

# Índice de adaptação e tempo letal da lagarta-do-cartucho em milho Bt

Matheus Soares Waquil<sup>(1)</sup>, Eliseu José Guedes Pereira<sup>(2)</sup>, Samantha Stefannie de Sousa Carvalho<sup>(3)</sup>, Rafael Major Pitta<sup>(4)</sup>, José Magid Waquil<sup>(5)</sup> e Simone Martins Mendes<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>DuPont do Brasil, Alameda Itapecuru, nº 506, Alphaville, CEP 06454-080 Barueri, SP, Brasil. E-mail: mswaquil@gmail.com <sup>(2)</sup>Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, Campus Universitário, CEP 36570-000 Viçosa, MG, Brasil. E-mail: eliseu.pereira@ufv.br <sup>(3)</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG-424, Km 45, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: samanthastefannie@hotmail.com, simone.mendes@embrapa.br <sup>(4)</sup>Embrapa Agrossilvipastoril, Rodovia dos Pioneiros MT-222, Km 2,5, Zona Rural, Caixa Postal 343, CEP 78550-970 Sinop, MT, Brasil. E-mail: rafael.pitta@embrapa.br <sup>(5)</sup>Consultoria & Treinamento em Manejo Integrado de Pragas Ltda., Rua Jovelino Lanza, nº 210, Jardim Arizona, CEP 35700-353 Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: jmwaquil@gmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar o índice de adaptação e o tempo letal de populações da lagarta-do-cartucho [*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)] em milho Bt que expressa as proteínas Cry1Ab, Cry1F, Cry1A.105/Cry2Ab2 e Vip3Aa20. Três bioensaios foram conduzidos com lagartas coletadas em Inhaúma, MG, e em Sinop, MT. As lagartas dessas populações foram alimentadas com folhas de milho não Bt e Bt. As seguintes variáveis foram avaliadas: sobrevivência larval, biomassa de pupas e período de desenvolvimento larval. Em seguida, foram calculados os índices de adaptação e o tempo letal dessas populações. Para a análise do tempo letal, também foram utilizados dados de mortalidade de uma população obtida de milho Bt Cry1F em Piumhi, MG. O milho Bt Cry1Ab apresentou eficiência limitada, mas duradoura. Já os milhos Bt Cry1A.105/Cry2Ab2 e Vip3Aa20 reduziram o desempenho de *S. frugiperda*, respectivamente, a menos de 5 e 0%, independentemente da origem da colônia. A população originada de Sinop apresentou alto desempenho larval no milho Bt Cry1F, o que mostra sua resistência a essa proteína e certo nível de custo adaptativo. O tempo letal pode ser uma variável indicadora de evolução de resistência, pois é maior para as populações com maior adaptação.

Termos para indexação: *Spodoptera frugiperda*, *Zea mays*, desempenho larval, manejo da resistência, manejo integrado de pragas, milho transgênico.

## Fitness index and lethal time of fall armyworm on Bt corn

Abstract – The objective of this work was to evaluate the fitness index and lethal time of fall armyworm [*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)] populations on Bt corn expressing the Cry1Ab, Cry1F, Cry1A.105/Cry2Ab2, and Vip3Aa20 proteins. Three bioassays were conducted with larvae collected at the municipality of Inhaúma, in the state of Minas Gerais, and at the municipality of Sinop, in the state of Mato Grosso, Brazil. Larvae from these populations were fed with leaves of non-Bt and Bt corn. The following variables were evaluated: larval survival, pupae mass, and larval development period. Then, the fitness indexes and lethal time of these populations were calculated. For lethal time analysis, mortality data of a population collected from Cry1F Bt corn in the municipality of Piumhi, in the state of Minas Gerais, were also used. The Cry1Ab Bt corn showed a limited but durable efficiency. The Cry1A.105/Cry2Ab2 and Vip3Aa20 Bt corn reduced *S. frugiperda* performance, respectively, to less than 5 and 0%, regardless of the origin of the colony. The population from Sinop showed high larval performance in Cry1F Bt corn, showing its resistance to this protein and a certain level of fitness cost. The lethal time can be a variable that indicates evolution of resistance, since it is greater for populations with greater fitness.

Index terms: *Spodoptera frugiperda*, *Zea mays*, larval performance, resistance management, integrated pest management, transgenic corn.

## Introdução

Somente na cultura do milho (*Zea mays* L.), no Brasil, os insetos-praga podem causar perdas aproximadas de 20% na produção, de cerca de 2 bilhões de dólares (Oliveira et al., 2014). Para o manejo da principal praga da cultura, a lagarta-do-cartucho [*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

(Lepidoptera: Noctuidae)], têm-se recomendado diversos métodos de controle de forma integrada, como a tecnologia Bt (Boas práticas agronômicas aplicadas a plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos: manejo integrado de pragas, 2014).

