, SAS 9.1).

3. Resultados

3.1 Oviposição e movimentação larval

As diferenças entre os genótipos de cana-de-açúcar foram significativas na face escolhida para oviposição ($F_{1,19}=11.87$; $P < 0.0001$). De acordo com o número de ovos total por face, a face abaxial na variedade suscetível teve maior número de posturas; já na variedade resistente não houve diferenças entre as faces. Quando o número total de posturas por face foi comparado entre variedades, a face abaxial na variedade resistente teve menor número de posturas (Tabela 1). As folhas -1 e 0 em ambas as variedades, correspondentes ao tecido mais novo, foram as que apresentaram maior número de posturas ($F_{4,78}=4.20$; $P= 0.0026$) (Figura 2). O terço superior, em ambas as variedades, foi o local preferencial de oviposição ($F_{4,78}=6.58$; $P= 0.0002$) (Figura 3); a altura média oscilou em torno dos 20 cm de distância desde o ponto de inserção das folhas.

Tabela 1. Número de posturas de fêmeas de *D. saccharalis* nas faces foliares de duas variedades de cana-de-açúcar com diferente nível de suscetibilidade (SP-891115 e RB-835486).

Face	Variedade	
	Suscetível (SP-891115)	Resistente (RB-835486)
Adaxial	0.73 ± 0.89* (Bb)	1.27 ± 0.25 (Ab)
Abaxial	2.17 ± 0.25 (Aa)	1.73 ± 0.25 (Ab)

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0.05$)

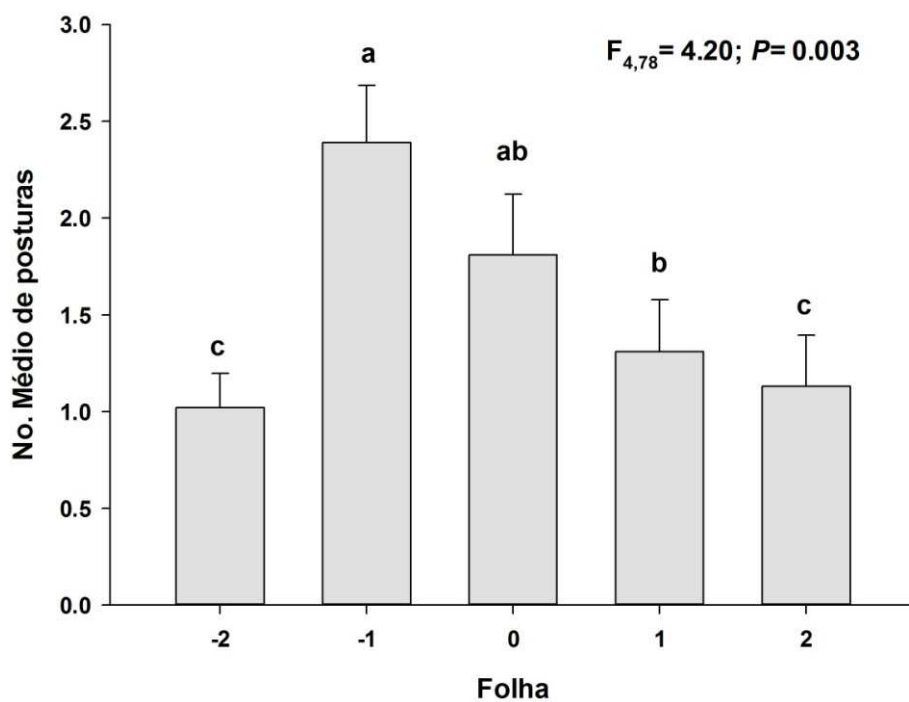


Figura 2. Folha preferencial para oviposição usando como indicativo o número de posturas/folha em duas variedades de cana SP-891115 (susceptível) e RB-835486 (resistente).

