

FERNANDA FREITAS SOUSA

**HISTÓRIA DE VIDA DE POPULAÇÕES DE *Spodoptera*
frugiperda PREVIAMENTE EXPOSTAS AO MILHO BT
EXPRESSANDO Cry1Ab**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

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

T

S725h
2011

Sousa, Fernanda Freitas, 1981-

História de vida de populações de *Spodoptera frugiperda*
previamente expostas ao milho Bt expressando Cry1Ab /
Fernanda Freitas Sousa. – Viçosa, MG, 2011.
x, 38f. : il. ; 29cm.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-38

1. *Spodoptera frugiperda*. 2. Plantas transgênicas. 3. Milho
- Resistência a doenças e pragas. 4. *Bacillus thuringiensis*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

FERNANDA FREITAS SOUSA

História de vida de populações de *Spodoptera frugiperda*
previamente expostas ao milho Bt expressando Cry1Ab

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

APROVADA: 29 de Julho de 2011.



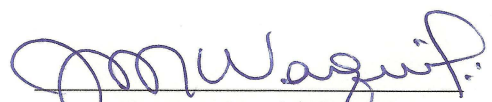
Dra. Simone Martins Mendes
(Co-Orientadora)



Prof. Marcelo Coutinho Picanço
(Co-Orientador)



Dr. Leandro Bacci



Dr. José Magid Waquil



Prof. Eliseu José Guedes Pereira
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Fernando e Maria Helena,
e aos meus irmãos Mariele e Marcelo.
Meu porto seguro.

“Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”
Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, professor Eliseu José Guedes Pereira, pelo desafio da primeira orientação e por toda ajuda.

À Dra. Simone Martins Mendes, minha coorientadora pelos valiosos conselhos e pelo carinho.

Ao professor Marcelo Coutinho Picanço, pela co-orientação, pelos valiosos conselhos e amizade. À sua esposa Kátia e aos seus filhos Mayara, Luíza e Marcelo Filho, pelo agradável convívio.

Ao professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela co-orientação, amizade e disponibilidade de sempre.

Ao Dr. Leandro Bacci e Dr. José Magid Waquil pela participação na banca examinadora e pelas excelentes sugestões a este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas pela ajuda durante a execução deste trabalho e pelo agradável convívio.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Entomologia Dona Paula e Silvânia e ao funcionário Zé Evaristo pela eficiência no trabalho que fazem.

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo: Andréia, Chris, Eustáquio, Octávio e Vieira pela grande ajuda e amizade.

Aos meus pais, Fernando e Maria Helena, pelo amor, carinho e apoio incondicional que sempre me deram.

Aos meus irmãos Mariele e Marcelo e minha cunhada Kika, por tudo.

À Tia Lúcia, minha segunda mãe, presente em todos os momentos.

Ao Diogo, pela parceria na vida e pelo amor dedicado a mim.

E, finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA FREITAS SOUSA filha de Fernando Luis de Sousa e Maria Helena Freitas de Sousa nasceu em Cataguases, Minas Gerais, em 06 de Novembro de 1981.

Cursou o Ensino Médio no COLUNI, o Colégio de Aplicação da UFV na turma de 1997-1999. Em Julho de 2001 iniciou o curso Ciências Biológicas na Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo que em 2003, no 4º semestre, transferiu-se para a Universidade Federal de Viçosa. Durante a graduação, estagiou no laboratório de Feromônios e Comportamento de Insetos sob orientação do professor Eraldo Rodrigues de Lima. Gradou-se Bacharel em Março de 2007 e Licenciada em Agosto do mesmo ano.

Em Agosto de 2007 começou a ministrar aulas de Biologia no cursinho pré-vestibular Vivenciar, em Coimbra-MG, função esta que manteve até dezembro de 2010.

Em 2008 iniciou estágio no laboratório de Manejo integrado de Pragas, sob supervisão do professor Marcelo Coutinho Picanço, onde desenvolveu trabalhos com manejo integrado de pragas de hortaliças, grandes culturas, fruteiras e ornamentais. Possuiu bolsa de Apoio Técnico de Agosto de 2008 a Julho de 2009.

Em Agosto de 2009 ingressou no curso de Mestrado em Entomologia na UFV, curso que concluiu em Julho de 2011.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.1 Coleta e criação das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	5
2.2 Cultivo do milho para alimentação dos insetos.....	6
2.3 História de vida das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> criadas em folhas de milho convencional e transgênico em condições de laboratório.....	6
2.3.1 Sobrevivência de neonatas.....	6
2.3.2 Desenvolvimento da fase imatura.....	7
2.3.3 Tabela de fertilidade.....	8
2.4 Desempenho e injúria causada pelas populações de <i>S. frugiperda</i> no milho Bt em casa de vegetação.....	9
2.5 Análises estatísticas.....	10
3 RESULTADOS.....	11
3.1 História de vida comparativa de populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas em milho Bt e criadas em folha de milho Bt no laboratório.....	11
3.1.1 Sobrevivência de neonatas.....	11
3.1.2 Sobrevivência ao longo de uma geração.....	2
3.1.3 Crescimento e desenvolvimento da fase imatura.....	15
3.1.4 Tabela de fertilidade e crescimento populacional.....	20
3.2 Desempenho e injúria causada pelas populações de <i>S. frugiperda</i> no milho Bt em casa de vegetação.....	23
4 DISCUSSÃO.....	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

SOUSA, Fernanda Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.
História de vida de populações de *Spodoptera frugiperda* previamente expostas ao milho Bt expressando Cry1Ab. Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.
Coorientadores: Simone Martins Mendes, Marcelo Coutinho Picanço e Raul Narciso Carvalho Guedes.

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é a praga mais importante na cultura do milho na América tropical, porém suas larvas são relativamente tolerantes à toxina Cry1Ab que é expressa em alguns híbridos de milho Bt. A exposição desta praga ao milho Cry1Ab, com conseqüente aumento da taxa da evolução de resistência, pode comprometer o uso dessas plantas no manejo de *S. frugiperda*. Os objetivos deste trabalho foram documentar o efeito de milho Cry1Ab nas taxas de crescimento e sobrevivência de populações de *S. frugiperda* e determinar se a exposição prévia a esse milho afeta o desempenho fisiológico e reprodutivo ou a susceptibilidade dos descendentes à toxina de Bt. Larvas de último ínstar foram coletadas em lavouras de milho convencional e Bt em cinco regiões produtoras de Minas Gerais e sua descendência foi comparada em termos de sobrevivência, desenvolvimento e taxas de crescimento populacional em duas situações: submetidas à exposição crônica à toxina Cry1Ab por toda a fase larval e sem exposição à toxina. Em laboratório, folhas de milho MON810 causaram 75-95% de inibição de crescimento e reduziram a sobrevivência larval de 20-80% entre as populações estudadas. Foi observado aumento no tempo de desenvolvimento larval em larvas expostas à Cry1Ab, relativo ao controle, e esse atraso foi maior em insetos coletados em campos de milho convencional. Estimativas das taxas de crescimento populacional foram 50-70% menores em indivíduos expostos cronicamente a Cry1Ab relativo ao controle, e variou entre as populações de *S. frugiperda* e com a exposição prévia à toxina no campo. Entre os indivíduos coletados de milho Bt Cry1Ab, apenas uma população apresentou mortalidade relativamente mais baixa, desenvolvimento larval mais rápido e melhor performance reprodutiva tanto submetidas à Cry1Ab quanto no controle. Esses resultados indicam que larvas de *S. frugiperda* que completaram seu desenvolvimento no milho Cry1Ab não apresentaram mudanças na susceptibilidade na maioria das populações estudadas, exceto em uma das populações, que apresentou melhor performance em folhas de milho Cry1Ab e aparentemente sem custo adaptativo associado. Bioensaios com toxina purificada e experimentos de seleção podem fornecer

informações mais precisas sobre mudanças genéticas na susceptibilidade nessas populações, o que pode ser importante no manejo de resistência de *S. frugiperda* a híbridos de milho Bt.

ABSTRACT

SOUSA, Fernanda Freitas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Life history of *Spodoptera frugiperda* populations previously exposed to Bt corn expressing Cry1Ab** Adviser: Eliseu José Guedes Pereira. Co-Advisers: Simone Martins Mendes, Marcelo Coutinho Picanço and Raul Narciso Carvalho Guedes.

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), is the most destructive pest of corn in the tropical America and is relatively tolerant to the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*, which is expressed in some Bt corn hybrids cultivated in Brazil. Exposure to sublethal concentrations of Cry1Ab in corn plants may increase the rate of resistance evolution and compromise their efficacy against *S. frugiperda*. Hence, late-instar larvae were collected from Cry1Ab and conventional hybrids in five locations in Minas Gerais state and their offspring was compared for survival, development, and population growth rates in two conditions: with chronic Cry1Ab exposure throughout larval development and without toxin exposure. In the laboratory, leaves of MON810 corn caused 75-95% growth inhibition and reduced larval survival by 20-80% among the populations studied. Increase in the larval development time was observed for larvae exposed to Cry1Ab relative to control, and the delay was greater for insects collected from conventional corn fields. Estimates of population growth rates were 50-70% lower for individuals chronically exposed to Cry1Ab relative to control and this varied among the *S. frugiperda* populations and their prior exposure to Cry1Ab corn in the field. Among the individuals collected from Bt Cry1Ab corn, only one population showed relatively lower mortality, faster larval development, and better reproductive performance in both Cry1Ab and control treatments. These results indicate that *S. frugiperda* larvae that completed development on Cry1Ab corn hybrids had no detectable change in Cry1Ab susceptibility in most populations studied, except in one of them which showed better performance in leaves of Cry1Ab corn and no apparent fitness costs associated with this trait. Bioassays with purified Bt toxins and selection experiments should provide more precise information about genetic changes in susceptibility in these populations, which will be important for resistance management of *S. frugiperda* to *B. thuringiensis* corn hybrids.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a utilização de culturas transgênicas expressando toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* representam uma das mais significativas mudanças nas práticas de manejo de pragas desde os inseticidas sintéticos e têm proporcionado impactos positivos na produção agrícola mundial (SHELTON et al., 2002; ROMEIS et al., 2008). Uma das vantagens do uso dessas plantas transgênicas Bt relativo ao uso de inseticidas convencionais é a alta especificidade da proteína inseticida (MACINTOSH et al., 1990), sendo mínimo o efeito em organismos não-alvo (NOTEBORN et al., 1995; NARANJO et al., 2005; O'CALLAGHAN et al., 2005; ROMEIS et al., 2006). Outras vantagens do uso de plantas transgênicas incluem menor input em custos de aplicação de pesticidas e reduzido impacto ambiental decorrente da manufatura, transporte e aplicação destes (GASSER & FRALEY, 1989). Além disso, esse método de controle de pragas é de fácil utilização pelos agricultores, sendo que a área plantada com culturas Bt vem aumentando mundialmente desde sua primeira utilização por agricultores americanos em 1996 (JAMES, 2009).

Atualmente, a maior parte das plantas transgênicas resistentes a insetos expressam proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Essas proteínas são altamente tóxicas e extremamente específicas para um número restrito de espécies de insetos, sendo esta especificidade determinada pela estrutura da toxina e por fatores inerentes ao inseto, tais como pH intestinal, classe predominante de proteinases digestivas e receptores protéicos na membrana das células do epitélio intestinal.