Em razão da alta eficácia do milho Bt no controle de lagartas, sua adoção foi rápida no Brasil, e, na safra 2013/2014, o milho transgênico foi utilizado em

81,6% da área cultivada (Céleres, 2013). No entanto, com o uso intensivo dos híbridos Bt, principalmente dos que expressam a proteína Cry1F, vários casos de falha no controle de *S. frugiperda* foram registrados em diversas regiões brasileiras. Uma possível explicação é o baixo uso de refúgio (Resende et al., 2014), prática que tem sido recomendada para o manejo da resistência (Martinelli & Omoto, 2005).

Atualmente, no Brasil, estão liberadas, para comercialização, 16 tecnologias transgênicas para o controle de pragas na cultura do milho, que incluem eventos simples ou piramidados por meio de combinação ou estaqueamento de genes *bt* (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2009). Esses eventos têm como espécies-alvo os lepidópteros-praga e uma espécie de Coleoptera, a larva de diabrótica [*Diabrotica speciosa* (LeConte)] (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2009). Após a aprovação comercial dessas proteínas, foi possível utilizar diferentes combinações destes mesmos genes *bt* em híbridos de milho, para maior eficiência no controle das pragas-alvo, para ampliação do espectro de ação e como estratégia para o manejo da resistência (Martinelli & Omoto, 2005).

Contudo, em menos de 20 anos de uso da tecnologia Bt, já foram registradas quatro espécies de Lepidoptera e uma de Coleoptera resistentes às proteínas Bt (Tabashnik et al., 2014). Entre os casos de resistência observados em outros países, os mais relevantes, para o Brasil, foram os registros de *S. frugiperda* resistente ao milho Bt Cry1F, em Porto Rico (Storer et al., 2010) e nos Estados Unidos (Huang et al., 2014). No Brasil, além da constatação recente de falha no controle de *S. frugiperda* em vários híbridos de milho Bt Cry1F, Farias et al. (2014) também documentaram essa resistência em uma população do inseto, no Oeste da Bahia (BA25R).

Assim, vários estudos têm sido conduzidos para avaliar as lagartas quanto à adaptação em diferentes hospedeiros (Boregas et al., 2013) e à resistência às proteínas Bt (Farias et al., 2014). Nos Estados Unidos, Pereira et al. (2008), por exemplo, utilizaram populações suscetíveis e resistentes à proteína Cry1F, obtidas em 30 ciclos de seleção de *Ostrinia nubilalis* (Hübner), para estimar o custo adaptativo associado à resistência, ou seja, a redução no desempenho ou a adaptação em relação à população selvagem não resistente que se alimentou com o milho não Bt. Assim, a determinação periódica do nível de adaptação das espécies-alvo

da tecnologia Bt, nas plantas transgênicas, torna-se fundamental para antecipar medidas de manejo da resistência, potenciais ou mitigatórias, nos casos de riscos iminentes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o índice de adaptação e o tempo letal de populações da lagarta-do-cartucho [*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)] em milho Bt que expressa as proteínas Cry1Ab, Cry1F, Cry1A.105/Cry2Ab2 e Vip3Aa20.

## Material e Métodos

Foram conduzidos três bioensaios no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, para avaliar o desempenho e o tempo letal de quatro populações de *S. frugiperda* em milho Bt. As lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas: em milho Bt Cry1Ab, no município de Inhaúma, MG (19°30'52"S, 44°25'31"W, a 729 m de altitude), nas safras 2008/2009 e 2010/2011; e em milho Bt Cry1A.105/Cry2Ab2, no município de Sinop, MT (11°51'37"S, 55°37'11"W, a 375 m de altitude), na safra 2014. Para a determinação do tempo letal, além dessas duas populações coletadas em 2010/2011 e 2014, foi utilizada uma população coletada em milho Bt Cry1F, no município de Piumhi, MG (20°33'20"S, 46°01'30"W, a 759 m de altitude), na safra 2010/2011.

Em Inhaúma, o milho Bt Cry1Ab já vinha sendo cultivado desde 2008/2009; portanto, a coleta dos insetos foi realizada durante a terceira safra de uso da tecnologia Bt. Como testemunha, foram utilizados insetos coletados em milho não Bt (DKB 390 e Impacto). Já na safra 2013/2014, com a divulgação da ocorrência de lagartas de *S. frugiperda* em milho Bt em várias regiões brasileiras, amostras de *S. frugiperda* coletadas em milho Bt Cry1A.105/Cry2Ab2, na região de Sinop, foram encaminhadas à Embrapa Milho e Sorgo, onde foi estabelecida uma colônia. As coletas, a manutenção das colônias de insetos no laboratório e a determinação do índice de adaptação foram realizadas de acordo com os métodos descritos por Sousa (2011).

