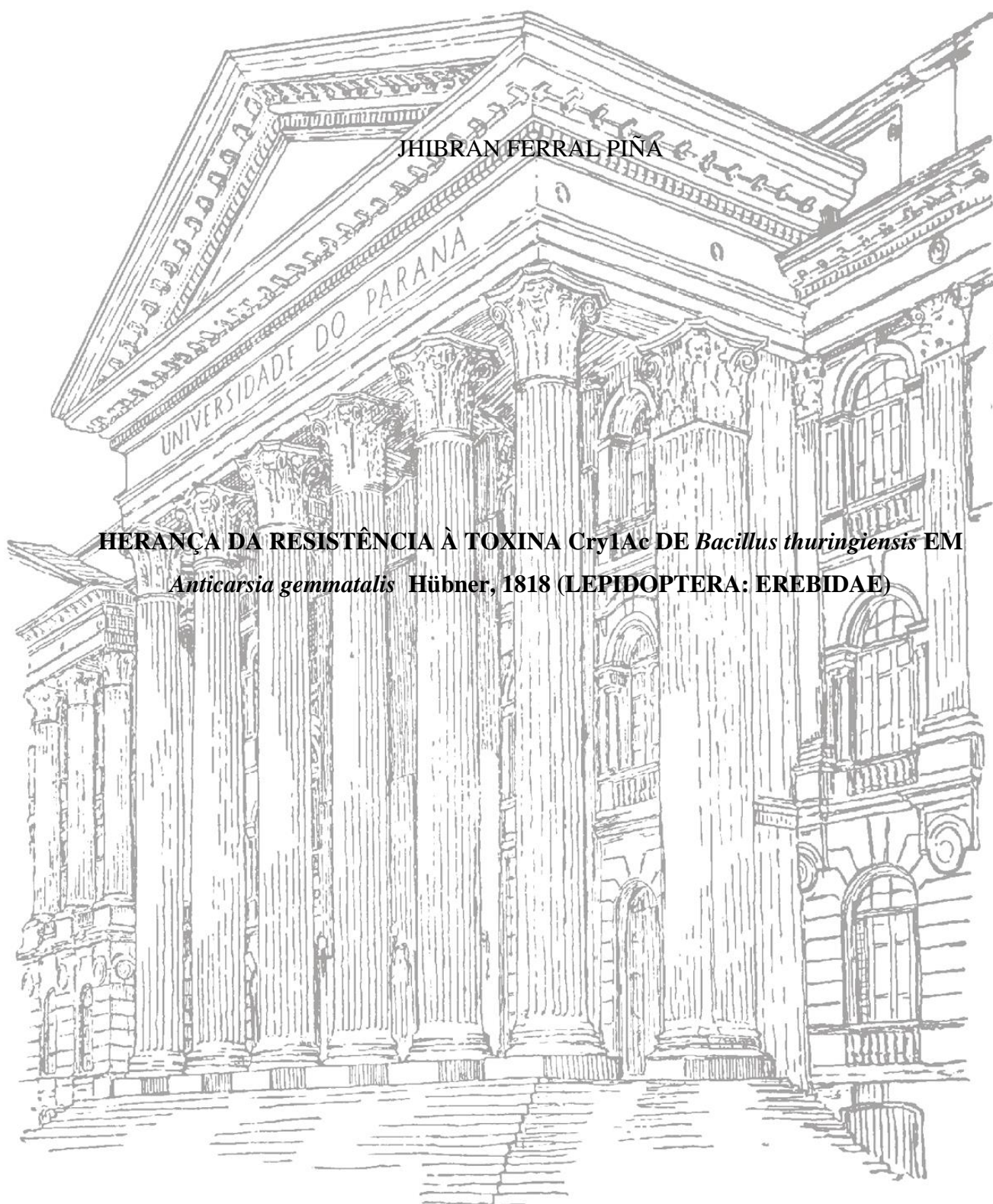


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JHIBRAN FERRAL PIÑA

HERANÇA DA RESISTÊNCIA À TOXINA CryI<sub>Ac</sub> DE *Bacillus thuringiensis* EM  
*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)



CURITIBA

2016

JHIBRAN FERRAL PIÑA

**HERANÇA DA RESISTÊNCIA À TOXINA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* EM  
*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

CURITIBA

2016

Ferral-Piña, Jhibran.

Herança da resistência à toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) / Jhibran Ferral-Piña. – Curitiba, 2016.

122 f.: il.; tabs., frafs.

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gómez.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia.

1.Entomologia. 2.Resistência toxina Cry1Ac. 3.Anticarsia gemmatalis. I. Ferral-Piña, Jhibran.  
II.Universidade Federal do Paraná.

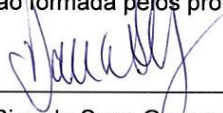
CDD 595.7

Bibliotecário: Ademir Benedito Alves de Lima  
CRB9-530

JHIBRAN FERRAL PIÑA

"HERANÇA DA RESISTÊNCIA À TOXINA DE *Bacillus thuringiensis* EM  
*Anticarsia gemmatilis*, 1818 (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em Ciências", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



---

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez (Orientador)  
(Embrapa Soja / Londrina - PR)



---

Prof. Dr. Celso Omoto  
(ESALQ/USP)



---

Profa. Dra. Angela Maria Ferreira Falleiros  
(UEL/PR)



---

Prof. Dr. Bráulio Santos  
(UFPR)



---

Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva  
(UFPR)

Curitiba, 06 de setembro de 2016.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Jorge Ferral Guerrero e Maria de los Angeles Piña Briceño, que com todo amor e dedicação sempre me apoiaram aos estudos, essa conquista não seria a mesma sem vocês. ¡Papá, Mamá, ya pueden decir que tienen un hijo Doctor!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver e me dar forças para seguir em frente.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Entomologia pela oportunidade concedida.

Ao Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), por conceder o contrato de becario para a realização de meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e TWAS (CNPq-TWAS), pela concessão da bolsa de doutorado (190133/2012-0).

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), por conceder a estrutura física e disponibilização de materiais necessários para realização dos experimentos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Daniel Ricardo Sosa-Gómez, por sua orientação e confiança nesses anos de doutorado. Por todo seu apoio no desenvolvimento de minha formação profissional.

As professoras Doutora Sheila Michele Levy e Doutora Ângela Maria Ferreira Falleiros pela ajuda nos trabalhos de histologia e principalmente pelos conselhos e incentivo para que eu pudesse sempre seguir em frente.

À Doutora Maria Cristina Neves de Oliveira pela realização das análises estatísticas e pelos conselhos e incentivos.

À professora Doutora Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas Boas (UEL) por seu apoio na liofilização da toxina Cry1Ac.

Ao Laboratório de Patologia de Insetos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), principalmente à Fabio Eduardo Paro por tudo seu apoio, conselhos e auxílio no desenvolvimento de meus bioensaios do doutorado, fico muito grato com você.

Ao Laboratório de Insetos do Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), principalmente as técnicas Renata e Andreia pelo auxílio no desenvolvimento nos trabalhos histológicos.

Ao bibliotecario Ademir Benedito Alves de Lima (Embrapa Soja) pela elaboração da ficha catalográfica.

A José Antonio Félix Valle, não por estar nesse canto você perde jerarquia, obrigado por ser meu companheiro de aventuras e por me apoiar sempre em cada desafio que nos queremos realizar. TAP.

A meus irmãos Angeles, Jorge, Vanessa, Shirley e meus sobrinhos Alfredo, Andrés, Judith, Barbara, Justin e Sergio, vocês foram minhas vitaminas para pegar força dia a dia.

Aos meus amigos da Embrapa; Lucas N. Wisch, Patricia E. Husch, Gizele R. Baldo, Alessandra Benatto e Juliane A. Schneider, pelo incentivo, pelas discussões técnicas, pelos conselhos, e pela ajuda prática para que este trabalho fosse concluído.

Aos colegas da Embrapa Soja, Ivanilda L. Soldório, Sérgio H. da Silva, Jovenil José da Silva e José Jairo da Silva pelo auxílio no desenvolvimento de meu trabalho ao longo desses anos.

Aos meus amigos da UFPR; Diego, Oscar, Mariana, Tatiana, Angelico, Bruno, pela amizade e auxílio na mudança de região.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na conclusão deste trabalho, colaboraram com informações, críticas, incentivo e sugestões ao longo deste curso, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Uma das principais culturas é a soja *Glycine max* (L.), com 118,135 milhões de hectares plantados no mundo. No continente Americano esta cultura pode ser alvo de ataques da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae). Para seu controle são utilizadas diversas estratégias, dentre elas, o uso da soja transgênica com a toxina Cry1Ac. Entretanto, a disponibilidade de grandes áreas com soja Bt é um cenário favorável para a seleção de populações resistentes desse inseto. O conhecimento que tem por base os estudos sobre a herança da resistência de cada espécie é essencial para a melhor compreensão da evolução da resistência e posterior elaboração e refinamento de estratégias para atrasar a evolução da resistência de pragas aos cultivos transgênicos são combinadas diversas estratégias, entre elas o uso da alta dose, área de refúgio e, monitoramento das alterações de suscetibilidade. No presente trabalho foram avaliados o impacto da variedade de soja Bt (BR283 Bt RR) que expressa a toxina Cry1Ac sobre uma raça resistente de *A. gemmatalis* à Cry1Ac. Além disso, foram determinados aspectos relacionados à herança da resistência, tais como, recessividade ou dominância dos alelos de resistência; foi verificada se a resistência se deve a um ou vários genes e constatou-se a possibilidade de ocorrer resistência cruzada com as toxinas Cry1F e Cry1Ab. Adicionalmente, foram determinadas alterações morfológicas do intestino médio (IM) das raças resistente (RR) e suscetível (SS) à Cry1Ac. O intestino médio das lagartas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes à Cry1Ac, apresentaram alterações morfológicas em toda sua arquitetura, tanto epitelial quanto muscular, quando tratadas com a toxina Cry1Ac, no terceiro e quinto instares. Estas alterações mais evidentes foram observadas no terceiro instar da população suscetível. Estas alterações foram pontuais e ocorreram principalmente nas células colunares, que apresentaram intensa vacuolização citoplasmática, presença de vazios citoplasmáticos, aumento nas protruções liberadas em direção ao lúmen. A raça resistente a Cry1Ac não apresentou mortalidade quando o tecido da soja Bt foi diluído 25 vezes, por outro lado, a raça suscetível apresentou mortalidade de 96,49 % em média. Lagartas neonatas, do 3º e 5º instar da raça resistente e suscetível, alimentadas com folíolos de soja, apresentaram mortalidade total quando alimentadas com folíolos de soja Bt no estágio V5. No entanto, os tempos médios de sobrevivência foram diferentes, as neonatas suscetíveis apresentaram tempo médio de sobrevivência de 1,05 dias, as neonatas resistentes foram de 1,73 dias. Lagartas suscetíveis 3º instar tiveram um TS de 1,23 dias e as lagartas resistentes do mesmo estágio foi de 2,57 dias. Lagartas de quinto instar suscetíveis tiveram TS de 1,56 dias e 3,26 dias na raça resistente. Insetos com razão de resistência de 81 a 111,15 vezes podem ser controladas pela soja Bt durante a fase vegetativa. Resultados dos cruzamentos recíprocos entre as raças RR e SS à Cry1Ac revelaram que a resistência é de caráter autossômica e incompletamente recessiva. Estudos de retrocruzamentos da F<sub>1</sub> (RS e SR) com o parental resistente para determinar o número de genes envolvidos na resistência, mediante o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) das respostas das progênes dos retrocruzamentos ou F<sub>2</sub> (RRRS, RRSR, SRRR e RSRR), observou-se que a resistência é determinada por um gene principal. A determinação da suscetibilidade as toxinas Cry1F e Cry1Ab com as raças de *Anticarsia gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac, indicaram resistência cruzada à toxina Cry1Ab e ausência de resistência cruzada em relação à Cry1F.

**Palavras-chave:** *Anticarsia gemmatalis*, Cry1Ac, morfologia, intestino médio, alterações celulares, soja Bt, herança, resistência cruzada.