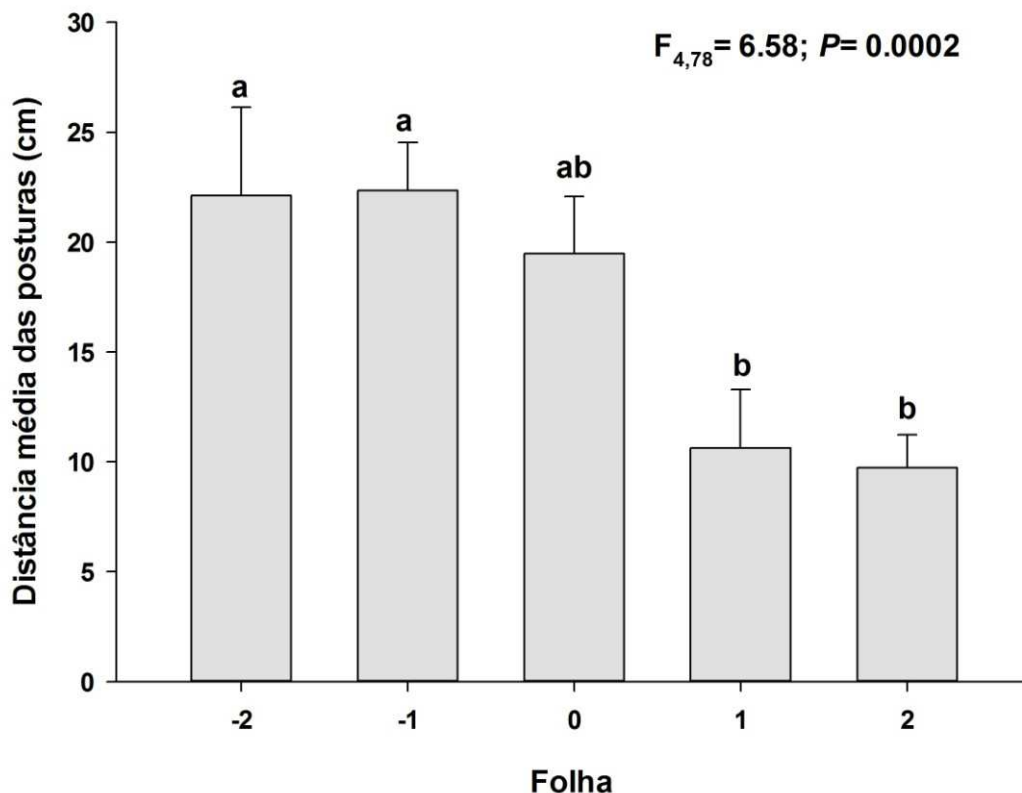


Figura 3. Distância média das posturas nas folhas, usando como referência o ponto de inserção das folhas (colar) em duas variedades de cana, SP-891115 (suscetível) e RB-835486 (resistente).

O tempo gasto pelas larvas para se deslocarem na superfície da folha foi diferente em ambas as variedades ($F_{1,34} = 4.62; P = 0.0390$), sendo maior na variedade resistente (Fig 4A). O tempo que as larvas gastaram para se deslocar lateralmente ($F_{1,34} = 3.04; P = 0.0049$), o tempo em que demoraram para virar da face adaxial a abaxial ($F_{1,33} = 4.25; P = 0.047$) foi maior na variedade suscetível; já o tempo total em que as larvas não se movimentaram foi maior na variedade resistente ($F_{1,34} = 10.50; P = 0.0027$) (Figura 4B).