Os híbridos utilizados para alimentação das lagartas foram: P30F35 para as proteínas Cry1F (Milho Bt Hx) e Cry1Ab (Milho Bt YG); DKB 390 não Bt (Milho não Bt DKB) e DKB 390 Bt para a proteína Cry1A.105/Cry2Ab2 (Milho Bt VT PRO); e Impacto não Bt (Milho não Bt Imp) e Impacto Bt para a proteína Vip3Aa20 (Milho Bt Vip). Os milhos Bt Cry1Ab, Cry1F, Cry1A.105/Cry2Ab2 e Vip3Aa20 foram cultivados

no campo, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo. As sementes foram obtidas nas empresas detentoras dos respectivos eventos Bt estudados, e o cultivo seguiu as práticas agrícolas recomendadas para a região (Cruz, 2010), exceto o uso de inseticida, para não interferir com os resultados. Os bioensaios foram iniciados quando havia plantas, dos milhos a serem testados, nos estádios V4–V8, para alimentar as lagartas, de acordo com a metodologia preconizada por Sá et al. (2009) e Mendes et al. (2011), sob iluminação natural e em condições controladas de temperatura ( $26\pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa ( $60\pm 10\%$ ).

Durante a condução dos bioensaios, foram anotadas as seguintes variáveis: sobrevivência (razão), a cada 2 ou 3 dias até a fase de pupa; biomassa (mg) de pupas; e período de desenvolvimento larval (dias), a partir da eclosão das larvas até o primeiro dia em que se observou a pupa. Neste dia, a pupa foi pesada em balança de precisão (0,1 mg) e observada até a emergência do adulto. Ao final, foram calculados a sobrevivência larval, o período de desenvolvimento e a razão sexual. Em todos os bioensaios, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com oito repetições, em arranjo fatorial que envolveu a combinação de duas colônias de lagartas (coletadas em milho não Bt e em milho Bt) e de diferentes híbridos de milho Bt e não Bt utilizados na alimentação dessas lagartas.

Para avaliar o desempenho larval de *S. frugiperda* em híbridos de milho Bt que expressam diferentes proteínas, utilizou-se o índice de adaptação (IA) proposto por Boregas et al. (2013), que avalia o desempenho larval em diferentes hospedeiros alternativos, em que:  $\text{IA} = \text{sobrevivência larval (\%)} \times \text{biomassa de pupas (mg)} / \text{período de desenvolvimento larval (dias)}$ ; no cálculo do índice de adaptação, a biomassa de pupas foi utilizada para estimar a fecundidade dos adultos (Barah & Sengupta, 1991). Com base neste índice, também calculou-se o índice relativo de adaptação, por meio da divisão do índice de adaptação de cada tratamento pelo índice de adaptação da testemunha (neste caso, lagartas oriundas de milho não Bt, alimentadas com milho não Bt); para expressar o valor em percentagem, o resultado dessa divisão foi multiplicado por 100.

Para o cálculo da razão sexual para cada tratamento, foram anotados o número e o sexo dos adultos emergidos nos três bioensaios utilizados para estimar os índices de adaptação. A expressão usada para

calcular a razão sexual (RS) foi:  $\text{RS} = \text{número de fêmeas} / (\text{número de machos} + \text{fêmeas})$ . Os dados obtidos foram utilizados para calcular os índices de adaptação absoluto e relativo.

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com auxílio do programa Excel (Microsoft Office, Microsoft, São Paulo, SP). Utilizou-se análise de variância (Anova) para testar a hipótese de nulidade, com uso do programa Minitab Statistical, versão 17 (Minitab Inc., State College, PA, EUA). Quando necessário, as médias foram discriminadas pelo teste de Fisher, a 5% de probabilidade.

Para complementar a avaliação do desempenho de *S. frugiperda* nos diferentes milhos Bt, foi calculado o tempo letal. Para tanto, os dados de sobrevivência dos três bioensaios foram anotados periodicamente e utilizados para calcular a mortalidade de forma acumulada, com base no total de indivíduos mortos; em seguida, a mortalidade foi submetida à análise de regressão linear para determinar o tempo letal (Gomez et al., 1999). Para a análise de regressão, o tempo foi transformado em  $\log_{10}$ , e a percentagem de mortalidade foi usada diretamente e transformada em probit. Entretanto, como o ajuste dos dados (com base em  $R^2$ ) foi melhor sem a transformação da mortalidade em probit, escolheu-se a primeira opção. Com base nos dados estimados por meio da equação de regressão, também foi calculado o intervalo de confiança ( $p=95\%$ ) para o tempo letal médio ( $\text{TL}_{50}$ ). As médias com superposição de intervalo de confiança foram consideradas equivalentes.