Bacillus thuringiensis em sua forma natural sintetiza cristais protéicos durante esporulação, que quando ingeridos por larvas de um inseto suscetível, são dissolvidos no intestino larval. A protoxina liberada do cristal é ativada por proteases, resultando num fragmento tóxico ao inseto suscetível. Esta toxina atravessa a membrana peritrófica

e se liga a proteínas receptoras de alta afinidade na membrana do epitélio do intestino médio (GILL et al., 1992; KNOWLES, 1994; BRAVO et al., 2005), e o inseto para de alimentar minutos após a ingestão da toxina (DULMAGE et al., 1978). Uma vez ligada ao (s) receptor (es), a toxina sofre mudanças conformacionais e provavelmente forma um oligômero que se liga a outro receptor e se insere na membrana das células do epitélio intestinal (BRAVO et al., 2004) e promove uma abertura ou poro na membrana celular (SOBERON et al., 2000) resultando em lise osmótica das células epiteliais. Com a quebra da integridade do tecido epitelial, ocorre entrada de conteúdo intestinal na hemocele causando septicemia e morte larval (KNOWLES, 1994; BRODERICK et al., 2006).

Em 1996, foi introduzido comercialmente nos EUA o milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis*, o qual vem sendo utilizado com sucesso para controle de populações do principal lepidóptero-praga que ataca milho naquele país (KOZIEL et al., 1993; SIEGFRIED et al., 2007). Em 2007 o Brasil regulamentou os procedimentos para plantio comercial de algodão e milho transgênico expressando proteínas inseticidas provenientes de *B. thuringiensis* para controle de lagartas nessas culturas (CTNBio, 2007, 2008a, b, c, 2009). A disponibilidade de híbridos de milho Bt mercado brasileiro aumentou bastante. Esses cultivares são resultantes de cinco eventos transgênicos para o controle de lagartas: 50 cultivares contêm o evento MON810 - marca registrada YieldGard (Cry1Ab); 41 apresentam o evento TC1507 marca Herculex (Cry1F); 17 apresentam o Agrisure TL – conhecido como Bt11 (Cry1Ab); 4 apresentam o evento MON89034 (Cry1A.105 e Cry2Ab2), e 2 apresentam o evento MIR162 (Vip3Aa) (CRUZ et al., 2011). Comparado a outras toxinas, Cry1Ab causa baixa mortalidade, pois se ligam mais fracamente à membrana epitelial (ARANDA et al., 1996)

Embora híbridos geneticamente modificados de milho produzindo seus próprios inseticidas sejam uma nova ferramenta no manejo de pragas, existe uma grande preocupação que a introdução em larga escala de plantas produzindo proteínas inseticidas irá promover o desenvolvimento precoce de resistência a Bt nas populações das pragas (TABASHNIK, 1994; FERRÉ et al., 2008). Isso pode levar à substituição gradativa dos indivíduos susceptíveis por indivíduos resistentes no decorrer das gerações e o gene de resistência, que aumenta em frequência numa população, pode se espalhar para outras populações através do fluxo gênico.

Mundialmente, resistência a inseticidas é um grave problema no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças (ROUSH & TABASHNIK, 1990). Estudos sobre resistência são importantes não apenas para os programas de manejo integrado de pragas, mas também como modelos de evolução de fenótipos recém-adaptados e suas mudanças fisiológicas e genéticas associadas, dentre elas a existência de custo associado à resistência (COUSTAU et al., 2000; RAYMOND et al., 2001). A resistência à toxina de *B. thuringiensis* é um caso particular de resistência, pois além dos prejuízos diretos associados a resistência, ainda pode inviabilizar a utilização de plantas transgênicas que expressam essas toxinas.

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) (J. E. Smith, 1797), mais conhecida como lagarta-do-cartucho, é uma espécie polífaga que ataca diversas culturas economicamente importantes em vários países da região neotropical. Há relatos de que a redução na produção de milho causada por esse inseto atinge 34% com perdas que podem variar conforme a fase de desenvolvimento da planta atacada, com a cultivar utilizada, local de plantio e mesmo entre áreas adjacentes, segundo as práticas agronômicas adotadas (CRUZ, 1995). O percentual de perdas não depende do potencial de produção (CRUZ et al., 1999) e os prejuízos podem chegar a 500 milhões de dólares anuais (WAQUIL et al., 2002).

Tem sido observado que algumas lagartas de *S. frugiperda* sobrevivem e se desenvolvem em alguns híbridos de milho Bt (FERNANDES et al., 2003; MENDES et al., 2011), principalmente naqueles produzindo Cry1Ab, toxina à qual a lagarta do cartucho é relativamente tolerante (WAQUIL et al., 2002; WAQUIL et al., 2004). Dessa forma, a exposição de *S. frugiperda* a esses híbridos pode resultar em aumento do diferencial reprodutivo dos heterozigotos com um conseqüente aumento das taxas de evolução de resistência. Portanto, é necessário testar se esses sobreviventes são de fato mais resistentes que indivíduos de populações de campo da lagarta ou se apenas trata-se de uma sobrevivência eventual sem base genética. Se a progênie dos sobreviventes à exposição ao Bt for mais tolerante do que populações de campo provenientes de milho convencional, isso é indicativo de uma característica hereditária e a preocupação com problemas de evolução de resistência pode ser ainda maior.

Os objetivos deste trabalho foram documentar o efeito de milho Cry1Ab nas taxas de sobrevivência e desenvolvimento de populações de *S. frugiperda* e determinar se a exposição prévia a esse milho afeta o desempenho fisiológico e reprodutivo ou a susceptibilidade dos descendentes à toxina de Bt.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e criação dos insetos

Larvas de *S. frugiperda* que haviam alimentado por pelo menos três instares foram coletadas em lavouras de milho convencional e transgênico, em cinco das principais mesorregiões produtoras de milho de Minas Gerais em novembro e dezembro de 2010 (Tabela 1). As larvas foram acondicionadas em copos plásticos de 50 ml e tampa acrílica transparente, contendo dieta artificial. No laboratório, foi realizada triagem e separação dos indivíduos sadios, os quais deram início às populações. Essas foram mantidas em sala climatizada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura e 14 h de fotofase, e criadas por três gerações em dieta artificial adaptada de GREENE et al.(1976) no laboratório de Ecotoxicologia de Insetos e Manejo na Embrapa Milho e Sorgo localizada em Sete Lagoas – MG.

Tabela 1. Local de coleta e características das populações de *Spodoptera frugiperda* utilizadas no presente estudo.

Região	Município	Lavoura de milho	Nº de indivíduos coletados	Nº adultos obtidos
Oeste	Iguatama	Convencional	48	39
		Bt	140	100
Central	Inhaúma	Convencional	140	100
		Bt	96	70
Vertentes	Nazareno	Convencional	140	100
		Bt	140	100
Triângulo	Romaria	Convencional	177	81
		Bt	200	109
Noroeste	Varjão de Minas	Convencional	214	196
		Bt	83	78

2.2 Cultivo do milho para montagem dos experimentos

Para obtenção das folhas utilizadas na alimentação dos insetos durante a condução dos experimentos de laboratório, realizou-se o plantio escalonado a campo do híbrido simples P30F35Y (que expressa a toxina Cry1Ab de Bt) e seu isogênico P30F35 no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo. Foram utilizadas as práticas normais para o cultivo do milho, exceto aplicação de inseticidas, que não foi realizada. As folhas utilizadas para alimentação das larvas foram retiradas de plantas em estado vegetativo de desenvolvimento entre as fases v6-v8.

2.3 Resposta das populações à exposição a Cry1Ab em laboratório

O experimento foi realizado no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos entre os meses de fevereiro a abril de 2011, em ambiente controlado com temperatura a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14h. Foram comparadas a sobrevivência, o desenvolvimento e as taxas de crescimento populacional dos insetos coletados em diferentes localidades de plantio de milho convencional e Bt Cry1Ab submetidas à alimentação em folhas de milho Bt Cry1Ab e convencional.

2.3.1 Sobrevivência de neonatas

Foram confinadas cinco larvas recém-eclodidas (1 dia) por copo de 50 ml contendo secções de folhas da região do cartucho. O número de insetos vivos e mortos foi anotado 48h após a infestação. A sobrevivência das larvas de cada população foi avaliada num esquema fatorial ($5 \times 2 \times 2$) referente à combinação entre o local de coleta da população, o milho no qual ela foi originalmente coletada e o milho oferecido como

dieta e 4 repetições. Foram utilizados 48 copos com 5 lagartas totalizando 240 insetos por tratamento. Cada 12 copos de 50 ml com as larvas constituiu uma repetição. Foi calculada a sobrevivência corrigida em relação aos insetos da dieta de milho convencional (testemunha) usando procedimento análogo ao proposto por ABBOTT (1925). A sobrevivência das larvas durante todo o desenvolvimento larval foi avaliada num segundo bioensaio descrito abaixo.

2.3.2. Desenvolvimento da fase imatura

As larvas de 48h sobreviventes de cada população do experimento anterior (2.3.1) foram transferidas individualmente para copos de 50 ml contendo secções de folhas do mesmo tratamento, totalizando 72 larvas/população. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, onde cada bandeja com 24 larvas foi considerada uma repetição. As folhas coletadas em campo foram limpas e secas e cortadas em secções de 2 cm. As secções foliares oferecidas como alimento às larvas foram trocadas a cada 2 dias até a pupação e a mortalidade foi anotada até a emergência dos adultos. Aos 14 dias todas as lagartas tiveram sua biomassa mensurada. No primeiro dia de observação da fase de pupa, registrou-se a biomassa destas com o uso de balança de precisão (0,1 mg).

O período larval foi estimado somente para os insetos sobreviventes até a fase de pupa, contando-se o número de dias desde a eclosão das larvas até a observação da pupa. O período pupal foi estimado somente para os indivíduos que chegaram à fase adulta, sendo contado desde o primeiro dia de observação da pupa até a emergência do adulto. As pupas foram sexadas para que pudessem ser formados casais e avançar a geração para ser usada no próximo experimento.

2.3.3 Estimativas de taxas de crescimento populacional

Este experimento foi realizado utilizando os adultos resultantes do experimento anterior (2.3.2). Para cada tratamento, ao emergirem os adultos, foram formados casais aleatórios e estes foram colocados em gaiolas de reprodução, confeccionadas de recipiente plástico, cilíndrico, de 10 x 15 cm, revestidas internamente com papel branco liso e fechadas na extremidade superior com tecido tipo organza, preso com elástico. Os adultos foram alimentados com solução de água, açúcar comercial a 10% e ácido ascórbico a 1%, fornecida por capilaridade através de pedaços de algodão mantidos em copos plásticos de 50ml, renovados a cada dois dias. Foram avaliados 10 casais (repetições) por tratamento, para determinação dos parâmetros reprodutivos de cada uma das populações, exceto para as populações que apresentaram número inferior de adultos vivos.

Diariamente foi observada a mortalidade dos adultos e feita a retirada das massas de ovos, que foram mantidas em sacos plásticos de 15x10cm e verificadas diariamente. As larvas que eclodiram dessas posturas foram contabilizadas. Os dados de desenvolvimento, sobrevivência e reprodução dos adultos foram usados para estimar os parâmetros da tabela de vida de fertilidade para as populações de *S. frugiperda* provenientes de cada local e milho e criadas em cada uma das dietas. Os parâmetros de crescimento populacional foram determinados como descrito por BIRCH (1948) e CAREY (1993) usando um protocolo do SAS descrito por MAIA et al (2000).