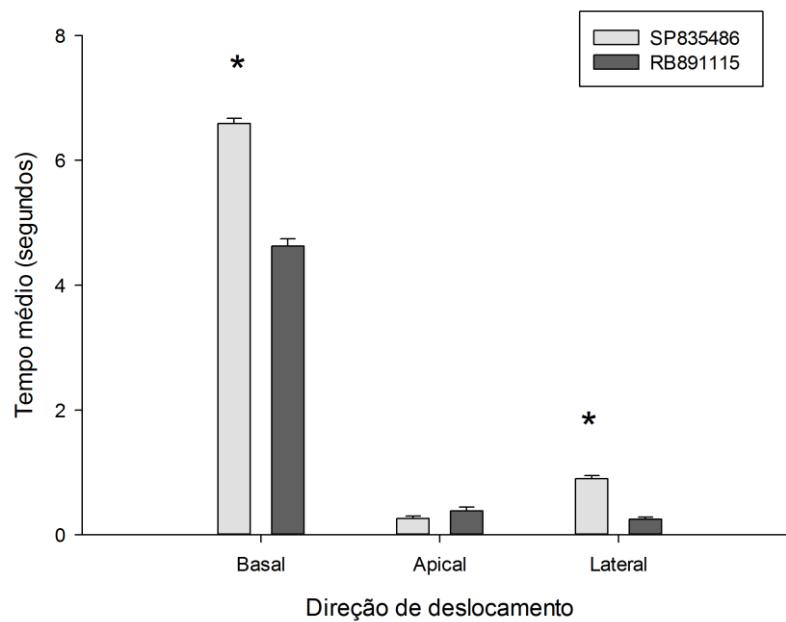
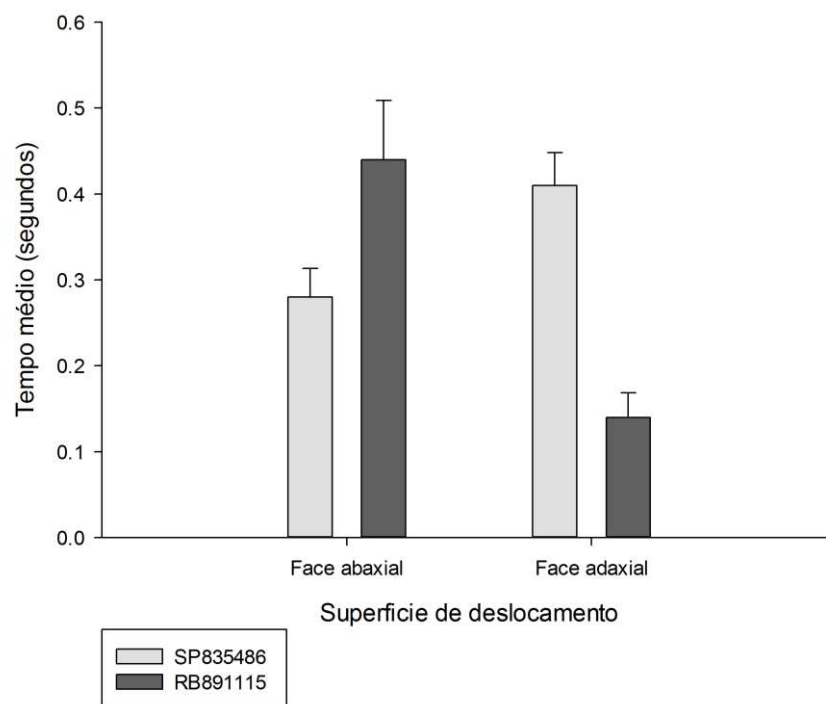


Figura 4. A. Comportamento geral de neonatas de *D. saccharalis* na superfície foliar de duas variedades de cana-de-açúcar, resistente (RB-835486) e suscetível (SP-891115) ao ataque do inseto. **B.** Deslocamento de acordo a face e direção. Barras seguidas pelo asterisco diferem significativamente (teste $t P < 0.05$)

3.2 Consumo alimentar e interação larval

Houve diferenças significativas no consumo interno dos colmos ao longo do tempo para ambas as variedades ($F_{3,69} = 4.50$; $P = 0.0061$) independente da densidade larval por planta ($F_{6,69} = 0.81$; $P = 0.523$). Ao analisar o aumento da área consumida entre as variedades, a área consumida na primeira leitura, ou seja, dois dias após a infestação das larvas, diferiu estatisticamente das outras, ($F_{1,23} = 4.38$; $P = 0.047$), sendo maior na variedade suscetível (SP-891115) do que na resistente (RB-835486); já nas datas subsequentes não houve diferenças significativas (Figura 5 e 6). A interação larval, ou o número de encontros entre as larvas não dependeu da densidade larval e foi significativamente maior na variedade suscetível (SP-891115) dois dias após a infestação ($F_{1,54} = 5.67$; $P = 0.020$); nos dias subsequentes não houve diferenças significativas entre variedades (Figura 7).