## ABSTRACT

One of the cultures principais is *Glycine soja* max (L.) with 118,135,000 hectares planted in the world. In the Americas this culture can be the target attacks of the caterpillar of soybean, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae). For their control are use various strategies, among them, the use of transgenic soybean with the Cry1Ac toxin. However, the availability of large areas with Bt soy is a favorable scenario for the selection of resistant populations of this insect. The knowledge is based on studies on the inheritance of resistance of each species are essential for better understanding of the evolution of resistance and further development and refinement of resistance management strategies to delay the evolution of pest resistance to transgenic crops are combined several strategies, including the use of high dose refuge area and monitoring of susceptibility changes. In the present study we evaluated the impact of the variety of Bt soybean (BR283 Bt RR) expressing Cry1Ac toxin on a tough race *A. gemmatalis* to Cry1Ac. Besides diso were certain aspects of the inheritance of resistance, such as recessividad or dominance of resistance alleles; It was recorded if the resistance is due to one or several genes and found out the possibility of cross resistance with Cry1F and Cry1Ab toxin. Adicionalmente were determined morphological changes of the medium intestine (IM) of resistant breeds (RR) and susceptible (SS) to the Cry1Ac. The average instetino the crawler *A. gemmatalis* susceptible and resistant to Cry1Ac, showed morphological changes throughout its architecture, both as epithelial muscle when treated with Cry1Ac toxin, the third and fifth instars. These changes were punctual and occurred mainly in the columnar cells, which showed intense vacuolation, presence of cytoplasmic empty, increase in protrusions released into the lumen, being more visible in the third instar of the susceptible population. The Cry1Ac resistant race does not show mortality when tissue Bt soybeans was diluted 25 times, on the other hand susceptible animals showed mortality on average 96.49%. Caterpillars neonate, 3rd and 5th instar of resistant and susceptible race, fed soybean leaflets showed total mortality when fed with Bt soybean leaflets at V5 stage. However, the average survival time were different, the neonate susceptible presented median survival time (ST) of 1.05 days, the resistant neonate was 1.73 days. Caterpillars susceptible 3rd instar had a TS of 1.23 days and resistant caterpillars same stage was 2.57 days. Largartas of fifth instar were susceptible TS 1.56 days and 3.26 days in the tough race. Insects with resistance ratio from 81 to 111.15 times can be controlled by Bt soybean during the vegetative stage. Results of reciprocal crosses between the RR and SS to Cry1Ac races have shown that resistance is autosomal incompletely recessive character. Studies with F1 backcross (RS and SR) with the resistant parent to determine the number of genes involved in resistance by analysis of the chi-square test ( $\chi^2$ ) the responses of the progenies of retro crossings or F2 (RRRS, RRSR, SRRR and RSRR) it was observed that the resistance is determined by a single major gene. The determination of the susceptibility of Cry1F and Cry1Ab toxin with *Anticarsia gemmatalis* strain resistant to Cry1Ac toxin showed cross-resistance to Cry1Ab toxin and no cross-resistance to Cry1F.

**Keywords:** *Anticarsia gemmatalis*, Cry1Ac, morphology, midgut, cellular changes, Bt soy, inheritance of resistance, cross-resistance.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Distribuição dos casos de resistência às toxinas Bt de lepidópteros no mundo.....	29
<b>Figura 2 -</b>	Curvas de concentração-resposta à Cry1Ac para as raças de <i>A. gemmatalis</i> suscetível (SS), resistente (RR), progênes de F <sub>1</sub> (RS e SR) e retrocruzamento (RRRS, RRSR, RSRR e SRRR) do primeiro bioensaio onde a razão de resistência foi de 81,57 vezes.....	73
<b>Figura 3 -</b>	Curvas de concentração-resposta à Cry1Ac para as raças de <i>A. gemmatalis</i> suscetível (SS), resistente (RR), progênes de F <sub>1</sub> (RS e SR) e retrocruzamento (RRRS, RRSR, RSRR e SRRR) do segundo bioensaio onde a razão de Resistência foi de 111,15 vezes.....	74
<b>Figura 4 -</b>	Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas do primeiro instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> suscetíveis e resistentes ao Cry1Ac. Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Barra = 1 µm.....	99
<b>Figura 4 A-</b>	Lagartas suscetíveis com tratamento controle.....	99
<b>Figura 4B -</b>	Lagartas resistentes com tratamento contole.....	99
<b>Figura 4C -</b>	Lagartas suscetíveis com tratamento Cry1Ac.....	99
<b>Figura 4D -</b>	Lagartas resistentes com tratamento Cry1Ac.....	99
<b>Figura 5 -</b>	Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas do terceiro instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> suscetíveis e resistentes ao Cry1Ac. Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Barra = 10 µm....	100
<b>Figura 5A -</b>	Lagartas suscetíveis com tratamento controle.....	100
<b>Figura 5B -</b>	Lagartas resistentes com tratamento controle.....	100
<b>Figura 5C -</b>	Lagartas suscetíveis com tratamento Cry1Ac.....	100
<b>Figura 5D -</b>	Lagartas resistentes com tratamento Cry1Ac.....	100
<b>Figura 6 -</b>	Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas do quinto instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> suscetíveis e resistentes ao Cry1Ac. Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Barra = 10 µm.....	101
<b>Figura 6A -</b>	Lagartas suscetíveis com tratamento controle.....	101
<b>Figura 6B -</b>	Lagartas resistente com tratamento controle.....	101
<b>Figura 6C -</b>	Lagartas suscetíveis com tratamento Cry1Ac.....	101
<b>Figura 6D -</b>	Lagartas resistentes com tratamento Cry1Ac.....	101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Estudos de resistência dos lepidópteros às toxinas Cry nas culturas Bt sob condições de laboratório.....	29
<b>Tabela 2 -</b>	Frequências dos alelos de resistência nas populações de lepidópteros de campo.....	32
<b>Tabela 3 -</b>	Estudos de custo adaptativo de lepidópteros nas culturas Bt.....	35
<b>Tabela 4 -</b>	Bioensaios alta dose (diluição de 25 vezes do tecido na dieta artificial).....	70
<b>Tabela 5 -</b>	Tempo de sobrevivência das lagartas de <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com soja Bt (BR283BtRR) .....	71
<b>Tabela 6 -</b>	Respostas das CL <sub>50s</sub> das raças SS, RR e F <sub>1</sub> resultantes de cruzamentos recíprocos entre as raças de <i>A. gemmatalis</i> SS e RR à toxina Cry1Ac.....	72
<b>Tabela 7 -</b>	Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) entre as mortalidades observadas e esperadas dos retrocruzamentos ou F <sub>2</sub> para o modelo monogênico .....	75
<b>Tabela 8 -</b>	Mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> resistente à toxina Cry1Ac após a alimentação com dieta tratada com à toxina Cry1Ab .....	76

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	14
<b>CAPÍTULO I - RESISTÊNCIA ÀS TOXINAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EM LEPIDOPTERA</b> .....	15
<b>RESUMO</b> .....	16
<b>ABSTRACT</b> .....	17
1.1 INTRODUÇÃO.....	18
1.2 AS TOXINAS CRY E SEU USO NA AGRICULTURA.....	19
1.3 MODO DE AÇÃO DAS TOXINAS CRY .....	21
1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DOS LEPIDÓPTEROS ÀS TOXINAS CRY .....	22
1.5 RESISTÊNCIA DOS LEPIDÓPTEROS ÀS TOXINAS CRY .....	25
1.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA .....	31
1.7 ESTRATÉGIAS DE MANEJO DA RESISTÊNCIA ÀS TOXINAS CRY.....	35
1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	39
1.9 REFERÊNCIAS .....	40
<b>CAPÍTULO II - HERANÇA DA RESISTÊNCIA, RESISTÊNCIA CRUZADA DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) RESISTENTE À TOXINA Cry1Ac</b> .....	61
<b>RESUMO</b> .....	62
<b>ABSTRACT</b> .....	63
2.1 INTRODUÇÃO.....	64
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	65
2.2.1 Raças de <i>A. gemmatalis</i> .....	65
2.2.2 Bioensaios com tecidos de soja Bt sobre populações de <i>A. gemmatalis</i> resistentes e suscetíveis .....	65
2.2.3 Bioensaios sobre folhas de soja Bt.....	66
2.2.4 Bioensaios de herança da resistência à Cry1Ac.....	67
2.2.5 Bioensaios da genética da resistência .....	67
2.2.6 Bioensaios da resistência cruzada às toxinas Cry1F e Cry1Ab .....	68
2.3 RESULTADOS.....	69
2.3.1 Verificação de alta dose nas populações resistentes e suscetíveis .....	69

2.3.2	Avaliação da suscetibilidade das populações resistentes e suscetíveis a soja Bt.....	70
2.3.3	Avaliação da herança da resistência à Cry1Ac .....	71
2.3.4	Avaliação da resistência às toxinas Cry1F e Cry1Ab com a raça resistente de <i>A. gemmatalis</i> à Cry1Ac .....	75
2.4	DISCUSSÃO.....	76
2.4.1	Impacto da soja Bt sobre raças de <i>A. gemmatalis</i> .....	76
2.4.2	Herança da resistência à Cry1Ac .....	78
2.4.3	Resistência cruzada às toxinas Cry1F e Cry1Ab .....	78
2.5	CONCLUSÃO.....	79
2.6	REFERÊNCIAS .....	80

<b>CAPÍTULO III -</b>	<b>ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS PROMOVIDAS PELA TOXINA Cry1Ac NO INTESTINO MÉDIO DE POPULAÇÕES SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (LEPIDOPTERA: EREBIDAE).....</b>	<b>85</b>
-----------------------	---	-----------

<b>RESUMO</b>	.....	<b>86</b>
---------------	-------	-----------

<b>ABSTRACT</b>	.....	<b>87</b>
-----------------	-------	-----------

3.1	INTRODUÇÃO.....	88
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	88
3.2.1	Obtenção das larvas .....	88
3.2.2	Inoculação das lagartas com a proteína Cry1Ac .....	89
3.2.3	Coleta dos tubos digestivos.....	89
3.2.4	Fixação.....	90
3.2.5	Coloração .....	90
3.3	RESULTADOS.....	90
3.4	DISCUSSÃO.....	91
3.5	CONCLUSÃO.....	95
3.6	REFERÊNCIAS .....	96

<b>REFERÊNCIA GERAL.....</b>	<b>102</b>
------------------------------	------------

## INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae), é uma das pragas mais comuns na cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill, Fabaceae) (Sosa-Gómez, 2004; Conte et al. 2015). A fase larval de *A. gemmatalis* é a única prejudicial para a cultura da soja, pois é durante este período que as larvas causam desfolha, atacando os folíolos mais novos, reduzindo a área fotossintética de grande importância para o estágio reprodutivo da soja. Dependendo dos níveis de infestação, as lagartas podem consumir até as hastes mais finas das plantas (Sosa-Gómez et al., 2014). O período larval de *A. gemmatalis* compreende cinco a seis instares, com duração de aproximadamente 14 dias (Gamundi, 1988). Entretanto é a partir do 4º ao 5º instar que essas larvas apresentam a maior capacidade de desfolha, e, em alguns casos, dependendo do nível de infestação podem causar 100% de desfolha. Essas larvas ficam mais vorazes e mais ativas chegando a consumir em média 100 a 150 cm<sup>2</sup> de área foliar, provocando a redução da taxa fotossintética (Sosa-Gómez et al., 2014).

Os produtores até a introdução da soja Bt, os produtos controlavam a lagarta-da-soja principalmente com o uso de inseticidas sintéticos. A introdução da soja transgênica com o gene sintético de Cry1Ac no mercado brasileiro é uma alternativa importante para diminuir as aplicações de inseticidas químicos (Rahman et al., 2007). A piramidação, alta dose e o refúgio são as principais ferramentas utilizadas para retardar o aumento da frequência de alelos de resistência nas áreas cultivadas com plantas que expressam proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Gould, 1998; MacRae et al., 2005). Na soja MON 8701x MON 89788 aprovada para comercialização no Brasil há apenas um evento que permite a produção da toxina Cry1Ac (CTNBIO, 2010; Braga et al., 2011). A disponibilidade da toxina Cry1Ac em grandes áreas leva a uma principal preocupação com a seleção de fenótipos resistentes a esta toxina (Gould, 1998).