## Resultados e Discussão

Para a análise da razão sexual, foram considerados apenas os tratamentos em que, pelo menos, 12 lagartas sobreviveram até a fase adulta. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos nos três bioensaios (Tabelas 1 e 2), uma vez que a razão sexual média para os insetos coletados em milho Bt e não Bt foi, respectivamente, de 0,49 e 0,51. Assim, é possível afirmar que o consumo de plantas que expressam proteínas Bt não afeta a sobrevivência dos insetos em função do sexo; portanto, não houve a necessidade de incluir essa variável nas estimativas dos índices de adaptação. Tanto o índice de adaptação quanto o índice relativo de adaptação indicaram diferenças nas respostas das lagartas de colônias não Bt e Bt, coletadas

na safra 2008/2009; no entanto, os índices obtidos na safra 2010/2011 não distinguiram esses dois tipos de colônias (Tabela 1).

Na safra 2008/2009, foram observadas diferenças entre colônias de insetos coletadas no milho Bt Cry1Ab e nas áreas não Bt, consideradas de refúgio. Os índices indicaram maior adaptação de *S. frugiperda* oriunda e alimentada em milho não Bt, em contraste com as lagartas expostas pela primeira vez ao milho Bt. As lagartas oriundas do milho Bt apresentaram índice de adaptação intermediário, e não houve diferença nos índices de adaptação quando estas foram alimentadas com milho Bt ou não Bt. Dessa forma, o desempenho dos insetos previamente expostos à proteína Bt foi semelhante, independentemente do tipo de milho oferecido como alimento. Notou-se, ainda, que, para *S. frugiperda* oriunda de milho não Bt e alimentada com milho Bt Cry1Ab, o índice relativo de adaptação foi cerca de 40% do observado na testemunha; porém, esse índice foi alto para se considerar esse evento eficiente no controle da espécie-alvo. Parte dessa baixa eficiência pode ser explicada pela interação entre a cultivar e o gene *bt* (*Cry1Ab*) (Waquil et al., 2002).

Em 2009, em relação aos insetos alimentados com milho Bt, as lagartas coletadas no milho Cry1Ab apresentaram índice relativo de adaptação de 64%, o que indica certo nível de resistência à proteína Bt, como também observado em condições de campo (Mendes et al., 2011). Ao se comparar o índice relativo de adaptação dos insetos oriundos de plantas Bt com os das plantas não Bt, alimentados no milho não Bt, houve redução de mais de 35 pontos percentuais

(Tabela 1). Isso indica custo adaptativo dos insetos sobreviventes no milho Bt Cry1Ab. Desse modo, se confirmado, esse fato poderia tanto dificultar o estabelecimento da população resistente quanto possibilitar a reversão da suscetibilidade com a retirada do evento por algum período de tempo. Neste contexto, um esforço significativo tem sido feito pela indústria de sementes para a adoção de estratégias para o manejo da resistência, como o uso intensivo de área de refúgio estruturada e efetiva, ou seja, que atenda a todas as recomendações técnicas de cada produto (Boas práticas agrônomicas aplicadas a plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos: manejo integrado de pragas, 2014).

Contudo, o custo adaptativo associado à resistência às plantas Bt não foi observado, por exemplo, em *Busseola fusca* (Fuller) (Van Rensburg, 2007), embora tenha sido relatado em outras espécies de Lepidoptera, como *Plutella xylostella* (L.) (Groeters et al., 1994), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Carrière et al., 2001), *Trichoplusia ni* (Hübner) (Janmaat & Myers, 2005) e *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Akhurst et al., 2003). Uma possível explicação é que, ao longo do tempo, o custo adaptativo pode ser reduzido por evolução subsequente (Coustau et al., 2000). Assim, todos os fatores que afetam a bioecologia das espécies-alvo são importantes na pressão de seleção e no custo adaptativo.

Para alguns insetos, o declínio da resistência à proteína Bt, na ausência de seleção, tem sido reportado em laboratório (Ferré & Van Rie, 2002; Gassmann et al., 2009). Este resultado pode ser explicado

**Tabela 1.** Média±erro-padrão do desempenho larval, estimado pelos índices de adaptação e pela razão sexual, de *Spodoptera frugiperda* proveniente de milho não Bt (Lagarta não Bt) e de milho Bt Cry1Ab (Lagarta Bt), alimentada com folhas de milho não Bt e Bt Cry1Ab (Milho Bt)<sup>(1)</sup>.