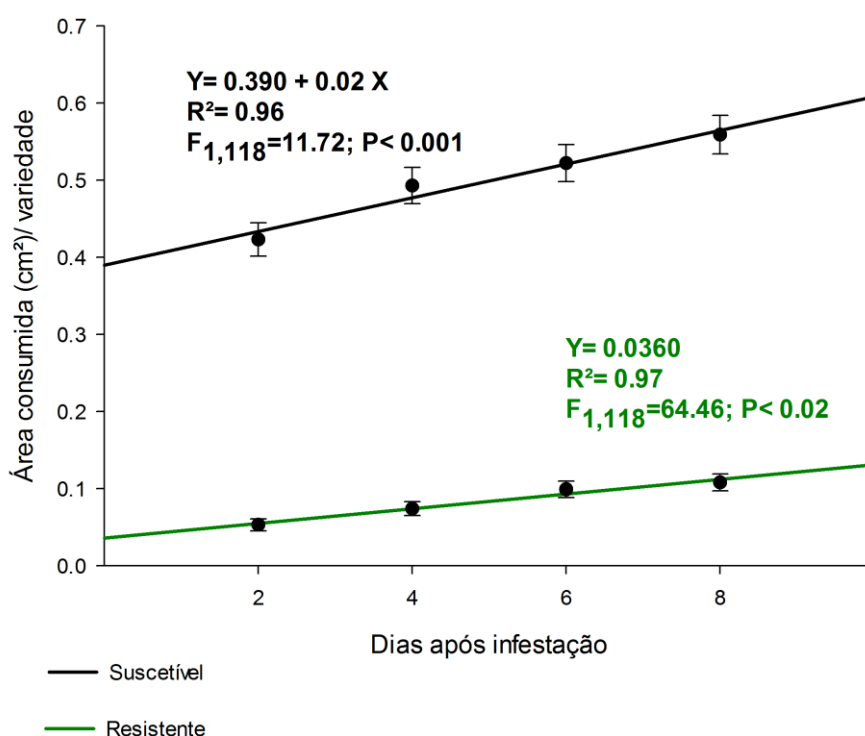


Figura 5. Área interna (cm²) do colmo consumida por neonatas, em duas variedades de cana SP-891115 (suscetível) e RB-835486 (resistente), ao longo do tempo.