2.4 Desempenho das populações de *S. frugiperda* e injúria causada no milho Bt em casa de vegetação

O experimento foi realizado em casa de vegetação, nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, entre os meses de fevereiro e abril de 2011. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2 (localidade de coleta x milho no qual a larva foi coletada). Foram utilizados 10 vasos com 4 plantas de milho 30F35 Yg para cada população testada, sendo o vaso a parcela experimental. As plantas foram adubadas semanalmente com o fertilizante BIOFERT plus® que contém os macro e micronutrientes necessários ao completo desenvolvimento, floração e frutificação das plantas. A concentração utilizada foi de 1,5ml/l de água e, em cada vaso foi utilizado 0,5 litros da diluição.

Em cada uma das plantas do vaso foram colocadas 5 larvas neonatas da LCM, totalizando 20 larvas por vaso. Foi avaliada a injúria causada pelas larvas aos 7, 14 e 28 dias. Aos 14 dias foi também realizada a coleta de metade das repetições (5 vasos) para a determinação da sobrevivência e biomassa das larvas. Aos 28 dias os vasos restantes foram examinados à procura de pupas para determinação da sua biomassa e sobrevivência. Para a avaliação do nível de injúria, foi utilizada escala de notas variando de 0 a 5, a qual foi adaptada daquela proposta por CARVALHO (1970), sendo: 0) plantas com ausência de dano; 1) plantas apresentando folhas raspadas; 2) plantas apresentando folhas furadas; 3) planta com lesão nas folhas e no cartucho; 4) plantas com o cartucho destruído, e 5) plantas com muitas folhas e o cartucho completamente destruído.

2.5 Análises estatísticas

Os dados da história de vida dos indivíduos em estudo foram submetidos à análise de variância multivariada (PROC GLM com a especificação MANOVA; SAS Institute, 2002) e, subseqüentemente, submetidos à análise de variância univariada e teste de média (teste da mínima diferença significativa de Fisher) (PROC GLM; SAS Institute, 2002). Para todas as análises realizadas nesta dissertação, as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias foram atendidas (PROC UNIVARIATE; PROC GPLOT; SAS Institute, 2002), não sendo assim necessária a transformação dos dados.

Os dados de mortalidade dos insetos, a cada avaliação ao longo do ciclo, foram utilizados para análise das curvas de sobrevivência, de onde se obteve estimativas de TL50 (tempo para morte de 50% dos indivíduos) de cada população (PROC LIFETEST; SAS Institute, 2002).

Para o experimento em casa de vegetação, foi realizada análise de variância da sobrevivência larval, nível de injúria e biomassa das larvas e pupas nas datas de avaliação. As médias foram separadas com o teste da mínima diferença significativa (LSD) de Fisher (PROC GLM; SAS Institute, 2002).

3. RESULTADOS

3.1 História de vida comparativa das populações de *S. frugiperda*

3.1.1 Sobrevivência de neonatas

A sobrevivência de larvas neonatas de *S. frugiperda* após 48 horas de alimentação em folha de milho Cry1Ab diferiu significativamente entre as localidades de coleta das populações ($F_{4, 30} = 7,93$; $P = 0,0002$), exposição prévia ao milho Cry1Ab ($F_{1, 30} = 10,33$; $P = 0,0031$) e na interação local $\times$ milho ($F_{4, 30} = 15,58$; $P < 0,0001$). De modo geral, as populações apresentaram sobrevivência inicial acima de 85% ao se alimentarem em milho Bt expressando a toxina Cry1Ab (Figura 1). Populações de Iguatama e Romaria provenientes de larvas previamente expostas sobreviveram significativamente menos que as não expostas enquanto o contrário foi visto nas populações de Varjão (Figura 1).

Aos 14 dias, a sobrevivência de larvas em milho Bt não diferiu significativamente em relação à exposição prévia ao milho Bt ($F_{1, 19} = 0,41$; $P = 0,5278$). Já o local de coleta das populações ($F_{4, 19} = 5,82$; $P = 0,0031$). e a interação local $\times$ exposição prévia ($F_{4, 19} = 3,41$; $P = 0,0292$) interferiram significativamente na sobrevivência. As populações de Iguatama Bt ($75,6 \pm 4,1$) e Inhaúma-Bt ($75,4 \pm 7,2$) apresentaram a maior sobrevivência aos 14 dias enquanto que Romaria-Cv ($22,2 \pm 3,1$) apresentaram menor porcentagem de sobrevivência.

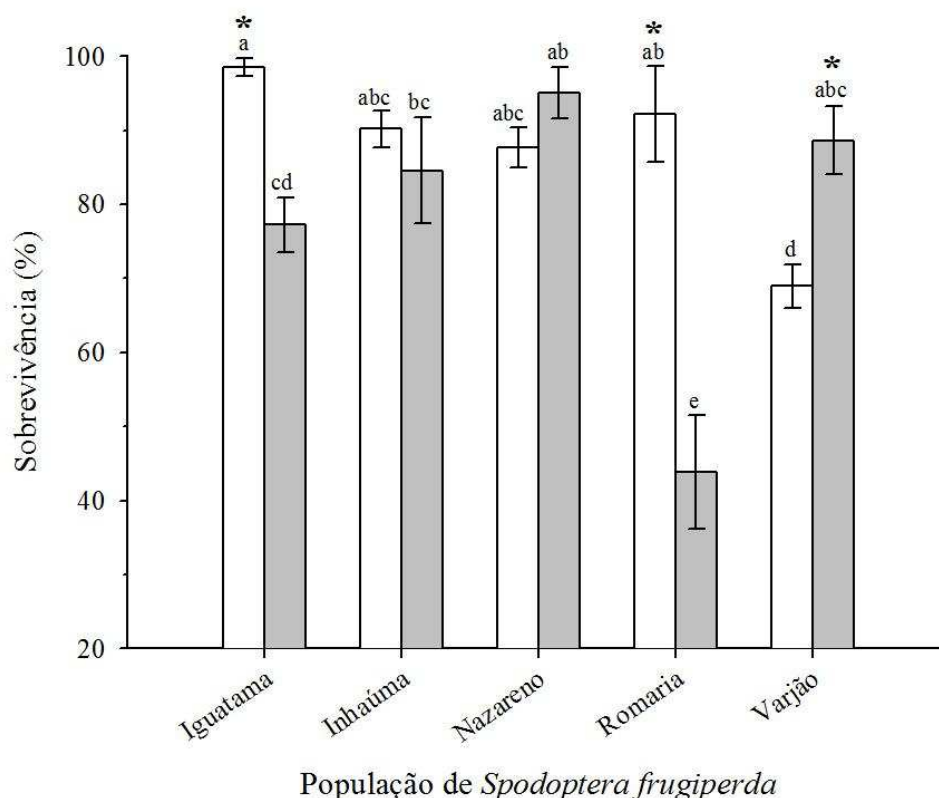


Figura1. Sobrevivência de larvas neonatas de populações de *Spodoptera frugiperda* após 48 horas de alimentação em folhas de milho Bt Cry1Ab. Os dados foram corrigidos pela sobrevivência dos indivíduos em folhas de milho convencional (controle). Colunas claras correspondem a indivíduos provenientes de milho convencional; colunas cinzas, insetos de milho Cry1Ab. Médias $\pm$ erro padrão com * diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P < 0,05$). Letras diferentes representam diferentes médias.

3.1.2 Sobrevivência ao longo de uma geração

Análise conjunta das curvas de sobrevivência indicou haver interação entre local x exposição prévia x dieta ($\chi^2 = 489,12$; GL = 19; $P < 0,0001$) na mortalidade dos indivíduos, assim foram confeccionadas curvas para cada população para observar a influência da exposição prévia (milho de coleta) e crônica (dieta oferecida) ao milho Cry1Ab (Figura 2).

Na Tabela 2 é apresentado o tempo para morte de 50% dos indivíduos (TL_{50}) das diferentes populações quando alimentados em folha de milho Cry1Ab e convencional. Para larvas alimentadas com folhas de milho convencional, (i.e. testemunha), a mediana de longevidade (TL_{50}) variou de 43 a 29,5 dias entre as populações.

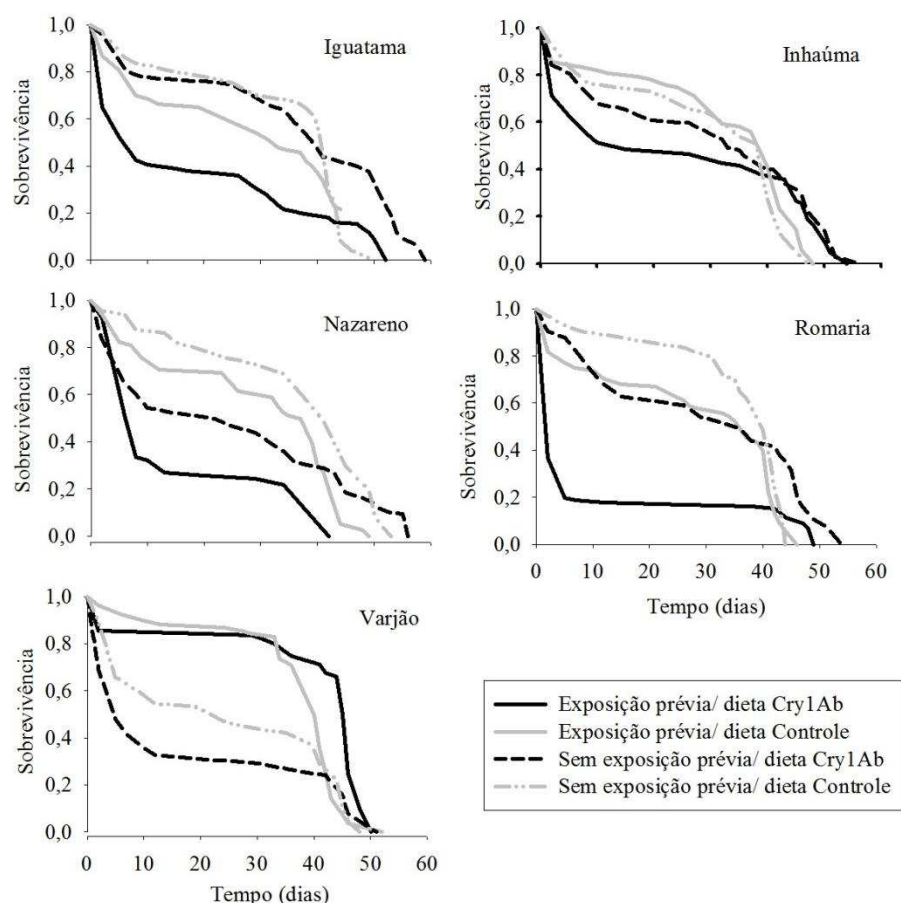


Figura 2. Curvas de sobrevivência das populações de *S. frugiperda* testadas ao longo de uma geração. O experimento foi iniciado com 72 indivíduos para cada população.

Tabela 2. Tempo letal para 50% dos indivíduos em dias (TL_{50}) de populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt Cry1Ab e convencional e criadas em folha de milho convencional (controle) e Bt Cry1Ab.