Muitos fatores podem estar relacionados ao desenvolvimento da resistência dos insetos a patógenos ou toxinas, entretanto, essa possibilidade pode estar relacionada ao sistema imunológico, através de estruturas como os hemócitos presentes na hemolinfa, pode estar associado à defesa contra os patógenos (Negreiro et al., 2004), ou uma resistência localizada nas estruturas responsáveis pela entrada das toxinas Cry no organismo, como o tubo digestivo onde a infecção se inicia. O intestino médio é considerado o principal local de digestão e absorção de nutrientes e dos compostos químicos e biológicos, razão que levaram os pesquisadores a questionar se existem diferenças morfológicas entre populações suscetíveis e

resistentes. O estudo de Levy *et al.*, (2005) identifica a diferenciação no intestino médio como o fator de resistência. Ao comparar populações de larvas de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis ao vírus AgMNPV (*A. gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovírus), verificaram que a população resistente apresentava uma maior concentração de células regenerativas, e uma maior quantidade de protruções citoplasmáticas nas células colunares. Outro fator de resistência é o conhecimento das bases genéticas da resistência a toxinas Cry, sendo essencial para o desenvolvimento de estratégias, a fim de atrasar ou prevenir a sua ocorrência no campo (Georghiou e Taylor, 1986). Os estudos analisados sobre herança da resistência de *A. gemmatalis* às toxinas Cry podem ser uma ferramenta importante para entender a sua evolução, e ser um auxiliar na escolha de práticas adequadas no manejo da resistência em campo.

Portanto, este estudo teve como objetivos: obter populações resistentes de *A. gemmatalis* à toxina Cry1Ac; determinar seus níveis de resistência através de bioensaios; analisar alterações morfológicas do intestino médio nas populações suscetíveis e resistentes; avaliar o efeito da soja Bt (BR283BTRR) em ambas as raças; realizar cruzamentos e retrocruzamentos para determinar os níveis de recessividade ou dominância dos alelos de resistência; verificar se a resistência se deve a um ou vários genes e constatar se ocorre resistência cruzada com às toxinas Cry1F e Cry1Ab.

## REFERÊNCIAS

- BRAGA, D.P.V., et al., (2011). Estudo de Caso de Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: Borém, A and G. Almeida (Ed). Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais. **Suprema**, cap. 17, pp: 347-390.
- COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBIO). (2010). Commercial release of genetically modified insect-resistant and herbicide –tolerant soy containing genetically modified MON 87701 and MON 89788. **Technical Opinion** No. 2542/2010.
- CONTE, O., et al.(2015) Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2014/15 no Paraná. Documentos 361. **Emater Embrapa**, 60 p.
- GAMUNDI, J.C. (1988). Biologia comparada e nutrição quantitativa de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (*Lepidoptera: Noctuidae*) em folhas e vagens de soja. **Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo**. p. 137.
- GEORGHIOU, G.P; C.E. TAYLOR (1986). Factors influencing the evolution of resistance. **National Academy Press**, 1 (1): 157-169.
- GOULD, F. (1998). Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology** 43 (1): 701 - 726.
- LEVY, S. M. (2005). Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (*Lepidoptera: Noctuidae*) à infecção por nucleopoliedrovírus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP**. Campus de Botucatu, Botucatu.
- MACRAE, T. C., et al., (2005). Laboratory and field evaluation of transgenic soybean exhibiting high dose expression. Of synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of *Lepidoptera*. **Journal of Economic Entomology**. 98 (2):577-587.
- NEGREIRO M.C. et al., (2004). Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (*Lepidoptera: Noctuidae*), resistentes ao AgMNPV. **Semina Ciências Agrárias**, 25 (4): 293-308.
- RAHMAN, M. M., et al., (2007). Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Electronic Biotechnology**, 10 (2): 241-251.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. (2004). Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (*Insecta: Lepidoptera: Noctuidae*). **Genetics and Molecular Biology** 27 (3): 378-384.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. et al., (2014). Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. **Embrapa Soja**.



## **CAPÍTULO I\***

### **RESISTÊNCIA ÀS TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* EM LEPIDOPTERA**

\*Capítulo formatado para a revista **Ciência Rural**, em revisão bibliográfica.

## RESUMO

As perdas nas culturas de interesse econômico são ocasionadas pela ocorrência de pragas e doenças, portanto, diversas estratégias devem ser adotadas para seu controle. O método mais utilizado é a aplicação de inseticidas químicos, que tem ocasionado o surgimento de populações de pragas resistentes. Uma alternativa ao controle químico é a utilização das toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria que produz várias toxinas durante a última fase de crescimento, as quais formam um cristal dentro das células. Essas toxinas denominadas Cry, quando ingeridas, rompem o intestino dos insetos suscetíveis, causando sua morte e são amplamente utilizadas para controlar as larvas de lepidópteros. Tais toxinas foram introduzidas em plantas cultivadas para oferecer uma proteção eficaz contra as pragas, no entanto, estas têm desenvolvido resistência. Dessa forma, pesquisas têm sido realizadas para determinar quais mecanismos de defesa presentes nos insetos que interferem no processo de intoxicação pelas proteínas Cry. Dentre as causas mais prováveis estão alterações nos receptores de toxinas, mudanças das proteases intestinais e ativação do sistema imunológico. O desenvolvimento de resistência é afetado por fatores genéticos, como a frequência inicial do alelo de resistência, dominância dos alelos de resistência e sua influência no custo adaptativo do inseto. Desse modo, tem-se desenvolvido um conjunto de estratégias para o manejo da resistência que é utilizado desde a introdução das plantas Bt e é baseado no uso da alta dose, área de refúgio e, piramidação de genes. Quando o manejo da resistência é realizado adequada e preventivamente, retarda-se a adoção de medidas drásticas como, por exemplo, a generalização de populações resistentes e retirada do evento do mercado. Assim, com a adequação da tecnologia empregada, o entendimento dos mecanismos de resistência do inseto, a utilização responsável de culturas Bt, sua vida útil poderá ser prolongada e mais lucrativa para toda a cadeia produtiva.

Palavras-chave: Resistência, *Bacillus thuringiensis*, toxinas Cry, Lepidoptera.

## ABSTRACT

Losses in crops of economic interest are caused by environmental factors and may be increased by the occurrence of pests and diseases, so different strategies should be adopted to control. The most used method is the application of chemical insecticides, which has led to the emergence of resistant pest populations. An alternative to chemical control is the use of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt), a bacterium which produces a number of toxins during the last phase of growth, which form a crystal within the cell. These so-called Cry toxins when ingested, disrupt the gut of susceptible insects, causing their death and are widely used to control lepidopteran larvae. These toxins have been introduced in many crops to provide effective protection against pests, however, they have developed resistance. Thus, research has been conducted to determine which defense mechanisms, found in insects that interfere with the process of poisoning the Cry proteins. Among the most likely causes are changes in receptor toxins, changes in intestinal proteases and activation of the immune system. The development of resistance is affected by genetic factors, as the initial frequency of resistance allele, dominance of resistance alleles and their influence on the fitness cost insect. Thus, it has developed a set of strategies for managing the resistance, that has been used since the introduction of Bt plants and is based on the use of high dose, refuge area and pyramiding of genes. When the resistance management is performed properly and preventively slows to adopt drastic measures such as, for example, the spread of resistant populations and withdrawal from the market of the event. So with the appropriateness of the technology employed the understanding of insect resistance mechanisms, the responsible use of Bt crops, its life may be prolonged and more profitable for the entire production chain.

Keywords: Resistance, *Bacillus thuringiensis*, Cry toxins, Lepidoptera.

## 1.1 Introdução

Os insetos podem causar danos diretos, danificando as partes da planta que serão comercializadas, ou indiretos, comprometendo as partes sem interesse comercial, mas com efeito direto na produtividade. Estima-se que 1/3 da produção agrícola do mundo tem sido prejudicada devido aos insetos-pragas, patógenos e plantas daninhas (MEISSLE et al., 2010). Dentre os insetos-pragas, a ordem Lepidoptera representa um grupo diverso e importante agronomicamente, entre os quais, diversos membros da família Noctuidae são considerados os mais prejudiciais para as culturas. Nesse grupo estão presentes três das principais pragas das culturas do mundo; *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) causando danos importantes na África, sul da Europa, Ásia, Austrália e Pacífico, *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chloridea virescens* Fabricius, 1777 (Lepidoptera: Noctuidae) principalmente nas Américas. As perdas associadas às pragas nas principais culturas variam de 52% em trigo até 84% em algodão (DEVINE e FURLONG, 2007).

O controle das populações de pragas agrícolas é realizado principalmente através da aplicação de inseticidas químicos como piretroides e organofosforados (MEISSLE et al., 2010). Seu uso indiscriminado pode causar diversos problemas, como poluição ambiental, efeitos nocivos na saúde humana, como câncer e distúrbios do sistema imunológico, sem contar com a pressão de seleção de populações resistentes de insetos. Esta última tem causado surtos significativos e importantes de pragas secundárias (DEVINE e FURLONG, 2007).

Dentre as alternativas para o controle de populações de lepidópteros de importância agrícola encontra-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*. A principal característica desta bactéria, é que durante a esporulação ocorre a produção de uma inclusão parasporal formada por um ou mais corpos cristalinos de natureza proteica, que são tóxicas para diversos invertebrados, especialmente, larvas de insetos. Estas proteínas são chamadas Cry e são as bases do inseticida biológico mais utilizado no mundo atualmente (TABASHNIK et al, 2010).

Diferentes produtos à base de Bt foram desenvolvidos para o controle de pragas na agricultura. A maior parte deles é baseada em preparações de esporos-cristal derivados de algumas estirpes de tipo selvagem, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 que produz Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa; ou *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD-137 que produz diferentes toxinas Cry, tais como Cry1Aa, Cry1b, Cry1Ca e Cry1Da (SOBERÓN et al., 2009). Os produtos Bt pulverizáveis apresentam uso limitado na agricultura, pois são sensíveis à radiação solar e tem uma atividade limitada contra as lagartas brocas de lepidópteros, pois as toxinas Cry são específicas para os estágios larvais iniciais. No entanto, um importante avanço

na redução de inseticidas químicos na agricultura veio com o desenvolvimento e utilização das culturas transgênicas, que são capazes de expressar toxinas Cry. Em plantas transgênicas, essa proteína é produzida continuamente, com proteção à degradação UV, visando o controle de pragas que atacam tanto a parte externa como a parte interna da planta (TABASHNIK et al, 2010).

Em 2009, mais de 40 milhões de hectares de culturas Bt foram cultivados em todo o mundo, resultando em uma redução significativa no uso de inseticidas químicos e contribuindo em alguns casos, com a supressão de certas pragas de insetos como *Pectinophora gossypiella* (Saunders 1844) (Lepidoptera: Gelechiidae), que ataca o algodoeiro. Até 2010, as mais importantes culturas Bt eram milho, algodão e canola (TABASHNIK et al, 2010). O algodão comercial Bt expressa a toxina Cry1Ac que controla pragas de lepidópteros como *H. zea* e *P. gossypiella*, enquanto o milho Bt expressa Cry1Ac com foco no controle de lepidópteros como *C. virescens* e *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) (CHRISTOU et al., 2006).

Apesar dos benefícios descritos anteriormente, o cultivo em larga escala de plantas Bt tem levantado questões sobre os possíveis efeitos adversos em longo prazo no ambiente. Os principais problemas que podem surgir com esta tecnologia são: o desenvolvimento da resistência em pragas pela pressão de seleção, o potencial impacto sobre o solo e insetos benéficos, como predadores e parasitóides, assim como o possível aumento do número de pragas secundárias e da transferência horizontal de transgenes para espécies selvagens (SANAHUJA et al., 2011). Diante disso, o impacto das culturas transgênicas deve ser examinado cuidadosamente antes da liberação para seu uso comercial, respeitando as normas de biossegurança e as recomendações definidas pelas empresas detentoras da tecnologia, e uso adequado das estratégias de manejo de resistência dos insetos (IBRAHIM et al., 2016).

## 1.2 As Toxinas Cry e seu uso na Agricultura

*Bacillus thuringiensis* é um bacilo gram-positivo, de flagelação períttrica, medindo de 3 a 5 µm de comprimento por 1,2 µm de largura, apresentando característica de desenvolver esporos elipsoidais que não causam inchaço do perfil bacilar. É um microrganismo anaeróbio facultativo, quimioorganótrofo com atividade de catalase, que ocorre naturalmente no solo. Foi identificado pela primeira vez em 1911, quando se descobriu sua ação letal sobre larvas de dípteros. A primeira formulação comercial foi disponibilizada na França em 1938. Em 1950, teve início sua utilização comercial nos Estados Unidos (GORDON et al., 1973).