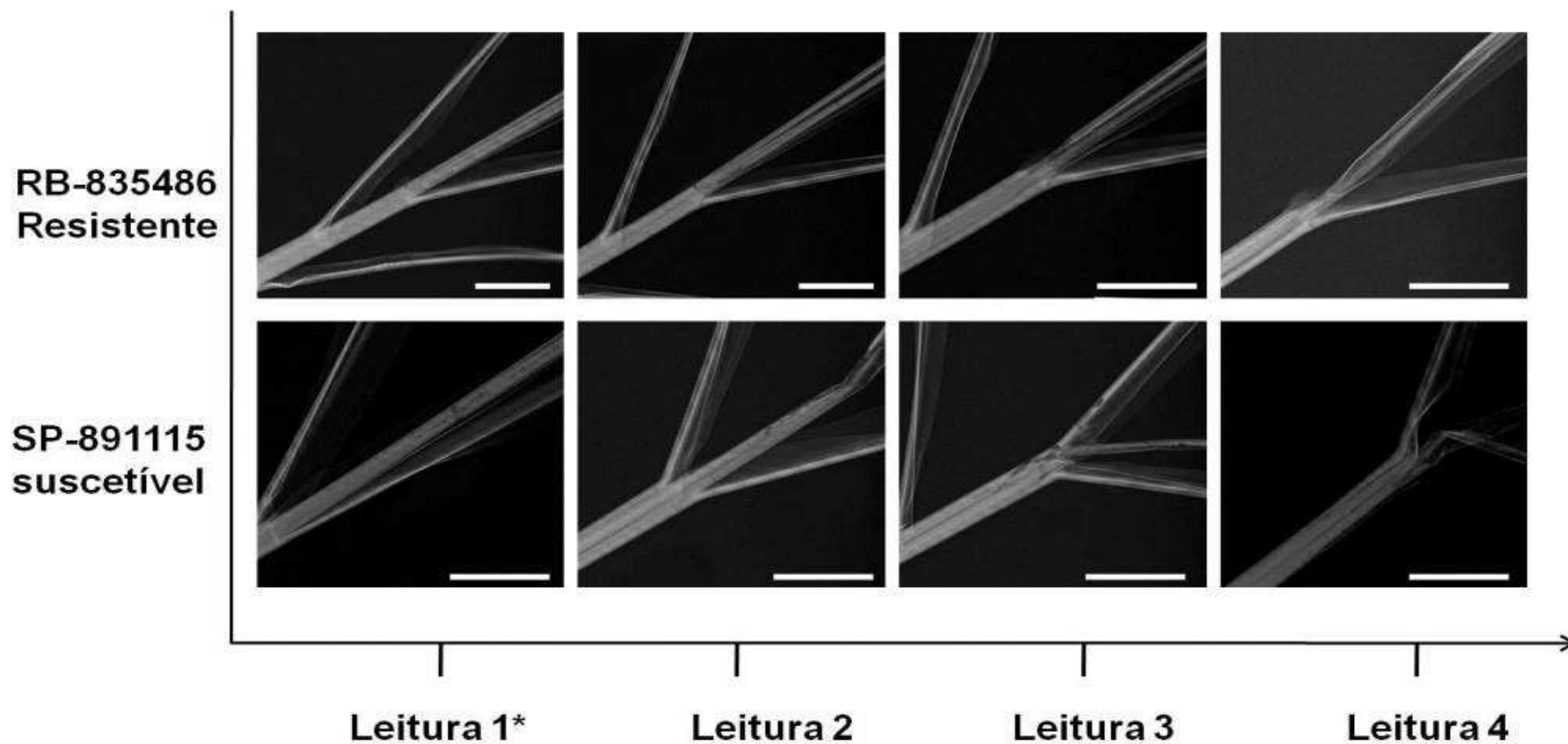


Figura 6. Registro gráfico do consumo da área interna do colmo (45 dias de idade) de duas variedades de cana-de-açúcar (SP-891115 e RB-835486) por larvas neonatas de *D. saccharalis* ao longo do tempo. Imagens registradas em aparelho de Raio-X após dois dias de infestação e com intervalos de leitura de dois dias entre elas.

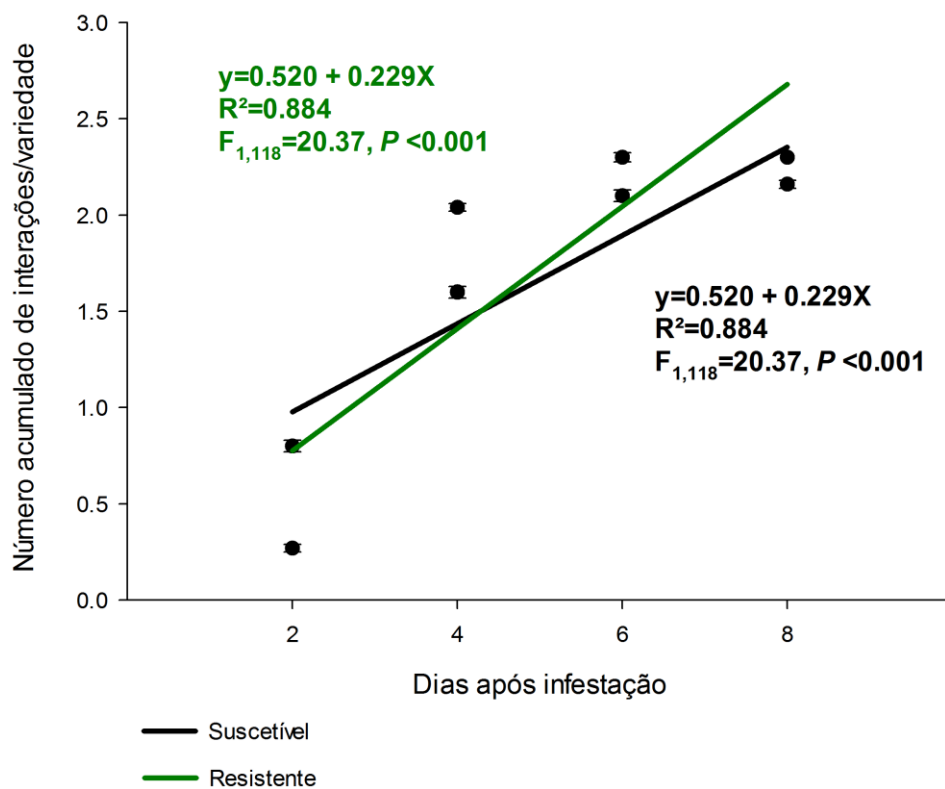


Figura 7. Interações entre larvas de *D. saccharalis* dentro do colmo em duas variedades de cana-de-açúcar SP-891115 (Suscetível) e SP-835486 (Resistente) durante 8 dias de observação.

4. Discussão

Usando parâmetros comportamentais resultantes da interação de larvas de *D. saccharalis* com dois genótipos de cana-de-açúcar, tais como movimentação na folha, interações entre as larvas e consumo da área interna do colmo, foram comprovadas diferenças em suscetibilidade de ambas as variedades estudadas, a SP-891115 (suscetível) e a SP-835486 (resistente), em condições de laboratório.