Tratamento	Índice de adaptação	Índice relativo de adaptação	Razão sexual
		Safra 2008/2009	
Lagarta não Bt/Milho não Bt	7,50±0,39a	100,00±5,23a	0,57±0,06a
Lagarta Bt/Milho não Bt	4,85±0,37b	64,67±4,88b	0,53±0,08a
Lagarta Bt/Milho Bt	4,81±0,35b	64,06±4,65b	0,43±0,06a
Lagarta não Bt/Milho Bt	3,35±0,34c	44,67±4,58c	0,53±0,08a
		Safra 2010/2011	
Lagarta não Bt/Milho não Bt	8,48±0,88a	100,00±09,13a	0,57±0,06a
Lagarta Bt/Milho não Bt	8,23±0,75a	97,05±10,68a	0,53±0,08a
Lagarta Bt/Milho Bt	4,02±0,45b	47,41±05,50b	0,43±0,06a
Lagarta não Bt/Milho Bt	2,57±0,41b	30,31±04,97b	0,53±0,08a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem pelo teste de Fischer, a 5% de probabilidade.

pelos efeitos negativos em componentes do valor adaptativo dos indivíduos, como redução da taxa de sobrevivência (Groeters et al., 1994), aumento do tempo de desenvolvimento (Liu et al., 1999), redução da fecundidade, alteração na razão sexual e insucesso de acasalamento (Groeters et al., 1993), entre outros. Portanto, esse declínio na frequência de indivíduos resistentes na população sem seleção tem sido atribuído ao custo adaptativo.

Já para os insetos coletados no milho Bt e na área de refúgio, na safra 2010/2011, os dois tipos de lagartas (Bt e não Bt) alimentadas com folhas de milho Bt Cry1Ab não apresentaram diferenças nos índices de adaptação (Tabela 1). Porém, cabe ressaltar que, independentemente da origem das lagartas, quando estas foram alimentadas com folhas de milho Bt e não Bt, foram observadas diferenças significativas. Assim, após três safras de uso do milho Bt Cry1Ab, não houve diferença na resposta dessas populações de *S. frugiperda* à proteína Bt. Isso indica que os insetos emergidos do refúgio e da área Bt estão realmente inter cruzando, mantendo o mesmo nível de suscetibilidade. Além disso, os insetos das duas colônias apresentaram índice de adaptação superior a 30% (redução de 70% na adaptação) no milho Bt Cry1Ab. Este resultado confirma a reduzida atividade da proteína Cry1Ab sobre *S. frugiperda*, como observado no bioensaio da safra anterior e por Waquil et al. (2002) e Mendes et al. (2011), o que resulta apenas em uma supressão na população.

Ao se comparar os índices de adaptação de *S. frugiperda* de Sinop aos da população referência (não Bt), foram observadas diferenças significativas (Tabela 2). No entanto, quando os insetos foram alimentados com folhas de milho não Bt DKB 390 e milho Bt Vip3Aa20, não houve diferença significativa nos índices de adaptação das duas colônias. No milho Bt Vip3Aa20, os índices foram zerados em razão dos 100% de mortalidade, o que mostra a alta eficácia dessa proteína no controle de *S. frugiperda*. Já em todos os outros milhos Bt, os índices de adaptação foram menores para as lagartas não Bt.

A maior diferença nos índices foi registrada para as lagartas alimentadas com folhas do milho Bt Cry1F, tendo variado de 5,75%, nas lagartas não expostas ao Bt, a 67,24%, nas lagartas de milho Bt Cry1A.105/Cry2Ab2. Além disso, observou-se diferença nos índices entre os dois tipos de lagartas, não Bt e Bt, alimentadas no milho não Bt Impacto. Neste milho, os índices de adaptação foram menores para as lagartas coletadas em Sinop. No milho não Bt DKB 390, os índices também foram menores ( $p \leq 0,30$ ). Dessa forma, esses dados sugerem algum custo adaptativo, o que inclui possível efeito aditivo atribuído à base genética de cada híbrido.

Quando as lagartas das duas colônias foram alimentadas com folhas dos milhos Bt (Cry1A.105/Cry2Ab2, Cry1F e Cry1Ab/Cry1F), os índices de adaptação foram maiores para as lagartas coletadas em milho Bt, em Sinop. Isso sugere que essa população

**Tabela 2.** Média±erro-padrão do desempenho larval, estimado pelos índices de adaptação e pela razão sexual, de *Spodoptera frugiperda* proveniente de colônias referência milho não Bt (Lagarta não Bt) e de milho Bt (Lagarta Bt Sp), do município de Sinop, MT<sup>(1)</sup>.