A característica mais interessante de *B. thuringiensis* é a produção de cristais de proteínas com ação inseticida. Além das  $\delta$ -endotoxinas produzidas durante a fase de esporulação, esta bactéria produz ainda outras proteínas tóxicas, tais como  $\beta$ -exotoxinas, enterotoxinas, exoenzimas, hemolisinas, as proteínas inseticidas na fase vegetativa (VIPs), toxinas Cyt e toxinas Cry. Diferentemente das  $\delta$ -endotoxinas, as toxinas Cyt não produzem cristais e possuem um maior espectro de ação contra insetos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Além destas proteínas, podem também ser expressas as proteínas VIPs, que possuem elevada toxicidade para lepidópteros e atuam de modo semelhante às toxinas Cry (CRICKMORE et al., 2012).

As toxinas Cry são definidas como: proteínas que fazem parte da inclusão parasporal cristalina de *B. thuringiensis* e que têm um efeito tóxico para um organismo alvo. Esta definição levou ao aparecimento de grupos de toxinas definidas como proteínas formadas a partir de três domínios, as toxinas binárias ou as toxinas ativas (CRICKMORE et al., 2012). As proteínas de três domínios representam a maior parte das toxinas Cry, formando 53 dos 70 grupos descritos (PARDO-LÓPEZ et al., 2012).

Os produtos formulados a partir das toxinas Cry apresentam amplo espectro de aplicação como agentes de controle biológico. Tais formulações podem ser sólidas (em pó ou granulada) ou líquidas. Atualmente, existe mais de 400 formulações registradas no mercado, a maioria delas é aplicada diretamente em pulverizações, embora os esporos sejam inativados em alguns produtos pela luz ultravioleta. Uma alternativa, e de grande sucesso tem sido a expressão das toxinas nas plantas transgênicas, método mais eficaz no controle do inseto-alvo (KHETAN, 2001).

A engenharia genética desenvolveu muitas espécies de plantas que expressam genes Cry de Bt e assim, foram obtidas "plantas inseticidas" ou comumente referidas como "plantas ou culturas Bt". A produção destas plantas não apresentam os problemas que as formulações apresentavam como a falta de estabilidade em condições de campo devido à luz ultravioleta e da incapacidade de chegar a todos os tecidos das plantas, o que os tornava ineficaz contra as lagartas.

O primeiro relato de uma planta transgênica com um gene Cry de *B. thuringiensis* data de 1987 (VAECK et al., 1987). As plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) produziram quantidades suficientes de proteína Cry para controlar larvas do primeiro estágio de *Manduca sexta* (L. 1763) (Lepidoptera: Sphingidae). Desde então, pelo menos dez diferentes tipos de genes Cry foram introduzidas em 26 espécies de plantas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1H, Cry2Aa, Cry3A, Cry6A e Cry9C (HOSSAIN et al., 2004). A utilização deste

tipo de planta tem a vantagem de reduzir a necessidade dos inseticidas e proporcionar uma proteção durante todas as etapas de crescimento, afetar apenas insetos expostos à toxina, ou seja, aqueles que se alimentam das culturas, promovendo, aos agricultores, uma alternativa aos pesticidas químicos tradicionais (KHETAN, 2001).

### 1.3 Modo de Ação das Toxinas Cry

As toxinas Cry de *B. thuringiensis* atuam por ingestão, ou seja, as proteínas tóxicas associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino médio dos insetos, causando lise osmótica, por meio da formação de poros na membrana celular, ruptura da integridade intestinal e, conseqüentemente, na digestão e morte do inseto (FERRÉ e VAN RIE, 2002).

O modo de ação é um processo complexo e tem sido estudado em Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (JURAT-FUENTES e JACKSON, 2011). As proteínas passam de pró-toxinas para oligômeros que se inserem nas membranas das células do intestino médio do inseto, causando o vazamento de íons e a lise celular. As inclusões cristalinas são ingeridas por larvas e são dissolvidas em meio alcalino no intestino médio, e as pró-toxinas inativas são solubilizadas por proteases do intestino médio, produzindo proteínas resistentes a proteases de 60 a 70 kDa. A ativação da toxina envolve a remoção proteolítica de um peptídeo N-terminal com 25 a 30 aminoácidos para proteínas Cry1, 58 para Cry3A e 49 para CryAa e, aproximadamente metade da proteína restante do C-terminal em longas pró-toxinas Cry. A princípio a toxina ativada se liga a receptores glicoprotéicos específicos nas microvilosidades do intestino, formando poros líticos nas microvilosidades da membrana apical. Posteriormente, ocorre lise celular e o rompimento do epitélio no intestino médio, liberando o conteúdo celular, fornecendo aos esporos um meio propício que leva a uma septicemia e a morte do inseto (FERRÉ e VAN RIE, 2002).

Em adição ao esquema clássico, dois grupos de pesquisadores descreveram modelos que compõem o mecanismo de ação. O primeiro modelo, postula a formação de um oligômero por ligação a um receptor secundário inserido na membrana do intestino médio para formar poros que causam um desequilíbrio osmótico que conduz à ruptura celular (BRAVO et al., 2011). O segundo modelo, propõe que o receptor de membrana de ligação primária desencadeia uma série de sinais intracelulares que resultam em morte celular (IBRAHIM et al., 2010).

#### 1.4 Mecanismos de Resistência dos Lepidópteros às Toxinas Cry

Uma das principais ameaças para a viabilidade agrônômica das culturas Bt é o desenvolvimento de resistência das pragas às toxinas Cry. Em condições de laboratório tem-se obtido insetos resistentes às toxinas Cry-3d. O processo utilizado consiste em submeter as lagartas a altas doses da toxina e selecionar as que conseguem sobreviver para continuar perpetuar sua criação. Depois de aproximadamente 15 a 30 gerações, de acordo com cada espécie, é possível obter populações geneticamente resistentes às toxinas usadas na pressão da seleção (FERRÉ e VAN RIE, 2002). Têm-se pesquisado as rotas genéticas da evolução da resistência e no momento se conhecem alguns dos mecanismos que têm permitido aos insetos resistir à toxicidade de algumas toxinas Cry.

As mudanças em qualquer uma das etapas do mecanismo de ação das toxinas Cry pode conferir resistência aos insetos (GRIFFITTS e AROIAN, 2005; IBRAHIM et al., 2010). O mecanismo de resistência mais comum é uma alteração na ligação das proteínas Cry para os receptores localizados na superfície das células epiteliais do intestino (HERRERO et al., 2001). Outro mecanismo de resistência caracterizado consiste na modificação das proteases intestinais responsáveis pela ativação proteolítica (OPPERT et al., 1997). Por último, a ativação do sistema imunológico e o aumento na produção de esterases também têm sido associados com a resistência (CANDAS et al., 2003).

O primeiro estudo a mostrar uma alteração da ligação das toxinas Cry nas membranas das células epiteliais foi realizado com uma população de *Plodia interpunctella* (Hübner, [1813]) (Lepidoptera: Pyralidae), resistente à proteína Cry1Ab (VAN RIE et al., 1990). Posteriormente, outros autores chegaram a conclusões semelhantes com outras populações resistentes de diferentes espécies de lepidópteros, que também mostraram uma alteração nos sítios de ligação das proteínas Cry, em *P. xylostella* (FERRÉ et al., 1991; TABASHNIK et al., 1997; BALLESTER et al., 1999; SAYYED et al., 2005), *C. virescens* (LEE et al., 1995; JURAT-FUENTES et al., 2003), *P. gossypiella* (GONZÁLEZ-CABRERA et al., 2003), *H. armigera* (AKHURST et al., 2003; XU e WU, 2008; CACCIA et al., 2010), *O. nubilalis* (SIQUEIRA et al., 2006; CRESPO et al., 2011), *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) (WANG et al., 2007) e *Helicoverpa punctigera* Wallengren, 1860 (Lepidoptera: Noctuidae) (CACCIA et al., 2010).

FERRÉ e VAN RIE (2002) analisaram o padrão de ligação das proteínas Cry em populações resistentes selecionadas a partir de uma única proteína Cry, a qual desenvolveu resistência cruzada a outras toxinas. A resistência cruzada ocorre quando uma população de



insetos é resistente a dois ou mais inseticidas de um mesmo mecanismo de ação, devido a um só mecanismo de resistência, a diferença com a resistência múltipla, a qual ocorre quando uma população resistente possui dois ou mais mecanismos de resistência distintos, que conferem o comportamento resistente a um ou vários inseticidas com diferentes mecanismos de ação (YU, 2008). Os resultados mostraram que os padrões de resistência cruzada às proteínas Cry ocorrem em proteínas que compartilham o mesmo sítio de ligação e, portanto, parecem ter o mesmo modo de ação.

A caracterização da ligação das proteínas Cry nas populações de insetos resistentes levou à definição da resistência do tipo 1, a mais comum na ordem Lepidoptera. Este tipo de resistência é caracterizado por apresentar elevados níveis de resistência para pelo menos uma das toxinas da classe Cry1A e nenhuma resistência cruzada à proteína Cry1C (TABASHNIK et al., 1998). Em populações resistentes de *C. virescens*, *P. gossypiella* e *H. armigera*, a resistência do tipo 1, está associada com mutações no gene da caderina (BRAVO e SOBERÓN, 2008, FABRICK et al., 2014). O papel fundamental da caderina na resistência foi descoberto por meio de populações resistentes de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), que possuíam níveis reduzidos deste receptor em comparação com populações suscetíveis (YANG et al., 2011). Esta hipótese é confirmada em diferentes ensaios de suscetibilidade com proteínas geneticamente modificadas, Cry1AbMod e Cry1AcMod, que não precisam da ligação da caderina para oligomerizar. Os resultados indicaram que estas toxinas são capazes de matar as larvas de *P. gossypiella* cuja resistência tem sido caracterizada por mutações no gene da caderina (SOBERÓN et al., 2007). Populações de campo de *H. armigera* mostraram variações da frequência do gene da caderina, sendo suas taxas de resistência a Cry1Ac de 227,9 vezes quando comparada a população resistente com a suscetível (NAIR et al., 2013). Além disso, essas proteínas também são tóxicas para uma população de *T. ni* (FRANKLIN et al., 2009) em que a resistência é obtida por uma alteração na ligação das toxinas Cry1Ab e Cry1Ac (WANG et al., 2007) e o fenótipo segrega com o gene *abcc2* (BAXTER et al., 2011). O papel exato do gene *abcc2* no mecanismo de ação das toxinas Cry permanece indefinido. Mutações nos genes *abcc2* têm sido mostradas por estarem ligadas a elevados níveis de resistência a Cry1Ac em diferentes espécies de lepidópteros (GAHAN et al., 2010; BAXTER et al., 2011; ATSUMI et al., 2012; XIAO et al., 2014). ZHAO et al., (2016) reportaram no estudo com *H. armigera*, uma ligação direta da toxina Cry1Ac para o gene *abcc*, mas ainda é necessário demonstrar que a Cry1Ac liga-se diretamente com *abcc2* transportador. Um estudo recente mostrou que as proteínas Cry1AMod são muito mais ativas que as toxinas selvagens contra as populações resistentes de *P. xylostella* e *O. nubilalis* (TABASHNIK et al., 2011),

sendo descrito uma alteração da ligação das proteínas Cry1A que não estavam relacionadas com caderina (TABASHNIK et al., 1997; BAXTER et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2006; BEL et al., 2009; GAHAN et al., 2010; CRESPO et al., 2011; KHAJURIA et al., 2011). No entanto, ainda é difícil identificar qual é a molécula responsável pelas alterações da ligação (GRIFFITTS e AROIAN, 2005; HECKEL et al., 2007).

HERRERO et al. (2005) descreveram uma população de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) resistente à proteína Cry1C. No geral não foi detectada a expressão da proteína *apn1* e, além disso, populações resistentes de *O. nubilalis* (KHAJURIA et al., 2011) e de *D. saccharalis* (YANG et al., 2010) mostraram uma redução nos níveis de expressão de aminopeptídeos. Na população resistente à proteína Cry1Ac de *H. armigera* foi detectada uma deleção no gene que codifica *apn1* (ZHANG et al., 2009). A respeito da fosfatase alcalina (ALP), tem-se observado que em algumas populações resistentes de *C. virescens*, *H. armigera* e *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) foi detectada uma diminuição na sua atividade nas vesículas da membrana epitelial, mas nenhuma variação na atividade de aminopeptidase (JURAT-FUENTES et al., 2011).