Na movimentação foliar, o tempo gasto pela larva para realizar cada um dos diferentes comportamentos até chegar ao cartucho da planta foi diferente entre as variedades. Na variedade resistente (RB-835486) o tempo de caminhada e parada foram maiores, contrário à variedade suscetível (SP-891115). Isso permite inferir a existência de características físicas e/ou pistas químicas nas folhas capazes de afetar o comportamento larval (Shoonhoven e Van Loon, 2002). O tempo de caminhamento em direção lateral e de virada de uma face para outra (da adaxial para a abaxial) foi maior na variedade resistente e o número de posturas na face abaxial foi menor suportando à percepção de características físicas e/ou químicas das folhas mediando a preferência varietal das larvas. Possivelmente a presença de algum tipo de barreira física, como por exemplo, a presença maior de tricomas na superfície da face, pode afetar o comportamento de insetos da família Crambidae como relatado por Smith (2005).

A escolha de tecidos mais novos para oviposição pode ser uma estratégia das fêmeas para facilitar o deslocamento das larvas eclodidas em direção ao ponto de entrada no colmo, local onde elas iniciam o processo de alimentação e penetração no colmo. Todas as larvas após liberadas forragearam na superfície da folha, para finalmente se dirigirem até o ponto de inserção das folhas (cartucho). As larvas que demoram mais tempo para chegar até o ponto de inserção das folhas, ficaram mais expostas e podem sofrer maior predação ou serem afetadas pela ação de fatores abióticos como chuva, arraste por vento, dentre outros. Outros aspectos relacionados à escolha e seleção de materiais para serem transformados geneticamente por meio da inserção de genes de toxinas *Bt*, como estratégia complementar ao manejo da broca-da-

cana, as diferenças comportamentais nos indivíduos (antixenose) frente aos diferentes hospedeiros podem afetar a distribuição das larvas, a biologia da colonização, o comportamento das larvas e conseqüentemente a ingestão do tecido expressando a pró-toxina.

Diferente do observado por Figueiredo *et al.*, (2010) no milho, onde o total das larvas neonatas de *D. saccharalis* permaneceram no cartucho da planta até 12 dias após a eclosão, as larvas penetraram no colmo de cana após dois dias da infestação em nosso estudo. Saxena e Oyango (1990) mencionaram que larvas neonatas pertencentes à ordem Lepidoptera iniciam o processo de alimentação perto ou longe do ponto de oviposição. Contudo, no caso de *D. saccharalis*, todas as larvas se dirigiram até o ponto de inserção das folhas e só aí começaram a se alimentar do parênquima foliar para depois penetrarem o colmo.

As diferenças observadas no consumo interno do colmo entre as variedades de cana-de-açúcar também permitiram reconhecer a resistência e suscetibilidade nas duas variedades, principalmente a partir das leituras iniciais realizadas após dois dias da infestação artificial. Como esperado, a variedade RB-835486 foi menos consumida, o que comprova a existência de algum mecanismo de resistência que afeta a alimentação das larvas, seja por deterrência, ou pela dureza dos colmos, a qual pode interferir na penetração e construção da galeria ou pelo alto teor de fibra que, como sugerido por White *et al.*, (2006), é uma característica associada à resistência ao ataque da broca em cana-de-açúcar. Nos primeiros dias após a infestação o consumo do tecido interno na variedade suscetível foi maior, além de comprovarem a ausência direta de elementos que afetassem a alimentação das larvas, possivelmente também demonstra maior necessidade das larvas consumirem mais alimento nos estados iniciais para se desenvolver e mudar de instar. Embora as plantas de cana utilizadas no presente estudo fossem muito novas e sem diferenciação dos internódios, a tendência geral nas observações foi que as larvas construíssem as galerias em direção aos tecidos mais novos, ou seja, em direção apical (observações pessoais). Resultados semelhantes foram obtidos

por White (1993); que reportam serem tecidos mais velhos são menos atacados pelas larvas de *D. saccharalis*.

Contrário ao esperado, a densidade das larvas não influenciou as variáveis consumo alimentar ou interação entre as larvas. Nem todas as larvas infestadas colonizaram a planta ou permaneceram nela, várias delas foram encontradas na água ou coladas na superfície da fita crepe após a primeira avaliação, fato associado provavelmente à disponibilidade de alimento limitado e de espaço. Segundo Zalucki *et al.*, (2002), se o hospedeiro é limitado em termos de recurso e espaço, a larva continuará procurando um hospedeiro adequado para se desenvolver.