Híbrido de milho	Lagarta	Índice absoluto de adaptação	Índice relativo de adaptação	Razão sexual
Milho não Bt DKB	Lagarta não Bt	7,28±0,66a	100,00±9,09a	0,58±0,08a
	Lagarta Bt Sp	6,42±0,36a	88,14±4,92a	0,55±0,08a
Milho Bt VT PRO	Lagarta não Bt	0,00±0,00a	0,00±0,00a	-
	Lagarta Bt Sp	0,36±0,14b	4,96±1,90b	-
Milho Bt Hx	Lagarta não Bt	0,15±0,15a	5,75±2,03a	-
	Lagarta Bt Sp	4,90±0,46b	67,24±6,26b	0,44±0,09a
Milho Bt YG	Lagarta não Bt	2,48±0,26a	34,11±3,55a	0,45±0,11a
	Lagarta Bt Sp	3,42±0,26b	46,94±3,59b	0,52±0,11a
Milho não Bt Imp	Lagarta não Bt	6,97±0,50a	95,72±6,92a	0,50±0,08a
	Lagarta Bt Sp	5,30±0,33b	72,79±4,53b	0,46±0,08a
Milho Bt Vip	Lagarta não Bt	0,00±0,00a	0,00±0,00a	-
	Lagarta Bt Sp	0,00±0,00a	0,00±0,00a	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas para cada híbrido, não diferem pelo teste de Fischer, a 5% de probabilidade. Os híbridos utilizados para alimentação das lagartas foram: P30F35 para as proteínas Cry1F (Milho Bt Hx) e Cry1Ab (Milho Bt YG); DKB 390 não Bt (Milho não Bt DKB) e DKB 390 Bt para a proteína Cry1A.105/Cry2Ab2 (Milho Bt VT PRO); e Impacto não Bt (Milho não Bt Imp) e Impacto Bt para a proteína Vip3Aa20 (Milho Bt Vip).

já apresenta resistência, e possivelmente cruzada, às proteínas avaliadas. Embora a diferença entre os índices de adaptação das lagartas das duas colônias tenha sido relativamente pequena quando estas foram alimentadas com folhas de milho Bt Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1Ab, para as alimentadas com folhas de milho Bt Cry1F, a diferença foi de aproximadamente 12 vezes, o que evidencia a resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F (Tabela 2). Esse resultado corrobora dados publicados recentemente sobre a resistência de populações de *S. frugiperda*, oriunda de diferentes regiões brasileiras, à proteína Cry1F (Farias et al., 2014) e sugere atenção para a proteína Cry1A.105/Cry2Ab2 na região de Sinop.

Com relação ao  $TL_{50}$ , nos milhos não Bt, não houve diferença entre as três fontes de insetos, ou seja, lagartas de milho não Bt e de milho Bt Cry1Ab ou Cry1F (Tabela 3). Independentemente do tipo de lagarta, no milho não Bt, o  $TL_{50}$  variou entre 12 e 15 dias. Já nos híbridos transgênicos, o  $TL_{50}$  foi menor e variou de 0,02 a 7 dias, dependendo do evento Bt ou da fonte de lagarta. Ainda nos eventos Bt, o  $TL_{50}$  das lagartas previamente expostas às proteínas foi maior do que o das lagartas não Bt. Isso indica que, quanto maior o  $TL_{50}$ , maior será o índice de adaptação.

Ao se comparar o  $TL_{50}$  das lagartas apenas nos milhos transgênicos, notou-se que este foi menor no milho que expressa a proteína Cry1F do que no Bt Cry1Ab, para ambas as colônias de insetos (não Bt e Bt). Também constatou-se baixo  $TL_{50}$  no tratamento que envolveu lagartas de colônias não Bt alimentadas com milho Bt Cry1F. No primeiro dia de observação

(48 horas após a infestação), verificou-se mais de 70% de mortalidade; assim, o  $TL_{50}$  ficou abaixo de 2 dias, mas o valor estimado para 50% de mortalidade ficou fora do intervalo de dados utilizados para estimar a equação.

Quanto aos parâmetros das equações e ao  $TL_{50}$  de *S. frugiperda*, da população de lagartas de milho Bt Cry1A.105/Cry2Ab2 não diferiu das lagartas da colônia referência, exceto no tratamento com milho Bt Cry1F (Tabela 4). A diferença no  $TL_{50}$  aumentou de 2 para 9 dias nos insetos da colônia de Sinop. Destaca-se que, mesmo nos híbridos Bt que expressam as demais proteínas, como no próprio DKB 390 (Cry1A.105/Cry2Ab2), no qual os insetos foram coletados, não houve diferença no  $TL_{50}$  entre as duas colônias. Até o momento, não foi encontrado na literatura estudo que tenha avaliado o efeito dessas proteínas Bt sobre o tempo de exposição das lagartas necessário para causar 50% de mortalidade, ao se considerar apenas os insetos mortos. Sousa (2011) estimou o  $TL_{50}$  para larvas de *S. frugiperda* de diferentes regiões, coletadas e alimentadas com milho não Bt e Bt Cry1Ab, durante todo o ciclo biológico, e registrou valores de 8 dias, para a população coletada em Nazareno, MG, a 45 dias, para a população coletada em Varjão, MG, o que coincidiu com a maior e a menor mortalidade, respectivamente. Novos estudos que relacionem o tempo letal com os índices de adaptação de *S. frugiperda* devem ser conduzidos, uma vez que essa variável pode ser importante no monitoramento, para indicar precocemente indícios da evolução de resistência mesmo antes de se obter insetos sobreviventes no campo.