A ativação das proteínas Cry por proteases intestinais no intestino das larvas é um dos passos essenciais no mecanismo de ação. Uma alteração deste processo foi descrito pela primeira vez em uma população resistente de *P. interpunctella* e estava associada com a falta de uma protease intestinal nas larvas resistentes (OPPERT et al., 1997). A população foi alimentada com uma proteína ativada *in vitro* e observou-se uma diminuição na resistência de 11 vezes, sustentando a hipótese que esta resistência se deve a uma falha na ativação da proteína (HERRERO et al., 2001). Semelhante aspecto foi observado em uma população de *O. nubilalis* e está relacionada com uma atividade reduzida das proteases (HUANG et al., 1999; LI et al., 2004). As alterações na ativação das pró-toxinas foram evidenciadas em populações resistentes de *C. virescens* (FORCADA et al., 1999) e *H. armigera* (SAYYED et al., 2001; CHANDRASHEKAR & GUJAR, 2004).

Estudos descreveram que a resistência a proteínas Cry pode ser considerado uma herança monogênica, embora uma única população de insetos possa ter diferentes mecanismos de resistência (FERRÉ e VAN RIE, 2002). Por exemplo, na população de *C. virescens* YHD3, resistente à proteína Cry1Ac, foram caracterizadas mutações dos genes *abcc2* e *cdh* ligados à resistência com alterações nas ligações das proteínas Cry1A (GAHAN et al., 2010) e também mostra uma diminuição nos níveis da atividade da ALP (JURAT-FUENTES et al., 2011). Além disso, detecta-se uma redução nos níveis de expressão da ALP em outras populações (CXC e KCBhyb) de *C. virescens* resistentes às proteínas Cry1Ac e Cry2Aa (JURAT-FUENTES et al.,

2011). A resistência na população de *C. virescens* CXC não se deve a nenhuma alteração na ligação das proteínas Cry1A, enquanto na população de *C. virescens* KCBhyb houve uma diminuição da ligação na proteína Cry1Aa (JURAT-FUENTES et al., 2003). Em ambas, as populações mostraram uma alteração na proteólise da pró-toxina (FORCADA et al., 1999) e maior capacidade de recuperação do dano celular causado pelas proteínas Cry (FORCADA et al., 1999; MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al., 1999). Em uma população resistente a Cry1Ab de *P. xylostella*, houve segregação de forma independente da resistência a Cry1C (LIU e TABASHNIK, 1997). Outra prova da ocorrência de múltiplo mecanismo de resistência vem de uma população de *P. interpunctella*, em que primeiro foi associado à resistência na perda da protease intestinal, após uma alteração da ligação da toxina Cry1Ab à membrana epitelial e, finalmente, utilizando uma abordagem proteômica, com um aumento do metabolismo oxidativo nos insetos resistentes (TABASHNIK et al., 1997).

Além dos mecanismos de resistência mencionados acima, autores têm sugerido outros menos comuns, como o sequestro de proteínas Cry por ação das esterases (GUNNING et al., 2005; SAYYED et al., 2008). Este mecanismo tem sido extensivamente estudado por seu envolvimento na resistência a inseticidas químicos. Outros mecanismos de resistência estão relacionados com a ativação do sistema imune em populações resistentes, com aumento da taxa de reparação celular da membrana epitelial do intestino médio, ou aumento da atividade antioxidante (FORCADA et al., 1999; MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al., 1999; CANDAS et al., 2003; RAHMAN et al., 2004; MA et al., 2005; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010).

### 1.5 Resistência dos Lepidópteros às Toxinas Cry

O termo resistência pode ser definido como uma alteração hereditária da sensibilidade de uma população de pragas para um determinado produto, que se reflete na perda de sua eficiência para atingir o nível esperado de controle (TABASHNIK et al., 1998).

A resistência de pragas pode ser definida de duas formas: em condições de laboratório e em condições de campo. A resistência em condições de laboratório é definida como uma redução estatisticamente significativa, medida geneticamente da sensibilidade do organismo alvo para o agente de controle, em relação a uma espécie de laboratório suscetível. Neste cenário, a resistência típica é observada pelo aumento na concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>), ou como o aumento do crescimento e/ou sobrevivência a uma concentração discriminatória, em comparação com colônias suscetíveis. Embora as estimativas com bases laboratoriais de resistência sejam essenciais em programas de manejo da resistência pró-ativas para alcançar

um alerta precoce de redução da suscetibilidade larval e resistência a potenciais problemas, a última análise para a detecção de resistência deve ser avaliada em condições de campo (MOAR et al., 2008).

Por outro lado, a resistência em condições de campo pode ser definida como um aumento da capacidade geneticamente medida de uma praga alvo de alimentar-se e desenvolver-se por completo após terem se alimentado de plantas Bt em campo. Esta definição incorpora o potencial de resistência incompleta, por exemplo, aumento da alimentação, atraso ou desenvolvimento incompleto para adultos, e os custos adaptativos (MOAR et al., 2008).

A maioria dos relatos de resistência às toxinas Cry das culturas Bt, são de populações resistentes sob condições de laboratório (Tabela 1). Embora, populações de laboratório possam não conter todos os genes de resistência presentes nas populações de campo e os experimentos de seleção controlados não possam prever se a resistência irá se desenvolver em campo ou, ainda, qual mecanismo de resistência será selecionado, elas são importantes para determinar os mecanismos de resistência presentes em determinada população e se estes conferem resistência cruzada ou resistência múltipla (FERRÉ; VAN RIE, 2002). As variações de suscetibilidade às toxinas apresentada pelos insetos antes de serem submetidos à pressão de seleção são causadas pela variabilidade genética. Em uma população onde a diversidade é alta, cada indivíduo vai responder de uma forma diferente a algum estímulo, neste caso às toxinas Cry. Cada população submetida a essa pressão de seleção tem um comportamento diferente dependendo da frequência inicial de alelos de resistência, número de alelos de resistência e da dominância desses alelos. Os alelos de resistência podem estar presentes na população antes de ser exposta à pressão de seleção. Sua frequência é estimada e varia entre  $10^{-2}$  até  $10^{-13}$  (TABASHNIK et al., 2008; GASSMAN et al., 2009).

**Tabela 1.** Estudos de resistência dos lepidópteros às toxinas Cry nas culturas Bt sob condições de laboratório

Inseto	Cultura Bt	Toxina	Referências
<b>Noctuidae</b>			
<i>Helicoverpa zea</i> Boddie, 1850	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	GREENPLATE et al, 2003; ALI et al, 2006
	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry2Ab	GREENPLATE et al, 2003
	Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	Cry1Ac	STEWART et al, 1996
<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1805)	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	WU et al, 2002; FENGXIA et al, 2004; LU et al, 2004; BIRD e AKHURST (2004; 2005); GUNNING et al, 2005; WU et al, 2005; WU et al, 2006.
	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	GOULD et al, 1997; GREENPLATE et al, 2003; GUTIERREZ et al, 2006; GAHAN et al, 2007 (a,b)
<i>Chloridea virescens</i> Fabricius, 1777	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry2Ab	GORE et al, 2003; GREENPLATE et al, 2003
	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	STEWART et al, 2001; GREENPLATE et al, 2003; GUTIERREZ et al, 2006
	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	GREENPLATE et al, 2003; GUTIERREZ et al, 2006
<i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith, 1797	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	Cry1F	FARIAS et al., 2014
	Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	Cry1Ab	OMOTO et al., 2016.
<i>Trichoplusia ni</i> (Hübner, 1803)	Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	Cry1Ac	STEWART et al, 1996
<i>Spodoptera exigua</i> (Hübner, 1808)	Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	Cry1Ac	STEWART et al, 1996
<b>Crambidae</b>			
<i>Chilo suppressalis</i> (Walker, 1863)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Cry1Ab	ALINIA et al, 2000
<i>Scirpophaga incertulas</i> (Walker, 1863)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Cry1Ab	ALINIA et al, 2000
<i>Cnaphalacrocis medinalis</i> (Guenée, 1854)	Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Cry1Ab	ALINIA et al, 2000
<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner, 1796)	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	Cry1Ac	ALVES et al, 2006
	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	Cry1Ab	CHAUFAUX et al, 2001; HUANG et al, (2002; 2007)
<i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794)	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	Cry1Ab	HUANG et al, 2007
<b>Plutellidae</b>			
<i>Plutella xylostella</i> (Linnaeus, 1758)	Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	Cry1Ac	RAMACHANDRAN et al, 1998 (a, b); STEWART et al, 1996; SAYYED et al, 2003;
<b>Gelechiidae</b>			
<i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders 1844)	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	CARRIERE et al, 2001; TABASHNIK et al, 2002; HIGGINSON et al, 2005; SISTERTON et al, 2005; GASSMAN et al, 2006; GUTIERREZ et al, 2006
	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry Ab	TABASHNIK et al, 2002

O primeiro relato de resistência às toxinas de *B. thuringiensis* ocorreu em 1985, em uma população de laboratório de *P. interpunctella*, a qual apresentou uma razão de resistência de 100 vezes após ser criada por 15 gerações em dieta artificial tratada com Dipel (produto comercial que contém as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, Cry2B) (McGAUGHEY, 1985). Estudos bioquímicos indicaram que essa população possuía uma alteração no sítio de ligação da proteína inseticida no intestino médio. Após 50 anos desde o lançamento do primeiro produto à base de *B. thuringiensis*, foi registrada a primeira evidência de ocorrência de resistência em campo, em populações de *P. xylostella* no Hawaí e Filipinas (TABASHNIK et al., 1990; FERRÉ et al., 1991), seguido de mais casos da mesma espécie em diferentes partes do mundo (FERRÉ et al., 2008). JANMAAT e MYERS (2003) relataram o surgimento de resistência em populações de *T. ni* em casas de vegetação no Canadá.

Os níveis de resistência desenvolvida em campo podem variar de nenhum a grave, dependendo de fatores tais como: a frequência e a magnitude da resistência, a densidade populacional, a distribuição geográfica de populações resistentes e a disponibilidade de controles alternativos (TABASHNIK et al., 2013).

TABASHNIK et al., (2014), definiram uma classificação dos níveis de resistência, os quais implicam na diminuição da suscetibilidade das populações em campo e definem quatro categorias: 1) resistência incipiente <1% de insetos resistentes; 2) alerta precoce de resistência de 1-6% insetos resistentes; 3) >50% insetos resistentes com eficácia reduzida da toxina Bt, mas não relatados e 4) >50% insetos resistentes com uma eficácia reduzida da toxina Bt e relatados ou casos claros de resistência (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição dos casos de resistência às toxinas Bt de lepidópteros no mundo.

DOWNES et al., (2010) usaram o termo resistência incipiente para descrever um aumento significativo na frequência de alelos de resistência que conferem resistência à toxina Cry2Ab em *H. punctigera* e *H. armigera* na Austrália. Os autores detectaram um aumento de 11 vezes na frequência de Cry2Ab em populações expostas a esta toxina. No entanto, eles estimaram que o máximo percentual de insetos resistentes foi de 0,2%, sendo baixo para expressar uma redução da eficácia do algodão Bt.

ZHANG et al., (2011) usaram o termo alerta precoce quando estudaram os níveis de suscetibilidade de *H. armigera* à toxina Cry1Ac, em populações provenientes da China. Os autores demonstraram que 13 populações expostas com algodão Bt tiveram sobrevivência de 1,3%. Relatos de JIN et al., (2013), suportam a conclusão que a exposição a algodão Bt aumentou a frequência de resistência de *H. armigera* com um máximo de 5,4% de insetos resistentes por população. No total, quatro casos de alerta precoce de resistência mostraram um aumento significativo de resistência, com o percentual de insetos resistentes entre 1 e 6%. Além deste caso, determinaram alerta precoce da resistência de *P. gossypiella* ao algodão Bt contendo a toxina Cry1Ac (WANG et al., 2012), em *Ostrinia furnacalis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) e *D. saccharalis* ao milho Bt contendo a toxina Cry1Ab (HUANG et al., 2012).