	Dieta fornecida			
Município de coleta	Controle		Cry1Ab	
	Insetos coletados em milho Convencional (i.e., sem exposição prévia)			
Iguatama	41	(40 - 42)	41	(36 - 50)
Inhaúma	40	(35 - 40)	39	(33 - 45)
Nazareno	43	(41 - 47)	31	(22 - 36)*
Romaria	40	(38 - 42)	38	(29 - 45)
Varjão	29,5	(12 - 41)	12	(7 - 39)
	Insetos coletados em milho Cry1Ab (i.e., com exposição prévia)			
Iguatama	38	(31 - 42)	29	(15 - 33)*
Inhaúma	40	(40 - 42)	44	(32 - 45)
Nazareno	39	(33 - 40)	8	(6 - 8)*
Romaria	40	(37 - 41)	12	(5 - 44)
Varjão	41	(40 - 42)	45	(34 - 46)

Médias $\pm$ intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC95%). Asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$ pelo IC95%) entre dieta controle e Bt.

A população de Nazareno foi a única que apresentou diferença no tempo letal quando comparado indivíduos sem exposição prévia à toxina, se alimentando em folhas de milho convencional e Cry1Ab, sendo que os indivíduos alimentados de folha de milho convencional apresentaram uma TL_{50} maior que os alimentados com milho Cry1Ab.

Já nas populações tratadas com dieta a base de folha de milho Bt Cry1Ab, o TL_{50} variou de 45 a 8 dias. Os insetos de Romaria, coletados em milho Cry1Ab, apresentaram um dos mais baixos valores de TL_{50} (i.e. estiveram entre os mais suscetíveis à toxina do milho Cry1Ab). O TL_{50} médio para as populações alimentadas com a dieta de milho convencional foi de 39,1 dias e para as populações tratadas com milho Cry1Ab foi de 30 dias, indicando o efeito da toxina das folhas Cry1Ab na mortalidade dos indivíduos. Pelo critério de não-sobreposição dos intervalos de confiança, as populações de Iguatama e Nazareno coletadas em milho Cry1Ab sofreram redução significativa ($P < 0,05$) no TL_{50} pela dieta com toxina de Bt em relação à dieta controle. Por outro lado, os insetos de Inhaúma e Varjão coletados em milho Bt estiveram entre os menos suscetíveis a esse, apresentando os mais elevados valores de TL_{50} .

Ao final da fase imatura, a sobrevivência em folha de milho Bt Cry1Ab diferiu entre as populações, havendo efeito significativo da interação local $\times$ milho ($F_{4, 20} = 6,59$; $P = 0,0015$), mas não do local de coleta e nem do milho de origem isolados ($P > 0,05$) (Figura 3). Indivíduos pertencentes às populações de Inhaúma e Varjão previamente expostas ao milho Cry1Ab sobreviveram mais que os seus correspondentes sem exposição prévia. Entretanto, o inverso ocorreu com a população de Iguatama, cujos indivíduos coletados em milho Bt sobreviveram significativamente menos que os de mesma localidade coletados em milho convencional (Figura 3).

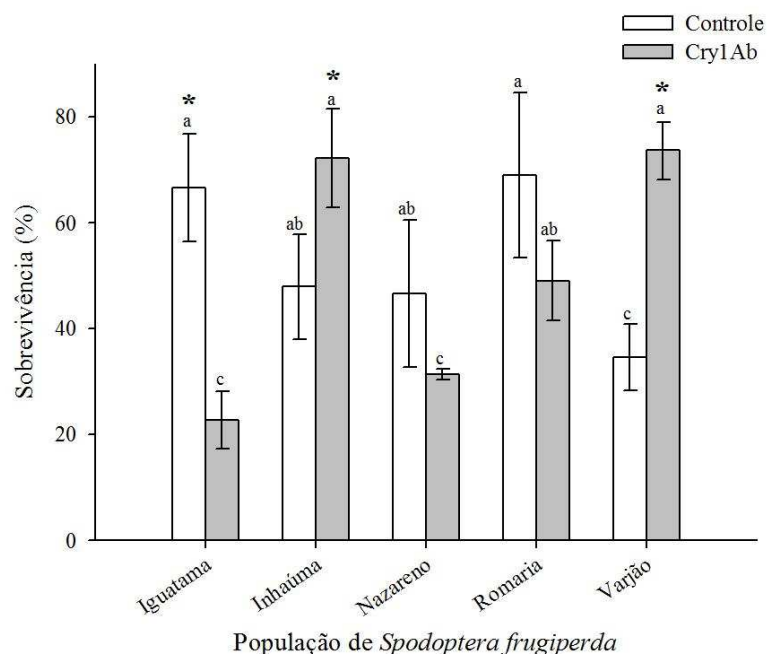


Figura 3. Sobrevivência até a fase adulta de populações de *Spodoptera frugiperda* criadas em folha de milho Cry1Ab. Colunas claras correspondem a indivíduos provenientes de milho convencional; colunas cinzas, insetos de milho Cry1Ab. Médias $\pm$ erro padrão com * diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($p < 0,05$).

3.1.3 Crescimento e desenvolvimento da fase imatura

O acúmulo de biomassa e o tempo de desenvolvimento de cada fase, avaliados nas populações de *S. frugiperda*, diferiram entre a localidade de coleta ($F_{30, 2894} = 9,92$; $P < 0,0001$), milho de origem ($F_{5, 723} = 15,94$; $P < 0,0001$), dieta fornecida às larvas, e para a interação local $\times$ milho $\times$ dieta ($F_{20, 2398,9} = 2,36$; $P = 0,0006$), bem como para as demais interações.

A interação tripla entre local $\times$ milho $\times$ dieta não foi significativa ($P > 0,05$) para a biomassa larval aos 14 dias e a duração da fase de larva a adulto, porém foi significativa para as demais características avaliadas. Todos os fatores em estudo e suas interações afetaram significativamente ($P < 0,05$) o período larval. O tempo e massa pupal não foram afetados pelo milho de origem e interação milho $\times$ dieta. O fator que

mais influenciou as diferenças no crescimento e desenvolvimento das populações foi a dieta fornecida às larvas, apresentando o maior valor de F observado.

Na Tabela 3 é apresentada a massa larval aos 14 dias para as populações tratadas com dieta de folha de milho Cry1Ab e controle. Essa variável foi significativamente maior nos insetos alimentados com folha da dieta controle comparadas aqueles alimentados com o milho Cry1Ab ($F = 1182,09$, $P < 0,0001$)

A biomassa média das populações alimentadas com milho convencional foi de 253,06 mg, enquanto que as populações alimentadas com milho Bt Cry1Ab tiveram biomassa média de 49,19 mg, o que representa uma porcentagem de inibição de crescimento média de 80,56%. Grande parte das populações também apresentaram diferenças significativas entre as médias da biomassa das lagartas quando comparadas no que diz respeito ao milho no qual elas foram coletadas, sendo que nas populações coletadas em Iguatama e Inhaúma os insetos apresentaram maior biomassa larval aos 14 dias quando alimentadas com o mesmo milho na qual foram coletados.

As populações coletadas em milho Cry1Ab em Varjão e Inhaúma apresentaram significativamente menor inibição de crescimento de suas larvas pela toxina do milho Bt relativo às populações de mesmo local coletadas no milho convencional, indicando uma possível redução de suscetibilidade à toxina do milho Bt (Figura 4).

Tabela 3. Massa larval aos 14 dias (mg) de populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt e convencional em diferentes regiões de Minas Gerais e criadas em folha de milho convencional (controle) e Cry1Ab.

Município de coleta	Massa larval (mg)	
	Testemunha	Cry1Ab
Insetos coletados em milho Convencional		
Iguatama	220,6 ± 11,0 e	19,6 ± 2,2* fg
Inhaúma	215,9 ± 12,8 de	22,3 ± 4,2* g
Nazareno	135,5 ± 8,2 fg	25,6 ± 3,3* e
Romaria	287,4 ± 15,9 bcd	45,8 ± 5,1* c
Varjão	293,7 ± 20,4 ab	52,1 ± 9,1* cd
média	230,62 ± 13,66	33,8 ± 4,78
Insetos coletados em milho Cry1Ab		
Iguatama	149,1 ± 11,8 f	22,7 ± 3,3* def
Inhaúma	211,0 ± 12,6 e	50,7 ± 6,0* c
Nazareno	290,7 ± 19,0 bc	74,3 ± 12,0* ab
Romaria	325,9 ± 17,7 ab	53,4 ± 4,2* bc
Varjão	400,8 ± 19,0 a	121,8 ± 11,9* a
média	275,5 ± 16,02	64,58 ± 7,48

Médias ± erro padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P < 0.05$). Asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$) entre dieta controle e Bt.

¹ Cv, milho convencional não-transgênico; Bt, milho transgênico expressando toxina de *B. thuringiensis*.

² Número de indivíduos.

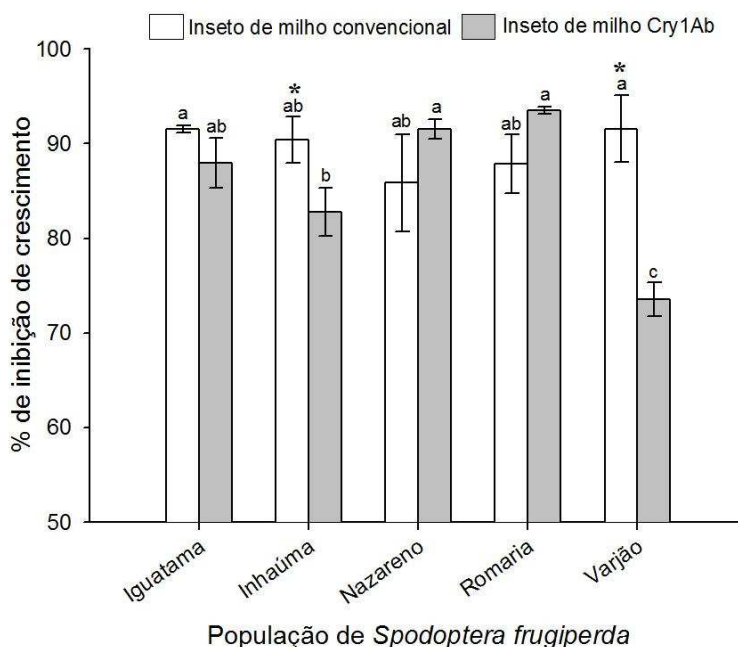


Figura 4. Inibição de crescimento em larvas de populações de *Spodoptera frugiperda* aos 14 dias. Colunas claras, indivíduos de milho convencional; colunas cinzas, insetos de milho Bt. Médias ± erro padrão seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P < 0,05$).

A biomassa pupal foi maior nas populações tratadas com milho convencional quando comparadas com aquelas tratadas com milho Cry1Ab independente da exposição anterior à toxina, exceto para a população de Iguatama coletada em milho convencional na qual a biomassa pupal não variou em função da dieta oferecida (Tabela 4).

Tabela 4. Massa pupal (mg) de populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt e convencional em diferentes regiões de Minas Gerais e criadas em folha de milho convencional (controle) e Bt.

Município de coleta	Massa pupal (mg)		%RP ¹
	Controle	Cry1Ab	
Insetos coletados em milho Convencional			
Iguatama	208,1 ± 3,7 d	202,3 ± 5,4 ab	2,8
Inhaúma	252,3 ± 3,8 ab	191,9 ± 7,1* bc	24,0
Nazareno	226,4 ± 3,7 c	202,7 ± 5,8* ab	10,5
Romaria	266,3 ± 3,8 a	190,7 ± 6,6* cd	28,4
Varjão	230,8 ± 4,8 c	195,2 ± 5,3* abc	15,5
média	236,78 ± 3,96	196,56 ± 6,04	
Insetos coletados em milho Cry1Ab			
Iguatama	239,4 ± 4,2 c	212,3 ± 12,4* a	11,3
Inhaúma	246,7 ± 5,0 b	201,9 ± 5,9* ab	18,1
Nazareno	231,8 ± 5,2 c	206,0 ± 8,3* a	11,1
Romaria	230,8 ± 2,9 c	189,1 ± 7,6* bcd	18,1
Varjão	247,2 ± 3,9 b	212,8 ± 5,1* a	13,9
média	239,18 ± 4,24	204,49 ± 6,95	

Médias ± erro padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P < 0.05$). Asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$, teste t) entre dieta controle e Bt.