**Tabela 3.** Tempo letal de *Spodoptera frugiperda* proveniente de colônias de milho não Bt (Lagarta não Bt), milho Bt Cry1Ab (Lagarta Bt YG) e milho Bt Cry1F (Lagarta Bt Hx), alimentada com milho não Bt (Milho não Bt) e milho Bt Cry1Ab (Milho Bt YG) ou Cry1F (Milho Bt Hx)<sup>(1)</sup>.

Milho	Lagarta	Parâmetros da equação de regressão			$TL_{50}$ (dias) ( $\pm IC_{95}$ )
		a	b	R <sup>2</sup>	
Milho não Bt	Lagarta não Bt	19,77	64,39	0,74	12,12 $\pm$ 2,69a
	Lagarta Bt YG	-35,75	78,66	0,73	12,31 $\pm$ 3,86a
Milho Bt YG	Lagarta não Bt	26,34	44,95	0,90	3,36 $\pm$ 0,30a
	Lagarta Bt YG	03,89	53,88	0,92	7,17 $\pm$ 0,96b
Milho não Bt	Lagarta não Bt	19,77	64,39	0,74	12,12 $\pm$ 2,69a
	Lagarta Bt Hx	37,34	74,76	0,69	14,96 $\pm$ 3,27a
Milho Bt Hx	Lagarta não Bt	74,27	13,94	0,94	0,02 $\pm$ 0,00a
	Lagarta Bt Hx	22,13	47,94	0,98	3,81 $\pm$ 0,21b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem pelo teste de Fisher, a 95% de probabilidade.  $TL_{50}$ , tempo letal médio. IC, intervalo de confiança para  $TL_{50}$ .

**Tabela 4.** Tempo letal de *Spodoptera frugiperda* proveniente de colônias referência milho não Bt (Lagarta não Bt) e de milho Bt (Lagarta Bt Sp), no município de Sinop, MT<sup>(1)</sup>.

Híbrido	Lagarta	Parâmetros da equação de regressão			TL <sub>50</sub> (dias) (±IC <sub>95</sub> )
		a	b	R <sup>2</sup>	
Milho não Bt DKB	Lagarta não Bt	-24,16	79,44	0,87	8,58±2,31a
	Lagarta Bt Sp	-22,80	79,57	0,87	8,22±2,20a
Milho Bt VT PRO	Lagarta não Bt	10,45	123,17	0,85	2,09±1,50a
	Lagarta Bt Sp	8,86	99,39	0,93	2,59±0,95a
Milho Bt YG	Lagarta não Bt	0,66	69,53	0,93	5,12±1,03a
	Lagarta Bt Sp	10,10	79,52	0,96	4,66±0,71a
Milho Bt Hx	Lagarta não Bt	28,57	60,96	0,82	2,25±0,40a
	Lagarta Bt Sp	-13,54	66,34	0,80	9,07±1,89b
Milho não Bt IMP	Lagarta não Bt	-21,03	71,24	0,82	9,93±3,62a
	Lagarta Bt Sp	-45,80	83,65	0,66	13,97±4,47a
Milho Bt Vip	Lagarta não Bt	14,52	127,40	0,82	1,90±1,11a
	Lagarta Bt Sp	0,00	332,19	1,00	1,41±0,00a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem pelo teste de Fisher, a 95% de probabilidade. TL<sub>50</sub>, tempo letal médio. TC, intervalo de confiança para TL<sub>50</sub>. Os híbridos utilizados para alimentação das lagartas foram: P30F35 para as proteínas Cry1F (Milho Bt Hx) e Cry1Ab (Milho Bt YG); DKB 390 não Bt (Milho não Bt DKB) e DKB 390 Bt para a proteína Cry1A.105/Cry2Ab2 (Milho Bt VT PRO); e Impacto não Bt (Milho não Bt Imp) e Impacto Bt para a proteína Vip3Aa20 (Milho Bt Vip).

## Conclusões

1. A proteína Cry1Ab tem eficiência limitada no controle de *Spodoptera frugiperda* oriunda da região de Inhaúma, MG, e, após três safras de sua utilização, não mostra evolução de resistência.

2. A população de *S. frugiperda* oriunda de Sinop, MT, apresenta resistência à proteína Cry1F e custo adaptativo para essa característica, bem como algum nível de resistência cruzada às proteínas Cry1Ab, e Cry1A.105/Cry2Ab2, além de ser altamente sensível à proteína Vip3Aa20, à qual não apresenta resistência cruzada.

3. O tempo letal é maior para as populações de *S. frugiperda* oriundas de colônias obtidas de plantas Bt do que para as das plantas não Bt, o que indica evolução de resistência.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro; e ao laboratorista Eustáquio Francisco Souza de Oliveira pela colaboração na realização da pesquisa.

## Referências

AKHURST, R.J.; JAMES, W.; BIRD, L.J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).