No entanto, apenas alguns casos evidentes de raças resistentes às plantas Bt, têm sido registrados em populações de campo, dos quais, dois têm ocorrido em condições particulares. O primeiro caso de resistência às plantas contendo as toxinas Cry foi descrito em populações de *S. frugiperda*, em Porto Rico, com milho Bt que expressava a proteína Cry1F. Este caso ocorreu apenas quatro anos após a liberação comercial desse milho, tornando-se o mais rápido a apresentar a resistência a campo para uma cultura contendo genes de *B. thuringiensis* (MATTEN et al., 2008). A suscetibilidade moderada dessa praga contra a proteína expressa na cultura do milho, o plantio contínuo de plantas Bt ao longo do ano, a migração limitada de insetos e condições de secas que concentraram as populações da praga em áreas das culturas geneticamente modificadas irrigadas, foram os fatores que contribuíram para a pressão de seleção sobre as populações selvagens de *S. frugiperda* (STORER et al., 2010). No Brasil, Farias et al., (2014) relataram uma população resistente de *S. frugiperda* ao milho TC1507 expressando a toxina Cry1F. Além disso, MONNERAT et al., (2015) relataram uma diminuição do controle de *S. frugiperda* com milho Bt expressando a toxina Cry1Fa na região do Cerrado brasileiro, mostrando que a população resistente do campo apresentava taxas de resistência 10 vezes maior, em comparação com uma colônia suscetível de laboratório.

O segundo caso foi descrito para *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae) no Sul da África, cujas populações foram selecionadas com o milho Bt expressando a proteína Cry1Ab. Da mesma forma como ocorreu no caso anterior, o milho era cultivado em sistema irrigado, o que pode ter contribuído para aumentar a pressão de seleção e favorecendo a evolução da resistência. Além disso, houve o manejo inadequado da área, já que não foi cumprida uma das exigências para minimizar a ocorrência da resistência, que é o uso de zonas de refúgio com milho convencional ao lado de culturas Bt. O refúgio promove o acasalamento ocasional entre indivíduos resistentes e suscetíveis gerando proles também suscetíveis (VAN, 2007; KRUGER et al., 2011).

O terceiro caso de resistência às plantas Bt foi descrito para *P. gossypiella*, frente à proteína Cry1Ac expressa pelo algodão Bollgard e verificada após 10 anos de cultivo do algodão na Índia. Duas populações de *P. gossypiella* coletadas no campo demonstraram sobrevivência em bioensaios com a proteína Cry1Ac incorporada em dieta artificial. Ambas as populações apresentaram CL<sub>50</sub> 44 vezes superior às populações suscetíveis de laboratório. Entretanto, essa população não demonstrou resistência cruzada ao algodão de segunda geração que expressa as proteínas Cry1Ac/Cry2Ab2 (DHURUA e GUJAR, 2011).

TABASHNIK et al., (2008; 2009) determinaram outro caso de resistência no campo, com *H. zea*, que surgiu nas lavouras de algodão Bt nos Estados Unidos da América. A evidência



da evolução da resistência de *H. zea* à proteína Cry1Ac foi verificada a partir de dados de monitoramento da suscetibilidade, os quais revelaram que a frequência dos alelos de resistência aumentou substancialmente para algumas populações do inseto. Entretanto, outro grupo de pesquisadores discorda da análise e das conclusões obtidas desses dados, pois testes de sobrevivência de lagartas em plantas de algodão Bt não foram realizados. As evidências disponíveis sugerem que a sobrevivência de *H. zea* em algodão Bt no campo é maior para populações resistentes do que para populações suscetíveis. O caso da evolução de resistência de *H. zea* ao algodão Bt é consistente com a teoria que envolve a estratégia de alta dose mais refúgio, pois a resistência, neste caso, não é recessiva e a concentração de Cry1Ac em algodão Bt não é alta o suficiente para matar os descendentes heterozigotos, demonstrando que o evento não atende os requisitos de alta dose (MOAR et al., 2008).

#### 1.6 Fatores que Influenciam a Evolução da Resistência

A evolução da resistência às toxinas Cry expressas em plantas Bt numa população de insetos, é afetada por uma variedade de fatores que interagem entre si e estão relacionados a características do material genético da planta Bt, a bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo (CAPRIO, 1998).

Apesar dos poucos casos de resistência a campo, os estudos realizados em laboratório, ajudaram a estabelecer o atual entendimento das bases genéticas e bioquímica da resistência. Os principais fatores genéticos da população alvo que governam a evolução da resistência são a frequência inicial do alelo de resistência, dominância funcional da resistência e estabilidade pelo custo adaptativo (FERRÉ e VAN RIE, 2002).

A estimativa da frequência inicial de alelos de resistência em populações de campo é um elemento chave para a previsão da evolução da resistência sob pressão seletiva. Para serem efetivos, os programas de monitoramento devem detectar a presença do alelo que confere resistência em frequências muito baixas. Estudos realizados indicam que a frequência desse alelo, em geral, é inferior a 0,001 (Tabela 2). Os bioensaios de diagnóstico são baseados em experimentos que utilizam uma dose letal necessária para matar 99% dos indivíduos suscetíveis; nessa concentração somente os indivíduos resistentes irão sobreviver. Esse método envolve um único experimento e permite testar um grande número de indivíduos, nesse caso o número de insetos amostrados em programas de monitoramento deve estar entre 500 e 1000 (FERRÉ e VAN RIE, 2002). No caso das plantas transgênicas, o monitoramento deve atentar para a quebra da resistência e se possível da frequência dos alelos de resistência nas populações de insetos-

praga. As mudanças nas frequências de resistência de pragas às toxinas Cry devem ser acompanhadas por meio de bioensaios em laboratório. Assim, com o trabalho de monitoramento da suscetibilidade de pragas, é possível avaliar se o programa implementado está sendo efetivo ou não (WAQUIL, 2003).

**Tabela 2.** Frequências dos alelos de resistência nas populações de lepidópteros de campo

Inseto	Cultura	Toxina	Valor inicial	Valor final	Referências
<b>Noctuidae</b>					
<i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith, 1797	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	Vip3Aa20	0,0012	0,0009	BERNARDI et al., 2015.
<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1805)	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	0,0006	0,0003	LI et al., 2007; GAO et al., 2009
	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry2Ab	0,0089	0,0049	MAHON et al., 2007
<i>Helicoverpa zea</i> Boddie, 1850	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	0,0004	0,0000	BURD et al., 2003; JACKSON et al., 2006
<i>Helicoverpa punctigera</i> Wallengren, 1860	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry2Ab	0,0000	0,0030	DOWNES et al., 2009
<b>Crambidae</b>					
<i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794)	Milho ( <i>Zea mays</i> L.)	Cry1Ab	0,0023	0,0030	HUANG et al., 2008
<b>Gelechiidae</b>					
<i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders 1844)	Algodão ( <i>Gossypium</i> spp L.)	Cry1Ac	0,1600	0,0040	TABASHNIK et al., 2005

Acredita-se que o monitoramento da suscetibilidade pode ser capaz de detectar as mudanças na frequência dos genes de resistência antes da ocorrência de falhas no controle devido sua evolução (BERNARDI et al., 2011). Existem vários métodos de monitoramento da suscetibilidade de insetos as toxinas Cry e estes estão inseridos em duas classes: fenotípicos ou genotípicos. Os métodos fenotípicos mensuram a suscetibilidade dos insetos pela exposição às proteínas inseticidas em bioensaios com dieta artificial ou diretamente sobre o tecido vegetal da planta (BERNARDI et al., 2011). Esses métodos são mais eficientes para o monitoramento da resistência de alelos que são aditivos ou dominantes e recomendados para eventos de baixa dose (ANDOW, 2008). Os métodos genotípicos têm como objetivo detectar a frequência inicial de alelos resistentes em populações de campo. São eles: “F<sub>1</sub> Screen” e o “F<sub>2</sub> Screen”. Ambos os métodos podem ser utilizados, entretanto, o tempo e a praticidade devem ser considerados na escolha.

O “F<sub>1</sub> Screen” requer o uso de raça resistente de laboratório e também grande número de famílias (> 1000) e lagartas (5000), o que o torna demorado e de alto custo (GOULD et al.,

1997). ANDOW e ALSTAD (1998) desenvolveram o método “F<sub>2</sub> Screen”, que dispensa o uso de raça resistente, reduz o número de insetos amostrados e o tempo de detecção de alelos raros em populações de campo. Esse método constitui-se das seguintes etapas: as fêmeas acasaladas são amostradas de populações naturais; a progênie de cada fêmea (F<sub>1</sub>) é criada em laboratório e os indivíduos são acasalados entre irmãos; as larvas da geração F<sub>2</sub> são submetidas a um procedimento discriminante adequado para detecção de resistência. Utilizando métodos de estatística bayesiana, a frequência dos alelos de resistência na população fundadora é estimada com um intervalo de confiança. Esses métodos genotípicos são mais eficientes para o monitoramento da resistência de alelos recessivos, sendo recomendados para eventos de alta dose (ANDOW, 2008).

Os valores de frequência alélica obtidos com o método de F<sub>2</sub> screen variam em função da população usada, embora na maioria dos casos, a frequência inicial dos alelos de resistência demonstra ser menor que 10<sup>-3</sup>. Em uma população espanhola de *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre, 1827) (Lepidoptera: Noctuidae), os valores da frequência alélica da resistência à proteína Cry1Ab foram inferiores a 8,6 x 10<sup>-3</sup> (ADREADIS et al., 2007), muito semelhantes aos obtidos para uma população grega com os valores estimados em menos de 9,7 x 10<sup>-3</sup> (ANDOW e ALSTAD, 1998; ANDOW et al., 2000; BOURGUET et al., 2003; ENGELS et al., 2010). A frequência dos alelos de resistência à proteína Cry1Ab, para uma população de *C. virescens* dos Estados Unidos da América, após a introdução do algodão Bt, está compreendida entre 2,6 x 10<sup>-2</sup> e 3,6 x 10<sup>-3</sup> (BLANCO et al., 2009). Em populações australianas de *H. armigera* e *H. punctigera*, após a introdução do algodão Bt, foram realizados testes anuais para estimar a frequência do alelo de resistência às proteínas Cry1Ac e Cry2Ab. Para *H. armigera* mostraram uma baixa frequência de alelos de resistência às proteínas Cry1Ac (menos de 3 x 10<sup>-4</sup>) e Cry2Ab (3,3 x 10<sup>-3</sup>) (MAHON et al., 2007), mas para *H. punctigera* foi detectado um aumento na frequência de alelos de resistência Cry2Ab, de 1,8 x 10<sup>-3</sup> para o período 2004-2007 e de 1,2 x 10<sup>-2</sup> para o período 2008-2009 (DOWNES et al., 2010). O aumento na frequência dos alelos de resistência não está necessariamente relacionado com a diminuição da eficácia das plantas Bt no controle de pragas, um exemplo disso é a população de campo na China de *H. armigera*, controladas com algodão Bt. Os valores obtidos foram de 5,8 x 10<sup>-3</sup> em 1999 (HE et al., 2001), de 1,5 x 10<sup>-2</sup> no período de 2003-2005 (Xu et al., 2009) e de 7,5 x 10<sup>-2</sup> em 2007 (LIU et al., 2010). No entanto, a frequência de alelos de resistência à proteína Cry1Ac em outras regiões da China com algodão Bt, foi estimada abaixo de 3 x 10<sup>-4</sup> no período 2006-2008 (GAO et al., 2009).

Um alelo que confere resistência a uma determinada toxina Cry pode ser recessivo para

alta dose e dominante para uma dose moderada ou baixa. Alelos recessivos são genes que se expressam somente em homozigose, isto é, estando presentes em ambos os locus do par. Já alelos dominantes são alelos que se expressam mesmo em heterozigose, ou seja, mesmo que no outro loci esteja um alelo diferente. Estes dois tipos de alelos determinam os padrões de herança recessiva e dominante, em um caso de dominância completa. O padrão de herança recessivo é aquele em que os dois alelos necessitam passar por uma mutação para produzir alteração no fenótipo. Já no padrão de herança dominante, somente um alelo mutante é suficiente para produzir o fenótipo alterado (ALVES et al., 2006).

Estudos com populações resistentes de *O. nubilalis* e *D. saccharalis* mostraram que o nível de dominância/recessividade depende da concentração de toxina usada nos bioensaios, porque a dominância aumentou com a diminuição da concentração da proteína Cry1Ab (CRESPO et al., 2009; WU et al., 2009). No entanto, há também relatos de resistência dominante incompleta em *C. virescens*, *P. xylostella* e *O. nubilalis* (GOULD et al., 1992; HUANG et al., 1999a; SAYYED et al., 2005) ou semi-dominante em *H. armigera* (KRANTHI et al., 2006).