¹ Porcentagem de redução de biomassa relativo ao controle.

Na Figura 5 são apresentadas a duração média da fase larva e pupa e longevidade de adultos das populações de *S. frugiperda* em estudo. O tempo total de desenvolvimento da fase imatura variou entre as populações (interação Local x Milho) e em relação à dieta oferecida, sendo maior para todas as populações tratadas com milho Bt Cry1Ab (Figura 5). A média do tempo de desenvolvimento foi de 32,3 dias para as populações tratadas com milho convencional e 38,9 dias para as tratadas com milho Bt

Cry1Ab. Essa toxina no milho Bt atrasou, em média, cerca de uma semana o tempo de desenvolvimento da fase imatura de *S. frugiperda*.

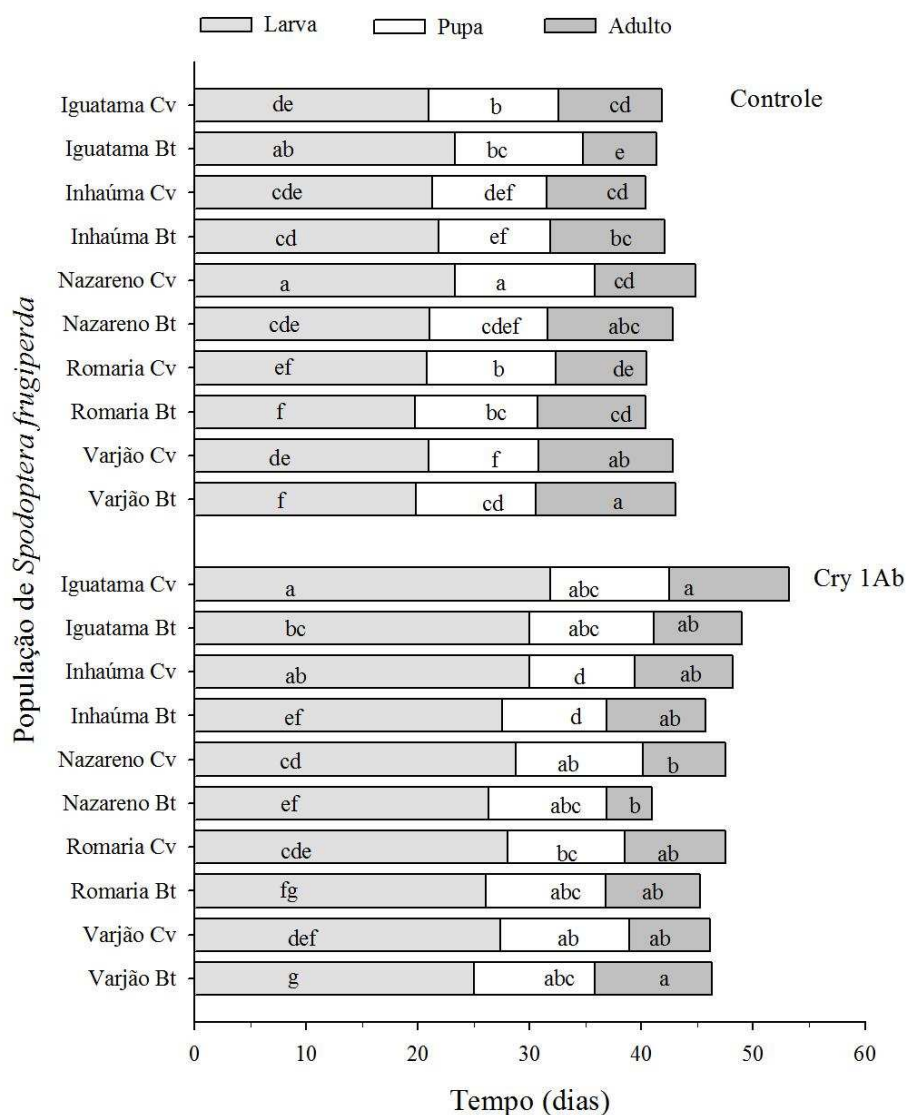


Figura 5. Duração média da fase de larva e pupa e longevidade de adultos de populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt e convencional quando criadas em folha de milho convencional (controle) e Bt. Para cada tipo de dieta fornecida, barras da mesma cor, contendo mesma letra, não diferem entre populações pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P > 0,05$).

O tempo larval foi maior para as populações submetidas à alimentação em folha de milho Bt relativo àquelas que alimentaram de folha de milho convencional. O tempo larval médio foi de 21,3 dias para as populações tratadas com milho convencional e de 28,2 dias quando tratadas com milho Bt, havendo um atraso médio de uma semana devido à diferença de alimento.

Algumas populações coletadas em milho Bt como Varjão, Nazareno e Inhaúma apresentaram tempo de desenvolvimento larval menor que suas correspondentes coletadas em milho convencional, independente da dieta a qual foram submetidas, mas principalmente na presença da toxina de Bt. As larvas de Iguatama tiveram um desenvolvimento larval mais rápido quando alimentadas com o mesmo milho no qual ela foi originalmente coletada. As média de tempo de desenvolvimento larval das populações tratadas com milho convencional variou de 19,7 dias em Romaria coletada em milho Bt a 23,3 dias em Iguatama coletada em milho Bt. As médias das populações alimentadas em milho Bt variaram entre 25 dias em Varjão coletada em milho Bt e 31,8 dias em Iguatama coletada em milho convencional.

Também houve diferença significativa no tempo pupal entre as populações coletadas em milho convencional quando tratadas com milho Bt e convencional (Figura 5). As populações coletadas em milho Bt não apresentaram diferença no tempo em que passaram como pupa quando alimentados com dieta convencional e Bt.

Entre populações coletadas em mesma localidade porém em milho diferente só houve diferença significativa no tempo larval entre a população coletada em Nazareno, a qual os indivíduos coletados em milho convencional apresentaram maior tempo pupal que os indivíduos coletados em milho Bt e a população de Varjão, na qual indivíduos coletados em milho convencional tiveram tempo pupal menor comparados àqueles coletados em milho Bt quando alimentados com milho convencional.

3.1.4 Tabela de fertilidade e crescimento populacional

No geral, as estimativas das taxas de crescimento populacional dos indivíduos alimentados com folhas de milho Cry1Ab foram inferiores àquelas obtidas para o grupo de larvas tratadas com milho convencional (Tabela 5). Algumas populações, como

Iguatama e Romaria coletadas em milho Bt Cry1Ab e Varjão coletada em milho Bt e convencional apresentaram redução de cerca de 50% nas taxas de crescimento populacional quando alimentadas em milho Cry1Ab. A cohort da população de Nazareno coletada em milho Bt foi levada à extinção quando submetida ao tratamento com folha de milho Bt, pois não houve reprodução devido à mortalidade dos indivíduos, o que evidencia sua susceptibilidade ao milho Bt.

As taxas de crescimento populacional das populações coletadas em milho Cry1Ab foi variável com o local de coleta, sendo que algumas populações apresentaram desempenho reprodutivo semelhante aos encontrados para as populações do mesmo local, mas provenientes de milho convencional. Importantemente, o tempo médio de uma geração foi maior para as populações tratadas com milho Bt, exceto na população de Nazareno coletada em milho convencional, no qual não foi detectada diferença neste parâmetro.

Por outro lado, das populações coletadas em milho Bt, Varjão apresentou maior taxa reprodutiva líquida (R_0), menor tempo de geração (T), levando assim à maior taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) tanto em folha de milho Bt quando em folha de milho convencional. Isso indica que a sobrevivência dessa população no milho Cry1Ab tem base genética, sendo este um caráter herdável e portanto transmitido aos descendentes e aparentemente sem um custo adaptativo associado.

Tabela 5. Parâmetros da tabela de fertilidade para populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt Cry1Ab e convencional em diferentes regiões de Minas Gerais e criadas em folha de milho convencional (controle) e Bt Cry1Ab.

Local de coleta	Milho de origem	R ₀ (♀/♀)		r _m (♀/♀*dia)		T (dias)	
		Controle	Bt	Controle	Bt	Controle	Bt
Iguatama	Cv	145,3 ± 37,6 bc	70,6 ± 26,9* b	0,157 ± 0,008 c	0,106 ± 0,010 * b	31,7 ± 0,80 c	40,2 ± 1,3 * a
	Bt	9,0 ± 62,0 c	9,3 ± 17 c	0,114 ± 0,025 d	0,064 ± 0,051 c	32,7 ± 0,80 b	37,8 * b
Inhaúma	Cv	177,1 ± 56,5 b	53,1 ± 16,4* b	0,172 ± 0,008 b	0,111 ± 0,012 * b	30,2 ± 0,90 de	36 ± 1,3 * cd
	Bt	237,1 ± 97,2 ab	75,1 ± 33,2* b	0,173 ± 0,014 b	0,122 ± 0,013 * ab	31,6 ± 0,80 c	35,6 ± 0,7 * d
Nazareno	Cv	90,2 ± 57,8 c	84,5 ± 60,3 ab	0,128 ± 0,019 d	0,124 ± 0,024 ab	35,4 ± 1,10 a	36,2 ± 2,0 cd
	Bt	67,5 ± 49,7 c	ND ¹	0,146 ± 0,032 cd	ND	29,2 ± 1,30 ef	ND
Romaria	Cv	105,4 ± 43,6 bc	119,7 ± 22,5 a	0,157 ± 0,013 c	0,133 ± 0,005 a	29,8 ± 0,50 de	36,1 ± 1,1 * cd
	Bt	89,8 ± 42,4 c	15,1 ± 27,8* c	0,153 ± 0,016 c	0,078 ± 0,052 * c	29,5 ± 0,30 e	37,1 ± 0,3 * c
Varjão	Cv	154,9 ± 16,6 b	20,2 * c	0,167 ± 0,005 b	0,085 * c	30,2 ± 0,50 d	35,2 * d
	Bt	332,3 ± 55,2 a	100,3 ± 57* ab	0,203 ± 0,007 a	0,131 ± 0,015 * a	28,6 ± 0,50 f	35,3 ± 0,4 * d

Médias ± intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC95%) seguidas por mesma letra na coluna não diferem significativamente (P > 0,05) com base no erro estimado pelo método de Jackknife (Maia et al 2000). Asterisco indica diferença significativa (P < 0,05 pelo IC95%) entre dieta controle e Bt.

Ro = taxa líquida de reprodução; r_m = taxa intrínseca de crescimento populacional; T = tempo médio de geração.

¹ND, Não determinado. Significa que não houve reprodução.

3.2 Desempenho larval e injúria causada no milho Bt em casa de vegetação

Foi observado efeito significativo do local de coleta das populações, da exposição prévia ao milho Bt e interação entre esses fatores na sobrevivência e biomassa das lagartas aos 14 dias de infestação (Tabela 6). Somente nas populações de Iguatama e Varjão os indivíduos provenientes da população previamente exposta a Cry1Ab do milho Bt apresentaram maior sobrevivência e biomassa em relação àqueles do mesmo local sem exposição prévia à toxina. (Figura 6). Entre as populações coletadas em milho Bt, Iguatama e Romaria foram as que apresentaram maior sobrevivência. (Figura 5).