Apesar de algumas larvas não terem colonizado a planta, as que penetraram o colmo e se alimentaram dele, interagiram umas com as outras. Duas ou mais larvas foram encontradas habitando a mesma galeria, principalmente na variedade suscetível (SP-891115), embora esse número diminuísse com o passar dos dias até não serem mais observadas. Interações entre larvas de alguns Lepidoptera podem ser indicativo da disponibilidade de alimento, espaço e qualidade nutricional, além de ser um comportamento normal em aproximadamente 10% das espécies pertencentes à ordem Lepidoptera e em alguns casos a interação perduram ao longo dos instares de desenvolvimento, sendo predominante nos primeiros instares (Zalucki *et al.*, 2002). Na variedade resistente as interações larvais foram menores e a tendência foi de se observar uma larva por galeria com maior frequência. Este padrão de interação larval pode ser um indicador da resistência de plantas, baseado no princípio da competição e colonização em decorrência do recurso escasso disponível.

Em conclusão, o comportamento das larvas de *Diatraea saccharalis* e sua interação direta com o hospedeiro, no caso variedades de cana-de-açúcar, são parâmetros passíveis de serem usados na detecção das diferenças na resistência à broca-da-cana. As diferenças de comportamento das larvas observadas em cada variedade sugerem a existência de fatores externos e internos, associados à resistência varietal. Desta forma as observações e registros comportamentais oriundos da interação do inseto com a planta

auxiliam na caracterização varietal de plantas. Outras mensurações que não possam ser facilmente observadas poderão ser feitas por meio do uso do Raio X, como determinação da biologia do inseto dentro do hospedeiro natural, interações tritróficas envolvendo parasitoides e outras que envolvam a observação do inseto dentro dos tecidos da planta poderão ser levadas em consideração como indicadores adicionais da resistência varietal.

5. Referências

- Bessin, R.T; Reagan, T.E.; Martin, F.A. 1990. A moth production index for evaluating sugarcane cultivars for resistance to the sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 83:221-225.
- Blumstein, D.T; Daniel, J.C. 2007. Quantifying behavior the JWatcher way. Departamento de Ecologia e biologia evolutiva, Universidade da Califórnia, Los Angeles, 211p.
- Boiça Jr, A. L.; Lara, F. M.; Bellodi, M. P. 1997. Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporadas em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cam.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(3): 537-542.
- Clark, B.R; Faeth, S.H. 1997. The consequences of larval aggregation in the butterfly *Chlosyne lacinia*. *Ecological Entomology*, 22:408–415.

- Denno. R.F; Benry, B. 1997. Aggregation facilitates larval growth in the neotropical nymphalid butterfly *Chlosyne janais*. *Ecological Entomology*, 22:133–141.
- Dinardo-Miranda, L.L; Anjos, I.A; Da Costa, V.P; Fracasso, J.V. 2012. Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 47(1):1-7.
- Figueiredo, M.L; Cruz, I; Silva, R. 2010. Aspectos Bioecológicos de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) em Plantas de Milho (*Zea mays* L.). XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 230-235. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/865359/1/0048.pdf>, acesso em: 10 de setembro de 2013.
- Fitzgerald, T.D; Costa, J.T.I. 1986. Trailbased communication and foraging behavior of young colonies of forest tent caterpillars (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 79: 999– 1007.
- Huang, F.N., 2006. Detection and monitoring of insect resistance to Bt crops. *Insect Sci.* 13, 73-90.
- King, E.G.; Hartley, G.G. 1985. *Diatraea saccharalis*. p.265-270. Em: P. Singh & R.F. Moore (eds.). *Handbook of insect rearing*. New York, Elsevier, 514 p.