A estabilidade da resistência pode ser determinada pelo custo adaptativo, que confere aos indivíduos um ou mais genes de resistência, sendo, portanto, fundamental para projetar estratégias de manejo com base na rotação de inseticidas ou plantas que expressam parâmetros diferentes de proteínas Cry. Na maioria dos casos observados, a resistência às toxinas Cry é instável e reversa, uma vez terminada a pressão de seleção (FERRÉ e VAN RIE, 2002; GASSMANN et al., 2009). Porém, houve casos em que os níveis de resistência não diminuíram (MCGAUGHEY, 1985; LI et al., 1996). Estudos têm associado a resistência às toxinas Cry a um menor custo adaptativo dos indivíduos resistentes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Estudos de custo adaptativo de lepidópteros nas culturas Bt

Inseto	Referências
Gelechiidae	
<i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders 1844)	CARRIÈRE et al., (2001, 2004, 2007); HIGGINSON et al., 2005; GAHAN et al., 2005; GASSMANN et al., 2008.
Noctuidae	
<i>Busseola fusca</i> (Fuller, 1901)	AIMANOVA et al., 2006
<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1805)	AKHURST et al., 2003; BIRD e AKHURST, (2004, 2005); LIANG et al., (2007, 2008); ZHAO et al., 2008
<i>Helicoverpa zea</i> Boddie, 1850	BURD et al., 2003; JACKSON et al., 2006
<i>Chloridea virescens</i> Fabricius, 1777	STONE et al., 1989; SMIS e STONE, 1991; JOHNSON et al., 1997; GOULD e ANDERSON, 1997; GAHAN et al., 2005; JACKSON et al., 2007;
<i>Spodoptera exigua</i> (Hübner, 1808)	DINGHA et al., 2004; MOAR et al., 1995.
<i>Spodoptera littoralis</i> Boisduval, 1833	MÜLLER-COHN et al., 1996.
<i>Trichoplusia ni</i> (Hübner, 1803)	JANMAAT e MYERS, 2003; TAMEZ-GUERRA et al., 2006.
Plutellidae	
<i>Plutella xylostella</i> (Linnaeus, 1758)	TABASHNIK et al., (1990, 1994, 1997); GROETERS et al., (1993, 1994); PEREZ et al., 1996; LIU et al., 1996; TANG et al., 1997; WRIGHT et al., 1997; BAUR et al., 1998; RAMACHANDRAN et al., 1998(a,b); SHIRAI et al., 1998; IMAI e MORI, 1999; ZHAO et al., 2000; SAYYED et al., (2000, 2004); SAYYED e WRIGHT, 2001; CERDA et al., 2003; RAYMOND et al., (2005, 2006, 2007); MATTEN et al., 2008.
Erebidae	
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner, 1818)	SOSA-GÓMEZ e MIRANDA, 2012
Crambidae	
<i>Chilo suppressalis</i> (Walker, 1863)	ALINA et al., 2000.
<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner, 1796)	BOLIN et al., 1998; HUANG et al., (1999, 2002, 2005); LI et al., 2007.
Pyralidae	
<i>Plodia interpunctella</i> (Hübner, [1813])	McGAUGHEY, 1985; McGAUGHEY e BEEMAN, 1988; JOHNSON e McGAUGHEY, 1996; OPPERT et al., 2000.

### 1.7 Estratégias de Manejo da Resistência às Toxinas Cry

Manejo da resistência de insetos é o termo usado para descrever um conjunto de práticas que visam reduzir o potencial para o desenvolvimento de resistência das pragas a seus agentes de controle. Com o advento das plantas transgênicas que expressam toxinas Cry de *B. thuringiensis*, as pesquisas e os trabalhos nessa área se tornaram cada vez mais importantes e são essenciais para a manutenção da produtividade destas culturas (LEMESLE et al., 2010).

As estratégias de manejo podem ser utilizadas separadamente ou combinadas entre si. Entre elas estão: alta dose, área de refúgio, plantas com pirâmides de genes, agentes utilizados com a estratégia de baixa dose (controle biológico), rotação de culturas, mistura de sementes e

plantas armadilhas (TABASHNIK et al. 2009).

A estratégia de alta dose foi desenvolvida a partir da análise dos níveis de resistência encontrados na literatura da geração F<sub>1</sub> em cruzamentos de raças de insetos-alvo resistentes e suscetíveis a proteínas de *B. thuringiensis*. O conceito de alta dose se refere ao uso de um híbrido ou variedade que expresse a toxina Cry em alta concentração em todos os tecidos da planta, que é igual ou superior a 25 vezes a concentração letal que possibilita à mortalidade de 99% da população heterozigota da praga-alvo (Caprio et al, 2000). O acasalamento ocasional entre indivíduos suscetíveis e resistentes resultará numa progênie heterozigota, e que teoricamente, não pode sobreviver às altas doses de proteínas Cry produzidas pelas plantas Bt. Acredita-se, que a expressão de altas doses de proteína nas plantas, se combinada com o plantio e a manutenção de zonas de refúgio, pode postergar o surgimento da resistência (ROUSH, 1994). A utilidade da estratégia de alta dose e refúgio foi originalmente baseada em projeções de modelos matemáticos que simulavam o crescimento populacional dos insetos em diferentes condições. Entretanto, alguns estudos de laboratório, ensaios controlados em casa de vegetação e ensaios de campo forneceram evidências experimentais para essas estratégias, tornando-se uma combinação importante de técnicas para retardar a evolução da resistência de pragas-alvo de plantas Bt (GOULD, 1998).

O conceito de área de refúgio compreende a área onde a praga não é exposta à pressão de seleção da proteína inseticida presente no campo Bt, na qual podem sobreviver, reproduzir-se e acasalar-se com os indivíduos sobreviventes das áreas com cultura Bt. A estratégia de zonas de refúgio promove à proximidade dos insetos suscetíveis presentes nas plantas não Bt com aqueles sobreviventes nas plantas Bt, os quais apresentam maiores probabilidades de terem sido selecionadas com a característica de resistência. Para que esta estratégia seja eficaz, a frequência de alelos de resistência no campo deve ser baixa, menor que  $10^{-3}$ , ou seja, extremamente improvável o acasalamento entre indivíduos resistentes (ROUSH, 1994; GOULD, 1998). Além disso, a zona de refúgio não deve estar a mais de 800 metros de distância das plantas transgênicas (VILARINHO, 2007). A área de refúgio, revelou-se eficaz no controle da resistência (HUANG et al., 2011; SIEGFRIED e HELLMICH, 2012), mas apresenta algumas desvantagens em relação à preservação a longo prazo. Por exemplo, a assincronia da fenologia entre insetos suscetíveis e resistentes pode comprometer o acasalamento entre eles. Além disso, a presença de múltiplas pragas da mesma planta Bt, cada uma com uma suscetibilidade diferente à toxina Cry expressa pode resultar em uma falha na premissa da resistência ser funcionalmente recessiva (BATES et al., 2005; FERRÉ et al., 2008).

A pirâmidação de genes envolve a expressão de duas ou mais proteínas na mesma

variedade transgênica e os alelos de resistência são herdados e atuam de modo independente. A base dessa estratégia é, algumas vezes, referida como morte redundante, isso porque os insetos adaptados a uma proteína morrem devido à segunda proteína e um inseto totalmente suscetível morre devido a uma ou às duas proteínas (GOULD, 1998). Dessa forma, a teoria prediz que a evolução da resistência pode ser significativamente retardada, quando não há resistência cruzada entre as proteínas expressas na planta transgênica (ZHAO et al., 2005). As principais vantagens de plantas com genes piramidados são a redução no tamanho da área de refúgio a ser implantada para manter a suscetibilidade do inseto-alvo (GOULD, 1998) e a maior durabilidade da suscetibilidade a um gene expressando uma toxina Cry quando combinado a outro, do que quando expresso sozinho na planta (CAPRIO, 1998).

Outra estratégia potencial é a utilização da baixa dose da proteína Bt no manejo integrado de pragas, dando ênfase não só no controle biológico natural como também nos demais métodos de controle biológico, controle clássico ou inoculativo, inundativo e conservativo. Neste caso, devem-se priorizar aqueles que sejam seletivos aos inimigos naturais, predadores e parasitóides. Essa estratégia é necessária quando a proteína não é expressa em dose suficientemente alta, como é o caso dos híbridos de milho expressando a proteína Cry1Ab para o controle de *S. frugiperda*. Nesse caso, a recomendação, pode ser de uma área de refúgio muito maior que aquelas recomendadas para híbridos que expressem a proteína em alta dose para a praga-alvo (MAIA, 2003).

A rotação de culturas pode ser realizada com plantas Bt que expressam diferentes toxinas Cry e plantas convencionais (WU e GUO, 2003), podendo ser da mesma espécie ou de espécies diferentes, ou seja, com espécies hospedeiras ou não hospedeiras da praga-alvo. Este tipo de procedimento pode fazer com que indivíduos resistentes migrem para outra área, com disponibilidade de hospedeiro, para que estes possam se reproduzir. Se o acasalamento ocorrer na área de origem, antes da dispersão, haverá efeito na evolução da resistência, porém, se ocorrer após a dispersão, com indivíduos suscetíveis, o efeito será benéfico (MAIA, 2003). Além disso, a rotação de culturas com plantas convencionais pode aumentar a produção de indivíduos suscetíveis na área, tendo ação também para retardar a evolução da resistência. A rotação no tempo e no espaço de variedades transgênicas Bt tem um valor potencial quando algum custo adaptativo está associado à resistência (BATES et al., 2005). É importante salientar que as toxinas Cry expressas nas plantas a serem rotacionadas não podem apresentar resistência cruzada entre si, já que estudos mostraram que esta prática mantém os genes da resistência instáveis na população (WU e GUO, 2003). Contudo, as pesquisas nesse sentido ainda são escassas e não está definida qual é a contribuição dessa prática sobre a evolução da resistência.

A estratégia de “refuge in the bag” consiste de uma mistura de sementes de plantas Bt e não Bt, antes ou durante a semeadura, que gera uma lavoura constituída de plantas resistentes e suscetíveis distribuídas ao acaso. Esta estratégia, assim como o refúgio, age atrasando a evolução da resistência por manter uma população suscetível para acasalamento espalhada dentro do campo (TABASHNIK, 1994). MALLEY e PORTER (1992) usaram um modelo computacional para mostrar que a mistura de sementes, acelera o desenvolvimento da resistência em comparação com campos onde só havia plantas Bt. Diferentemente, TABASHNIK, (1994) demonstrou que a mistura de sementes é preferível nos campos com somente cultura Bt. Ambos os estudos são coincidentes em que o refúgio estruturado é melhor que a mistura de sementes e, em muitos casos, torna-se melhor quando combinado à mistura de sementes num único programa.

A estratégia de plantas-armadilha utiliza plantas Bt e plantas não Bt, sendo as primeiras utilizadas como uma armadilha e a cultura não Bt é cultivada nas proximidades. As culturas transgênicas são semeadas mais cedo e amadurecem mais cedo que a cultura principal, atraindo os insetos, os quais são mortos pela proteína. Posteriormente, a cultura não Bt amadurece, mas os insetos já foram controlados pela armadilha (ALSTAD e ANDOW, 1995). Simulações computadorizadas com outras espécies de insetos-praga falharam no uso dessa estratégia, assim como ela, também poderia não ser bem sucedida para larvas das espécies como *C. virescens* ou *S. frugiperda* as quais demonstraram evitar plantas transgênicas quando puderam escolher entre plantas Bt e não Bt (FRUTOS et al., 1999).

Um componente crítico no manejo de resistência a qualquer inseto praga é a determinação da herança da resistência, que permite conhecer a base genética associada a um determinado mecanismo de resistência, isto é, se a resistência é dominante ou recessiva, autossômica ou ligada ao sexo, monogênica ou poligênica. Essas informações são essenciais para se distinguir entre resistência cruzada e resistência múltipla (ROUSH e MACKENZIE, 1987). Populações de *O. furnacalis* resistentes a Cry1Ab apresentaram resistência cruzada a Cry1Ac, e da mesma maneira populações resistentes Cry1Ac foram resistentes a Cry1Ab. Entretanto, as mesmas populações apresentaram níveis intermediários de resistência à toxina Cry1F (ZHANG et al., 2014). Mostrando a contribuição de um único gene de resistência de uma proporção da variação genética resultante da ação de um locus modificador, as estimativas de hereditariedade podem dar indicações sobre o papel da variabilidade genética no fenótipo de resistência da população em estudo (FIRKO e HAYES, 1990). A hereditariedade ( $h^2$ ), representa a proporção da variação total fenotípica determinada pela variação genotípica, ou seja, inclui os efeitos da variância por dominância e da variância epistática (FIRKO e HAYES,



1990; FALCONER e MACKAY, 1996). Este método tem sido aplicado para estudar a resistência das toxinas Cry de *B. thuringiensis* em *T. ni*, *P. xylostella*, *C. virescens*, *S. exigua*, *O. nubilalis*, *P. interpunctella*, e *P. gossypiella* (TABASHNIK, 1994; HUANG et al., 1999b; FERRÉ e VAN RIE, 2002; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2009). A herança da resistência às toxinas Cry tem sido caracterizada em diferentes colônias resistentes de laboratório, por cruzamentos entre indivíduos resistentes e suscetíveis em bioensaios com insetos das gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e de cruzamentos de teste. Os resultados destes tipos de experimentos indicam em geral, que a resistência é parcialmente ou totalmente recessiva e autossômica (FERRÉ e VAN RIE, 2002; HECKEL et al., 2007). Portanto, potencialmente pode ser amplamente utilizada nos programas de Manejo da resistência a culturas Bt.