Tabela 6. Resultados da análise de variância para sobrevivência e massa corpórea de indivíduos de *Spodoptera frugiperda* provenientes de diferentes locais coletados em milho Bt e convencional e criados em milho Bt em casa vegetação.

Fonte de variação	GL	Sobrevivência aos 14 dias		Sobrevivência aos 28 dias		Biomassa larval		Biomassa pupal	
		F	P	F	P	F	P	F	P
Local de coleta (A)	4	2,7	0,0438	6,8	0,0003	9,03	<,0001	5,58	0,0003
Milho de origem (B)	1	6,67	0,0136	2,44	0,1258	24,36	<,0001	32,66	<,0001
A × B	4	2,79	0,0391	0,33	0,8568	6,7	<,0001	1,36	0,2482
Resíduo	40					(382)		(221)	

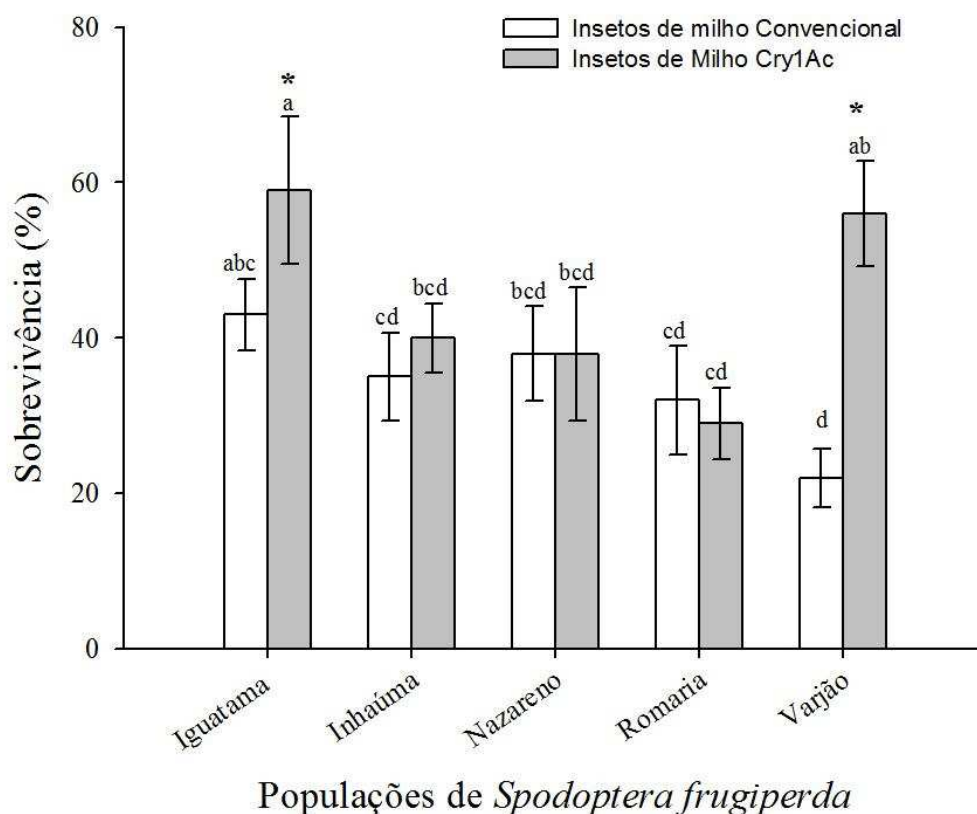


Figura 6. Sobrevivência aos 14 dias das populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt e convencional em diferentes regiões de Minas Gerais e infestadas em milho Bt em casa de vegetação. Barras de erro representam o erro padrão. Colunas contendo mesma letra não diferem entre populações pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P > 0,05$).

Aos 28 dias apenas o local de coleta influenciou na sobrevivência larval, não havendo efeito da exposição prévia ao milho Cry1Ab nem da interação entre os fatores neste parâmetro. As populações dos municípios de Iguatama, Inhaúma e Nazareno apresentaram a maior sobrevivência (Figura 7).

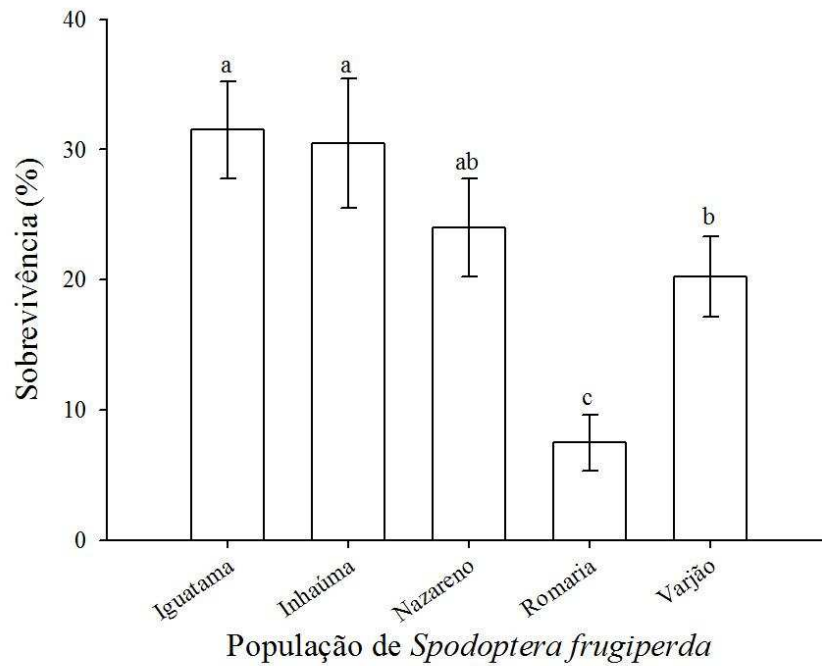


Figura 7. Sobrevivência aos 28 dias das populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas em diferentes regiões de Minas Gerais e tratadas com milho Bt em casa de vegetação. Barras de erro representam o erro padrão. Colunas com mesma letra não diferem entre populações pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P > 0,05$).

Todos os fatores em estudo bem como a interação entre eles contribuíram para as diferenças na biomassa das larvas (Tabela 6). Populações coletadas em plantas de milho Cry1Ab nos municípios de Iguatama, Inhaúma e Varjão apresentaram em média maior biomassa das larvas quando comparadas com populações de mesmo local coletadas em milho convencional (Figura 8).

Das populações coletadas em milho convencional, a população coletada em Nazareno apresentou maior biomassa aos 14 dias e as coletadas em Varjão e Romaria as que apresentaram as menores.

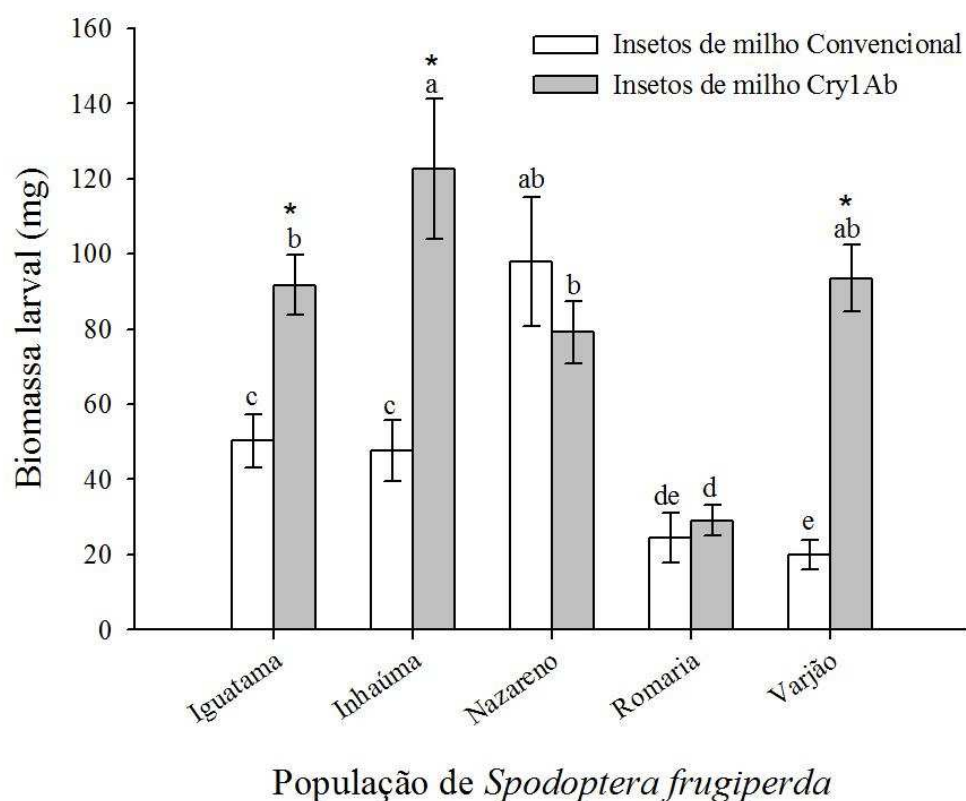


Figura 8. Biomassa das larvas de *Spodoptera frugiperda* aos 14 dias coletadas de lavouras de milho Bt e convencional em diferentes regiões de Minas Gerais. Barras de erro representam o erro padrão. Colunas contendo mesma letra não diferem entre populações pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P > 0,05$). Asterisco indica diferença entre populações previamente expostas ou não à toxina Cry1Ab.

O local de coleta e a exposição prévia ao milho Cry1Ab apresentaram efeito significativo na biomassa pupal, não foi observado, porém, efeito da interação entre esses dois fatores (Tabela 6). A biomassa pupal das larvas com exposição prévia ao milho Cry1Ab foi maior nas populações provenientes de Inhaúma, Nazareno e Romaria quando comparadas com as populações coletadas no mesmo município em milho convencional (Figura 9).