*Journal of Economic Entomology*, v.96, p.1290-1299, 2003. DOI: 10.1093/jee/96.4.1290.

BARAH, A.; SENGUPTA, A.K. Correlation and regression studies between pupal weight and fecundity of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae) on four different foodplants. *Acta Physiologica Hungarica*, v.78, p.261-264, 1991.

BOAS práticas agronômicas aplicadas a plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos: manejo integrado de pragas. 2014. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/DownloadCenter/Abrasem-2014-Manejo-Integrado-De-Pragas.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2014.

BOREGAS, K.G.B.; MENDES, S.M.; WAQUIL, J.M.; FERNANDES, G.A.W. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Bragantia*, v.72, p.61-70, 2013. DOI: 10.1590/S0006-87052013000100009.

CARRIÈRE, Y.; ELLERS-KIRK, C.; LIU, Y.-B.; SIMS, M.A.; PATIN, A.L.; DENNEHY, T.J.; TABASHNIK, B.E. Fitness costs and maternal effects associated with resistance to transgenic cotton in the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology*, v.94, p.1571-1576, 2001. DOI: 10.1603/0022-0493-94.6.1571.

CÉLERES. *Informativo biotecnologia*. 2013. Disponível em: <<http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2014.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Parecer técnico nº 2052/2009. **Liberção comercial de milho geneticamente modificado**. 2009. Disponível em: <<http://www2.mcti.gov.br/index.php/content/view/full/14254.html>>. Acesso em: 25 out. 2011.

COUSTAU, C.; CHEVILLON, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost?

- Trends in Ecology & Evolution**, v.15, p.378-383, 2000. DOI: 10.1016/S0169-5347(00)01929-7.
- CRUZ, J.C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6.ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de produção). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\_6\_ed/index.htm>. Acesso em: 19 ago. 2012.
- FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKSOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v.64, p.150-158, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.06.019.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v.47, p.501-533, 2002. DOI: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145234.
- GASSMANN, A.J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B.E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v.54, p.147-163, 2009. DOI: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090518.
- GOMEZ, S.A.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1539-1544, 1999. DOI: 10.1590/S0100-204X1999000900003.
- GROETERS, F.R.; TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Evolution**, v.48, p.197-201, 1994. DOI: 10.2307/2410015.
- GROETERS, F.R.; TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.86, p.1035-1039, 1993. DOI: 10.1093/jee/86.4.1035.
- HUANG, F.; QURESHI, J.A.; MEAGHER JR, R.L.; REISIG, D.D.; HEAD, G.P.; ANDOW, D.A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G.D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS One**, v.9, e112958, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0112958.
- JANMAAT, A.F.; MYERS, J.H. The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.272, p.1031-1038, 2005. DOI: 10.1098/rspb.2004.3040.
- 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, 1999. DOI: 10.1038/22919.
- MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas: relevância da implantação de estratégias proativas de manejo da resistência. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.34, p.67-77, 2005.
- 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). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.239-244, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000300003.
- OLIVEIRA, C.M.; AUAD, A.M.; MENDES, S.M.; FRIZZAS, M.R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v.56, p.50-54, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2013.10.022.
- PEREIRA, E.J.G.; STORER, N.P.; SIEGFRIED, B.D. Inheritance of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. **Bulletin of Entomological Research**, v.98, p.621-629, 2008. DOI: 10.1017/S0007485308005920.
- RESENDE, D.C.; MENDES, S.M.; WAQUIL, J.M.; DUARTE, J. de O.; SANTOS, F.A. Adoção da área de refúgio e manejo de resistência de insetos em milho Bt. **Revista de Política Agrícola**, ano 23, p.119-128, 2014.
- SÁ, V.G.M. de; FONSECA, B.V.C.; BOREGAS, K.G.B.; WAQUIL, J.M. Sobrevida e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, v.38, p.1-8, 2009. DOI: 10.1590/S1519-566X2009000100012.
- SOUZA, F.F. **Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em Milho Bt**: influência em características de história de vida e crescimento populacional. 2011. 35p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v.103, p.1031-1038, 2010. DOI: 10.1603/EC10040.
- TABASHNIK, B.E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to genetically engineered crops: successes and failures. **ISB News Report**: Agricultural and Environmental Biotechnology, Jan. 2014. Available at: <http://www.isb.vt.edu/news/2014/Jan14.pdf>. Accessed on: 20 July 2014.
- VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, v.24, p.147-151, 2007. DOI: 10.1080/02571862.2007.10634798.
- WAQUIL, J.M.; VILLELA, F.M.F.; FOSTER, J.E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, p.1-11, 2002. DOI: 10.18512/1980-6477/rbms.v1n3p1-11.

---

Recebido em 2 de janeiro de 2015 e aprovado em 11 de fevereiro de 2016