- Kuijper J. DeGroeij van Bladschijf, 1915. Bladscheede en Stengel van het suikerriet. Arch Suiker ind Ned Indië, 23:528–556.
- Mathes, R. ; Charpentier, L. J. 1969. Varietal resistance in sugar cane to stalk moth borers, pp. 175-188. In J. R. Williams, J. R. Metcalfe, R. W. Mungomery & R. Mathes [eds.], Pests of Sugar Cane. Elsevier, New York.
- Meagher, R. L., Jr., J. E. Irvine, R. G. Breene, R. S. Pfannenstiel & M. Gallo-Meagher. 1996b. Resistance mechanisms of sugarcane to Mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economic Entomology, 89: 749-760.
- Mendonça, A.F; Risco, S.H.B; Costa, J.M.B. 1977. Introduction and rearing of *Apanteles flavipes* Cameron (Hym.: Braconidae) in Brasil. Em: Congress of International Society of Sugarcane Technologists, 16., São Paulo. Proceedings... São Paulo: ISSCT p. 703-710.
- Prado, C.J. 1970. História econômica do Brasil. São Paulo: Brasiliense.
- Rosseto, C.J. 1973. Resistência de plantas a insetos. Piracicaba. ESALQ. 110p.
- Saxena, K.N; Onyango, J.D. 1990. Role of behavior of the stem borer *Chilo partellus* (Swinhoe) in determining resistance or susceptibility of certain sorghum cultivars. Symp. Biol. 39:135-143.

- Schoonhoven, L. M.; van Loon, J. J. A. 2002. An inventory of taste in caterpillars: each species its own key. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. 48, 215–263.
- Silva, C. C. M. 2009. Desempenho do parasitóide *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) sobre *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação (Mestrado em Agronomia - Entomologia Agrícola) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Smith, C.M. 2005. Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches. The Netherlands: Springer, 2005. 423p.
- Sosa, O. Jr. 1988. Pubescence in sugarcane as a plant resistance character affecting oviposition and mobility by the sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 81:661-667.
- White, W.H. 1993. Movement and establishment of sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) larvae on resistant and susceptible sugarcane. *The Florida Entomologist* 76(3): 465-473.
- White, W.H; Tew, T.L; Richard, E.P. 2006. Association of sugarcane pith, rind hardness, and fiber with resistance to the sugarcane borer. *Journal American Society Sugar Cane Technologists*, 26:87-100.

Zalucki, M.P; Clarke, A.R; Malcolm, S.P. 2002. Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annual review of entomology* 47:361-393.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do presente estudo concluiu-se que populações brasileiras de *D. saccharalis* apresentam variação genética em suscetibilidade à toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis*. Embora seja improvável que essas populações tenham sofrido processos de seleção com aplicações prévias de Bt, houve rápida resposta à seleção nos experimentos conduzidos em laboratório usando indivíduos coletados em diferentes localidades do Brasil e mantidos durante três gerações em condições de laboratório. A partir da mistura de populações foi possível selecionar uma população da espécie para resistência à toxina Cry1Ab usando folhas de milho expressando a pró-toxina e obtendo resultados mensurados principalmente pelo ganho na sobrevivência de uma geração a outra, em pouco tempo. Esses resultados em conjunto levam a preocupações em relação à futura utilização de milho e cana transgênicos expressando Cry1Ab no Brasil. Isso porque a seleção da resistência a broca da cana para esta toxina é possivelmente de ser rápida mediante utilização desses cultivos Bt em larga escala do campo, o que vai necessitar de táticas de manejo para maximizar o uso sustentável destas culturas transgênicas.

Adicionalmente, no segundo estudo não foi observado correlação da suscetibilidade da broca-da-cana a toxina Cry1Ab com a ativação da resposta imune do inseto após a ingestão da pró-toxina. Isso permite concluir que a ativação das respostas celular e humoral, quando medida pela atividade das fenoloxidasas e da quantidade de hemócitos, parece não ser um mecanismo associado à resistência à toxina Cry1Ab. De maneira geral, o mecanismo principal de resistência a Bt conhecido está associado à alteração no sítio alvo de ligação da toxina, que se situa nas microvilosidades das células principais do intestino médio. A morfologia dessas células foram alteradas após a ingestão de baixas concentrações da toxina, tanto em populações mais quanto menos suscetíveis à toxina Cry1Ab.

Finalmente, o uso de parâmetros comportamentais de *D. saccharalis* associados a genótipos de cana-de-açúcar, permitiu caracterizar a resistência da cana-de-açúcar ao ataque do inseto. Por meio de ferramentas apropriadas, a observação de mudanças comportamentais do inseto quando em contato com o hospedeiro, tanto externas e internas permitem concluir que elas são reflexo de características fenotípicas deferentes nos genótipos das variedades avaliadas que afetam o comportamento de colonização do inseto e penetração na planta o qual foi consistente nos parâmetros avaliados baseados no conceito de resistência varietal.