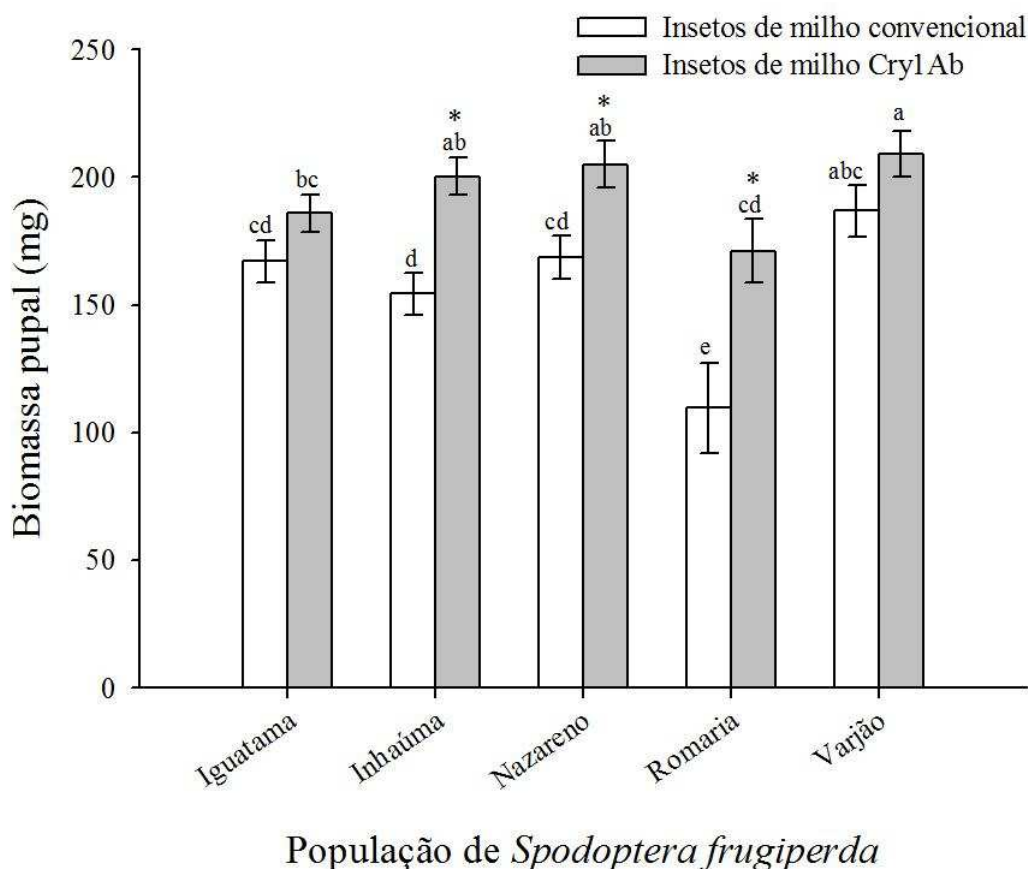


Figura 9. Biomassa das pupas de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt e convencional em diferentes regiões de Minas Gerais. Barras de erro representam o erro padrão. Colunas contendo mesma letra não diferem entre populações pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P > 0,05$). Asterisco indica diferença entre populações previamente expostas ou não à toxina Cry1Ab.

Houve diferença nos níveis de injúria causados pelas populações da LCM aos 7, e 28 dias após a infestação, sendo eles afetados pelo local de coleta das populações, milho origem e a interação entre esses fatores ($P < 0,05$). Aos 14 dias, a única fonte de variação que não apresentou efeito na injúria foi o milho de origem das populações ($P = 0,4318$).

As populações de Iguatama e Romaria coletadas em milho Bt causaram injúria maior que as populações coletadas no mesmo local em milho convencional e o inverso foi observado nas populações coletadas em Nazareno, Romaria e Varjão (Tabela 7). A população que causou menor injúria aos 7 dias foi a de Três Corações. Aos 14 dias,

apenas as populações de Inhaúma e Romaria apresentaram diferença quando comparadas em relação ao milho no qual foram coletadas, sendo que a população de Inhaúma apresentou maior injúria quando coletada de milho Bt e a de Romaria quando coletada de milho convencional. Aos 28 dias, ao final do período larval, apenas as populações de Nazareno e Romaria apresentaram diferença na injúria quando comparadas em relação ao milho no qual foram coletadas, sendo que as populações coletadas em milho Bt nessas duas localidades causaram injúria superior.

Tabela 7. Notas da injúria provocada por lagartas de diferentes populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas de lavouras de milho Bt e convencional em diferentes regiões de Minas Gerais aos 7, 14 e 28 dias após a infestação.

Local	7 Dias		14 Dias		28 Dias	
	Cv	Bt	Cv	Bt	Cv	Bt
Iguatama	2,2 ± 0,2 ab	2,8 ± 0,1 * a	3,0 ± 0,1 a	3,1 ± 0,1 ab	2,6 ± 0,1 d	2,7 ± 0,1 c
Inhaúma	2,1 ± 0,2 ab	2,6 ± 0,1 * a	2,8 ± 0,1 ab	3,2 ± 0,1 *a	3,1 ± 0,1 b	3,3 ± 0,1 b
Nazareno	2,2 ± 0,2 ab	1,6 ± 0,1 * b	3,0 ± 0,1 a	2,8 ± 0,1 c	3,2 ± 0,1 b	4,0 ± 0,0 * a
Romaria	2,4 ± 0,2 a	1,4 ± 0,1 * b	2,8 ± 0,1 ab	2,4 ± 0,1 *d	3,0 ± 0,1 bc	3,9 ± 0,1 * a
Varjão	1,9 ± 0,2 b	1,4 ± 0,1 * b	2,6 ± 0,1 b	2,9 ± 0,1 bc	4,0 ± 0,1 a	4,0 ± 0,0 a

Médias ± erro padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa de Fisher ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença significativa ($P < 0,05$, teste t) entre o milho de origem das populações (Convencional e Bt).

4. DISCUSSÃO

Os objetivos deste trabalho foram documentar o efeito do milho Bt Cry1Ab nas taxas de crescimento e sobrevivência de populações de *S. frugiperda* e determinar se a exposição prévia a esse milho afeta o desempenho fisiológico e reprodutivo ou a susceptibilidade dos descendentes à toxina de Bt. Foi observado que a toxina Cry1Ab do milho Bt reduz a sobrevivência das larvas, porém esse efeito foi variável entre as populações estudadas e com a prévia exposição ao milho Bt. Esses resultados estão de acordo com o encontrado por WAQUIL et al. (2002) FERNANDES et al. (2003) e MENDES et al. (2011), que observaram que o milho Cry1Ab reduz a sobrevivência e o desenvolvimento (ganho de biomassa) das larvas de *S. frugiperda*.

Com 48 horas de alimentação em folha de milho Cry1Ab, os insetos apresentaram sobrevivência acima de 85%, exceto aqueles das populações de Romaria e Iguatama coletados neste milho Bt e de Varjão de milho convencional. Entretanto, houve significativa redução no crescimento das larvas pelo milho Cry1Ab, efeito que foi variável com a população e que não é surpresa pelo que já foi observado anteriormente (FERNANDES et al., 2003).

A sobrevivência até adulto em folhas de milho Cry1Ab variou entre as populações, sendo que a população de Varjão coletada neste milho Bt apresentou maior sobrevivência geral, indicando uma menor susceptibilidade dessa população à toxina. Também Inhaúma-Bt tendeu a sobreviver mais em folhas de milho Bt, porém não houve diferença significativa em relação aos insetos de milho convencional da mesma localidade. O fato de não ter sido observado diferença pode ser devido ao número de indivíduos observados ou talvez ao tempo de criação em dieta, na ausência da pressão de seleção desde a coleta até a realização do experimento tenha levado à redução da frequência de indivíduos com capacidade maior de sobrevivência em folha do milho Bt.

Por outro lado, a população de Romaria coletada no milho Bt apresentou grande mortalidade inicial, e após passar por essa fase mais crítica de mortalidade, a sobrevivência se tornou estável até o final do ciclo.

O Tempo de morte (letal) para 50% dos indivíduos (TL_{50}) observado foi menor nas populações tratadas com milho Bt, devido às maiores mortalidades sofridas por essas durante todo o ciclo, sendo as populações de Varjão-Cv, Nazareno-Bt e Romaria-Bt as que apresentaram o menor TL, dando indícios de uma maior susceptibilidade dessas populações ao Bt. As populações que apresentaram maiores valores de TL foram Varjão-Bt, Iguatama-Cv, Romaria-Cv e Inhaúma-Bt, e os resultados encontrados indicam essas populações como as menos susceptíveis à toxina do Bt entre as populações testadas.

Além da diferença na sobrevivência, foi observado neste trabalho que as larvas submetidas à alimentação no milho Bt apresentaram menor biomassa aos 14 dias e maior tempo de desenvolvimento, resultado este que está de acordo com o relatado por LYNCH et al. (1999), que relataram que a proteção oferecida pela toxina Cry1Ab ao milho Bt contra a infestação por *S. frugiperda* ocorre, primariamente, pela redução da taxa de desenvolvimento e ganho de peso. DUTTON et al. (2005) também obtiveram que *S. littoralis* quando mantida em milho Bt apresentou um prolongamento do período de desenvolvimento de larvas. Foi aqui observado que a inibição do ganho de massa devido à alimentação com milho Bt foi menor para as populações coletadas de milho Bt do que nas coletadas de milho convencional. A inibição no desenvolvimento causada pela alimentação em milho Bt foi mais baixa nas populações que apresentaram maior sobrevivência, demonstrando consistência entre os resultados.

Tem sido hipotetizado que doses potencialmente subletais de toxina em híbridos de milho Bt podem atrasar o desenvolvimento das larvas (LIU et al., 1999, COSTA et al., 2000, NAULT et al. 2000, SIEGFRIED et al. 2001) e, portanto, poderiam

dessincronizar o desenvolvimento dos indivíduos relativo àqueles que se desenvolvem em plantas suscetíveis. Isso pode então alterar a taxa de desenvolvimento de resistência por aumentar o acasalamento preferencial dos indivíduos tolerantes, pois a emergência de adultos de larvas que desenvolvem lentamente deve ocorrer posteriormente à emergência de adultos provenientes de larvas que se desenvolvem em plantas não-Bt. No presente trabalho, foram encontrados resultados que dão subsídios para a comprovação do efeito de dose subletal da toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* em *S. frugiperda*, pois o tempo de desenvolvimento foi cerca de uma semana mais longo e o ganho de peso das larvas foi menor quando as larvas foram tratadas com milho Bt. Efeitos subletais da toxina de Bt no crescimento larval das pragas-alvo também já foram documentados em *Ostrinia nubilalis* (SIEGFRIED et al., 2001) e *Helicoverpa zea* (STORER, 2001).

Uma das grandes preocupações surgidas com o aumento do cultivo do milho transgênico expressando a toxina Bt é a evolução da resistência das pragas-alvo a essa tecnologia. Neste trabalho foi observado que há, de fato, atraso de cerca de uma semana no desenvolvimento das larvas criadas em tecidos de milho Bt relativo às criadas em tecidos de milho convencional podendo favorecer o acasalamento preferencial de indivíduos resistentes. Apesar de o atraso no desenvolvimento facilitar o encontro de indivíduos resistentes, esta maior duração da fase larval expõe os indivíduos por maior tempo aos seus inimigos naturais do que aqueles que não possuem seu ciclo atrasado, podendo haver dessa forma uma maior mortalidade natural desses indivíduos. Em estudos futuros é importante determinar se os indivíduos de *S. frugiperda* sobreviventes de milho Cry1Ab exibem maior incidência de parasitismo e doenças relativo àqueles que se desenvolvem em milho convencional.

As estimativas dos parâmetros da tabela de fertilidade fornecem informações sobre as taxas de crescimento populacional dos indivíduos em estudo. Os valores

obtidos sob alimentação em milho convencional foram ligeiramente inferiores aos encontrados por BARROS et al. (2010). Também foi encontrado que os parâmetros avaliados acima, para populações se alimentando de milho Bt Cry1Ab, se apresentaram inferiores quando comparados com as alimentadas de milho convencional, sendo que houve redução de 50-70% no R_0 e r_m o aumento no tempo de geração (T) de cerca de uma semana, consistente com o atraso no desenvolvimento larval também observado nesse estudo.

Insetos sobreviventes à exposição a toxinas em culturas transgênicas teoricamente podem exibir um custo fisiológico (COUSTAU et al. 2000), o qual pode reduzir seu fitness na ausência da pressão de seleção. Se isso ocorrer, é esperado que as taxas de crescimento populacional dos indivíduos de *S. frugiperda* provenientes de milho Bt se apresentassem inferiores às taxas daqueles provenientes de milho convencional, porém os resultados obtidos para R_0 e r_m neste trabalho não estão de acordo com essa hipótese, pois quando alimentadas em milho convencional, as populações provenientes de Bt apresentaram esses parâmetros semelhantes ao das populações oriundas de milho convencional, ou mesmo superiores como foi o caso dos indivíduos de Varjão coletada em milho Bt.

Nos experimentos realizados em casa de vegetação, obteve-se que as populações de Varjão-Bt e Iguatama-Bt apresentaram maior sobrevivência aos 14 dias e suas larvas apresentaram maior ganho de peso neste mesmo período. Os resultados encontrados para sobrevivência foram consistentes com aqueles encontrados no experimento em laboratório. A população de Inhaúma, embora não seja diferente de seu par coletado em milho Bt em termos de mortalidade, apresentou ganho de massa larval aos 14 dias significativamente superior.

No presente trabalho se indivíduos de *S. frugiperda* sobreviventes em híbridos de milho Cry1Ab tivessem menor a susceptibilidade à toxina de Bt na geração seguinte,

seria indicativo de que esta sobrevivência é uma característica hereditária que pode levar à evolução de resistência à toxina expressa pelo milho Bt. Entre as populações coletadas em milho Bt e utilizadas neste estudo, apenas Varjão apresentou consistentemente melhor desempenho reprodutivo e de desenvolvimento larval, assim como menor mortalidade em folhas de milho Bt. Portanto, pode-se inferir que esta população apresenta menor susceptibilidade à toxina Cry1Ab do milho em estudo, e que essa característica provavelmente é herdável e não associada a um custo adaptativo. Este trabalho representa uma primeira abordagem na questão da variação da susceptibilidade da lagarta-do-cartucho à toxina Cry1Ab expressa pelo milho transgênico após exposição prévia a essas plantas. Bioensaios diagnósticos com a toxina purificada e experimentos de seleção podem fornecer informações mais precisas sobre a susceptibilidade e a herdabilidade dessa característica.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi observado que o desempenho de diferentes populações de *S. frugiperda* em folhas de milho Bt foi inferior ao desempenho no milho convencional, evidenciando o potencial de supressão populacional do milho Bt expressando Cry1Ab, porém esse efeito foi variável entre as populações. Além disso, houve atraso no desenvolvimento das larvas que se alimentam de tecidos de milho Cry1Ab relativo às criadas em tecidos de milho convencional, o que pode favorecer o acasalamento preferencial de indivíduos heterozigotos resistentes caso não houver incremento na mortalidade natural desses indivíduos no campo.

Apenas uma população coletada em milho Bt Cry1Ab em Varjão de Minas apresentou evidência de menor susceptibilidade à toxina expressa na planta, característica que parece ser herdável e sem aparente custo adaptativo. Também as populações de Inhaúma coletada em milho Cry1Ab e Romaria coletada em milho convencional apresentaram indícios de maior tolerância ao milho Cry1Ab. Ensaios posteriores com a descendência desses insetos testados poderão ser conduzidos para confirmar a herdabilidade dessa característica nas populações citadas acima, o que fornecerá informações importantes para o manejo de resistência de *S. frugiperda* ao milho Bt.

Para nosso conhecimento, esse é um dos primeiros estudos a abordar o problema de resistência de insetos a plantas transgênicas na praga-chave da cultura do milho no Brasil. Tais estudos devem ser refinados e ampliados para outras espécies de insetos alvo da tecnologia Bt em outras culturas visando a sustentabilidade desse importante método de controle pragas na agricultura brasileira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v.18, p.265-267, 1925.
- ARANDA, E., SANCHEZ, J., PEFEROEN, M., GUERECA, L., BRAVO, A.. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, v.68, p. 203-212. 1996.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B., BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology*, v.39(6), p. 996-1001, 2010.
- BIRCH, L. C. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *J Anim Ecol* v.17, p.15-26, 1948.
- BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1667, p.38-46, 2004.
- BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; LAWRENCE, I. G.; KOSTAS, I.; SARJEET, S. G. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. In: LAWRENCE, I. G.; KOSTAS, I.; SARJEET, S. G. (Ed.). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Amsterdam: Elsevier, v.6, Cap.6. p.175-205, 2005.
- BRODERICK, N. A.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.103, p.15196-15199, 2006.
- CAREY, J. R. *Applied demography for biologists*. New York, Oxford University. 206p. 1993.
- CARVALHO, R.P.L. Danos, flutuações da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo. Piracicaba-SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 170p. Tese (Doutorado em Agronomia). 1970.
- COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBIO. Parecer Técnico nº 1255/2008 - Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos Evento BT 11 - Processo 01200.002109/2000-04. Brasília: Ministério da Ciência Tecnologia, 2008a. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11055.html>>. Acesso em: 07 ago. 2010.
- COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBIO. Parecer Técnico nº 1679/2008 - Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos da Ordem Lepidoptera e Pragas do Milho, Evento TC1507 - Processo nº 01200.007232/2006-07. Brasília: Ministério da Ciência Tecnologia, 2008b. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12633.html>>. Acesso em: 07 ago. 2010.

- COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBIO. Parecer Técnico nº 2042/2009 - Liberação Comercial de Milho Geneticamente Modificado Resistente a Insetos, Milho MIR 162 - Processo nº 01200.007493/2007-08 Brasília: Ministério da Ciência Tecnologia, 2008c. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14027.html>>. Acesso em: 07 ago. 2010.
- COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA - CTNBIO. Parecer Técnico nº 2052/2009 - Liberação Comercial de Milho Resistente a Insetos Evento MON 89034 - Processo nº 01200.003326/2008-61. Brasília: Ministério da Ciência Tecnologia, 2009. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14098.html>>. Acesso em: 07 ago. 2010.
- COSTA, S. D.; BARBERCHECK, M. E.; KENNEDY, G. G.. Sublethal acute and chronic exposure of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the - endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol., v.93, p.680-689, 2000.
- COUSTAU, C.; CHEVILLON, C.; FRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? Trends in Ecology and Evolution, v.15, p.378-383, 2000.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa, CNPMS, 45p. Embrapa. (CNPMS Circular Técnica, 21), 1995.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. Int J Pest Manag, v.45, p.293-296, 1999.
- CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; SILVA, G. H. Milho - Cultivares para 2009/2010: 362 cultivares de milho convencionais e 136 transgênicas são disponibilizadas no mercado de sementes do Brasil para a safra 2010/11. n. 24/01/2011. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2011.
- DULMAGE, H. T.; GRAHAM, H. M.; MARTINEZ, E. Interactions between the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, and the delta-endotoxin produced by the HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: relationship between length of exposure to the toxin and survival. Journal of Invertebrate Pathology, v.32, p.40-50, 1978.
- DUTTON, A.; ROMEIS, J. BIGLER, F. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. Entomologia Experimentalis et Applicata, v.114, p.161-169, 2005.
- FERNANDES, O.D.; PARRA, J.R.P.; NETO, A.F.; PÍCOLI, R.; BORGATO, A.F.; DEMÉTRIO, C.G.B. Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.2, p.25-35, 2003.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM) in: ROMEIS, J.; SHELTON, A. M.; KENNEDY, G. G. (Ed) Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Springer. v. 5, cap. 3, p. 41-85, 2008.
- GASSER, C. S.; FRALEY, R. T. Genetically engineering plants for crop improvement. Science, v. 244, p. 1293-1299, 1989.

- GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*, v. 37, p. 615-636, 1992.
- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, v.69, p.488-497, 1976.
- JAMES, C. (Ed.) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008*. ISAAA Brief No. 39. Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Ag-biotech Applications, 2009.
- KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, v. 24, p. 275-308, 1994.
- KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DWASON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M. R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G. W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S. V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, New York, v. 11, p. 194-200, 1993.
- LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; PATIN, A. L.; BARTLETT, A. C. Development time and resistance to Bt crops. *Nature*, v. 400, p. 519-519, 1999.
- LYNCH, R.E.; WISEMAN, B.R.; PLAISTED, D.; WARNICK, D. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1A(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v.92, p.246-252, 1999.
- MACINTOSH, S. C.; STONE, T. B.; SIMS, S. R.; HUNST, P. L.; GREENPLATE, J. T.; MARRONE, P. G.; PERLAK, F. J.; FISCHHOFF, D. A.; FUCHS, R. L. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.56, p.258-266, 1990.
- MAIA, A. D. N.; LUIZ, A. J. B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *Journal of Economic Entomology*, v.93, p.511-518, 2000.
- MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M. S.; WAQUIL, J. M. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b). *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.46, n.3, p.239-244, 2011.
- NARANJO, S. E.; HEAD, G.; DIVELEY, G. P. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: introduction. *Environmental Entomology*, v.34, p.1178-1180, 2005.
- NAULT, B. A., S. D. COSTA, AND G. G. KENNEDY. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding, development, and survival to adulthood after continuous exposure to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* treated potato foliage from the field. *J. Econ. Entomol.*, v.93, p.149-156, 2000.
- NOTEBORN, H. P. J. M.; BIENENMANNPLOUM, M. E.; VANDENBERG, J. H. J.; ALINK, G. M.; ZOLLA, L.; REYNAERTS, A.; PENSA, M.; KUIPER, H. A. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1Ab expressed in transgenic tomatoes. *Genetically Modified Foods*, v.605, p.134-147, 1995.

- O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology*, v.50, p.271-292, 2005.
- RAYMOND, M.; BERTICAT, C.; WEILL, M.; PASTEUR, N.; CHEVILLON, C. Insecticide resistance in mosquitoes *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genética*, v.112-113, p.287-296, 2001.
- ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, v.24, p.63-71, 2006.
- ROMEIS, J., SHELTON, A. M., and KENNEDY, G. G. (eds.): *Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*. Springer. 441pp., 2008
- ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Eds.) *Pesticide Resistance in Arthropods*. New York: Chapman and Hall, 304 p., 1990.
- SAS INSTITUTE. SAS user's manual, version 9.1. Cary, NC: SAS Institute, 2002.
- SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology*, v.47, p.845-881, 2002.
- SIEGFRIED, B. D.; SPENCER, T.; CRESPO, A. L.; STORER, N. P.; HEAD, G. P.; OWENS, E. D.; GUYER, D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. *Amer. Entomol.*, v.53, p.208-214, 2007.
- SIEGFRIED, B. D.; ZOERB, A. C.; SPENCER, T. Development of European corn borer larvae on Event 176 Bt corn: influence on survival and fitness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.100, p.15-20, 2001.
- SOBERON, M.; PEREZ, R. V.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; LORENCE, A.; GOMEZ, I.; SANCHEZ, J.; BRAVO, A. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEMS Microbiology Letters*, v.191, p.221-225, 2000.
- STORER, N. P., VAN DUYN, J. W.; KENNEDY, G. G. Life history of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt transgenic corn hybrids in eastern North Carolina. *J. Econ. Entomol.*, v.94, p.1268-1279, 2001.
- TABASHNIK, B. E.; GROETERS, F.R.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Instability of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Sci. Technol.*, v.4, p.419-426. 1994.
- WAQUIL, J. M.; VILELLA, F. M. F.; SIEGFRIED, B. D.; FOSTER, J. E. Biological activity of Bt toxins, Cry 1A(b) and Cry 1F on *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.3, p.161-171, 2004.
- WAQUIL J M, VILLELA F M F, FOSTER J E Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev Bras Milho Sorgo* v.1, p.2-11, 2002.