## 1.8 Considerações Finais

Um dos principais desafios na agricultura é o controle de pragas. Atualmente o uso de inseticidas químicos é a primeira opção, podendo ser responsável pela contaminação ambiental, afetando a saúde humana e promovendo o desenvolvimento de populações resistentes de insetos praga. Uma alternativa para minimizar esse risco de contaminação é o uso da bactéria *B. thuringiensis*.

Produtos à base de *B. thuringiensis* têm sido utilizados massivamente há muito tempo (desde a década de 50), mas só nos anos 90 foi relatado o primeiro caso do desenvolvimento de resistência em campo. Entretanto, as condições de manejo e a utilização da tecnologia em plantas Bt, aparentemente, foram realizadas inadequadamente.

O pano de fundo sobre o desenvolvimento de resistência a inseticida ou toxinas Cry, indicam que, se a população de pragas é continuamente exposta a um inseticida ou toxina Cry, esta acabará por permitir que as existências de alguns indivíduos resistentes através das gerações formem mais tarde uma população de indivíduos resistentes.

O risco potencial para a liberação de cultivos Bt no campo é a viabilidade de pragas suscetíveis às proteínas Cry desenvolverem resistência a eles, eliminando não só a possibilidade de continuar a utilizá-las como medidas de controle, mas também predispondo as pragas ao uso de produtos à base de *B. thuringiensis*.

Portanto, sabendo que as pragas suscetíveis a toxinas Cry tem grande potencial para desenvolver resistência a elas, e que as culturas Bt expõem continuamente as populações de pragas à pressão de seleção das proteínas Cry, é possível desenvolvimento de uma série de mecanismos de resistência descritos na ordem Lepidoptera. Assim, o conhecimento de aspectos

relacionados à herança da resistência é uma ferramenta importante para entender a sua evolução e auxiliar na escolha de práticas adequadas no manejo da resistência em campo.

É por isso que antes da implantação de culturas Bt, é necessário realizar uma série de medidas preventivas e estratégicas que possam impedir ou pelo menos atrasar o desenvolvimento da resistência de pragas. Entre as estratégias básicas estão: a utilização de culturas Bt com alta dose das proteínas Cry onde a ingestão mínima de tecido vegetal é suficiente para causar a morte da praga-alvo; a área de refúgio que deve ser utilizada de acordo com o determinado pelos modelos de previsão, o uso de misturas de sementes Bt e não Bt ou convencionais, o uso de controle biológico com os inimigos naturais das pragas, manejo adequado de rotação de culturas, o uso de plantas armadilha e o conhecimento da herança de resistência.

Da mesma forma, deve-se realizar o monitoramento de pragas sujeitas à pressão de seleção de culturas Bt, a fim de detectar qualquer possível surto de resistência em uma região específica.

Apesar de todos os cuidados e demanda de estratégias, é possível afirmar que as culturas Bt proporcionam uma alternativa viável e segura para minimizar o efeito deletério de pragas de insetos nas culturas de interesse agrônomico.

Seu uso reduz a aplicação de inseticidas químicos no campo, cujos efeitos prejudiciais para a saúde humana, os animais domésticos e o ambiente, são amplamente conhecidos, podendo ser uma alternativa para a resolução de muitos problemas agrícolas do mundo.

## 1.9 Referências

ADREADIS, S. S., et al., (2007). **Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economic Entomology 100 (1): 195-201.

AIMANOVA K. G., et al., (2006). **Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines.** Journal of Invertebrate Pathology 92 (3): 178-187.

AKHURST, R. J., et al., (2003). **Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economic Entomology 96 (4): 1290-1299.

ALI, M. I., et al., (2006). **Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein.** Journal of Economic Entomology 99 (1): 164-175.

ALINIA F., et al., (2000). **Effect of plant age, larval age, and fertilizer treatment on resistance of a cry1Ab-transformed aromatic rice to lepidopterous stem borers and foliage feeders.** Journal of Economic Entomology 93 (2): 484-493.

ALVES, A. P., et al., (2006). **Inheritance of resistance to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of Economic Entomology 99 (2): 494-501.

ALSTAD, D. N.; ANDOW, D. A. (1995). **Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants.** Science 268 (5219): 1894-1896.

ANDOW, D. A; ALSTAD, D. N. (1998). **F<sub>2</sub> screen for rare resistance alleles.** Journal of Economic Entomology 95 (1): 14-21

ANDOW, D. A., et al., (2000). **Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of Economic Entomology 93 (1): 26 - 30.

ANDOW, D. A. (2008). **The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops.** Collection of Biosafety Reviews 4 (1):142-199.

ATSUMI, S., et al., (2012). **Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes to Bt toxin Cry1Ab in the silk-worm, *Bombyx mori*.** Proc. Natl. Sci. 109 (1): 1591-1598.

BALLESTER, V., et al., (1999). **Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*).** Applied and Environmental Microbiology 65 (4): 1413-1419.

BATES, S. L., et al., (2005). **Insect resistance management in GM crops: past, present and future.** Nature Biotechnology 23 (1): 57-62.

BAXTER, S. W., et al., (2005). **Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins**

in *Plutella xylostella*. Insect Molecular Biology 14 (3): 327 - 334.

BAXTER, S. W., et al., (2011). **Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera.** Genetics 189 (2): 675–679.

BERNARDI, O., et al., (2011). **Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas.** In: BOREM, A.; DIAS, G. (Ed.). Plantas geneticamente modificada: desafios e oportunidades para regiões tropicais. Suprema Cap, 9: 179-204.

BERNARDI, O., et al., (2015). **Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil.** Crop Protection 76: 7-14

BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. (2004). **Relative fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on conventional and transgenic cotton.** Journal of Economic Entomology 97 (5): 1699 - 1709.

BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. (2005). **Fitness of Cry1A-resistant and susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton with reduced levels of Cry1Ac.** Journal of Economic Entomology 98 (4): 1311 - 1319.

BLANCO, C. A., et al., (2009). ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance frequency in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economic Entomology 102 (1): 381 - 387.

BOLIN P. C., et al., (1998.) **Long-term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of Economic Entomology 92 (5):1021–30

BOURGUET, D., et al., (2003). **Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*.** Theoretical and Applied Genetics 106 (7): 1225 - 1233.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. (2008). **How to cope with insect resistance to Bt toxins?** Trends in Biotechnology 26 (10): 573 - 579.

BRAVO, A., et al., (2011). ***Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 41 (7): 423 - 431.

BURD AD, et al., (2003). **Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), in eastern North Carolina.** Journal of Economic Entomology 96 (1):137–42

CACCIA, S., et al., (2010). **Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species.** PLoS One 5 (4): e9975.

CANDAS, M., et al., (2003). **Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome.** Molecular and Cellular Proteomics 2 (1): 19 - 28.

CAPRIO, M. A. (1998). **Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges.** Journal of Economic Entomology 91 (5):1021–1031.

CARRIERE, Y., et al., (2001). **Large-scale management of insect resistance to transgenic cotton in Arizona: can transgenic insecticidal crops be sustained?** Journal of Economic Entomology 94 (2): 315-325.

CERDA H, et al., (2003). **Laboratory culture conditions affect stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae).** Journal of Applied Entomology 127 (3): 142–45

CHANDRASHEKAR, K.; GUJAR, G. T. (2004). **Development and mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin Cry1Ac in the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner).** Indian Journal of Experimental Biology 42 (2): 164 -173.

CHAUFAUX J, S. M., et al., (2001). **Chronic exposure of the european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin.** Journal of Economic Entomology 94(6): 1564-1570.

CHRISTOU, P., et al., (2006). **Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops.** Trends in Plant Sciences 11 (6): 302 - 308.

CRESPO, A. L., et al., (2009). **On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*.** Pest Management Science 65 (10): 1071 - 1081.

CRESPO, A. L., et al., (2011). **Cross-resistance and mechanism of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia***

*nubilalis*. Journal of Invertebrate Pathology 107 (3): 185 - 192.

DEVINE, G. J., et al., (2007). **Insecticide use: Contexts and ecological consequences.** Agriculture and Human Values. 24 (3): 281-306.

DHURUA, S.; GUJAR, G. T. (2011). **Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India.** Pest Management Science 67 (8): 898 - 903.

DINGHA B. N., et al., 2004. **Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin on the metabolic rate of Cry1C resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** Physiological Entomology 29 (5): 409–18

DOWNES, S., et al., (2009). **Frequency of alleles conferring resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from 2002 to 2006.** Journal of Economic Entomology 102 (2): 733-742.

DOWNES, S., et al., (2010). **Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton.** PLoS One. 5 (9): e12567.

ENGELS, H., et al., (2010). **Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F<sub>2</sub> screen in European populations of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of Economic Entomology 103 (3): 1803 - 1809.

FABRICK, J. A., et al., (2014). **Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India.** Plos One. 9(1): 97900.

FALCONER, D. S; MACKAY, T. F. (1996). **Introduction to quantitative genetics.** 4th ed. Longman. 38-56

FARIAS, J. R., et al., (2014). **Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brasil.** Crop Protection. 64 (1): 150-158.

FENGXIA M, et al., (2004). **Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).** Pest Management Science 60 (2): 167-172.

FERRÉ, J., et al., (1991). **Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor.** Proceedings of the National Academy of Sciences 88 (12): 5119 - 5123.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. (2002). **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Annual Review of Entomology 47 (1): 501 - 533.

FERRÉ, J., et al., (2008). **Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM).** En: **Integration of insectresistant genetically modified crops within IPM programs**, Eds.: ROMEIS, J., SHELTON, A. M., & KENNEDY, G. C. Springer Science + Business Media B.V. 41-85.

FERREIRA, B.S.C. & PANIZZI, A.R. 1978. **Distribuição de ovos e lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner em plantas de soja.** Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 7 (1): 54-59.

FITT, G. P. (1989). **The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems.** Annual Review of Entomology, 34 (1): 17-52.

FIRKO, M. J.; HAYES, J. L. (1990). **Quantitative genetics tools for insecticide resistance risk assessment: estimating the heritability of resistance.** Journal of Economic Entomology 83 (3): 647 - 654.

FORCADA, C., et al., (1999). **Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology 42 (1): 51 - 63.

FRANKLIN, M. T., et al., (2009). **Modified *Bacillus thuringiensis* toxins and a hybrid *B. thuringiensis* strain counter greenhouse-selected resistance in *Trichoplusia ni*.** Applied and Environmental Microbiology. 75 (7): 5739 - 5741.

FRUTOS, R. C. (1999). **Rang and M. Royer: Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins.** Critical Reviews in Biotechnology 19 (3): 227-276

GAHAN, L. J., et al., (2005). **Genetic basis of resistance to Cry1Ac and Cry2Aa in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economic Entomology 98 (4): 1357 - 1368.

GAHAN L. J., et al., (2007a) **A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin.** Journal of Economic Entomology 100 (1): 187-194.

GAHAN L. J., et al., (2007b) **Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*.** Science 293(5531): 857-860.

GAHAN, L. J., et al., (2010.) **An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin.** PLoS Genet 6: e1001248.

GAO, Y., et al., (2009). **Frequency of Bt resistance alleles in *H. armigera* during 2006-2008 in Northern China.** Environmental Entomology 38 (4): 1336 - 1342.

GASSMANN A. J., et al., 2008. **Synergism between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* crops: integrating biological control and resistance management.** Journal of Applied Ecology. 45 (3):957–66

GASSMANN, A. J., et al., (2009). **Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Annual Review of Entomology 54 (1): 147 - 163.

GONZÁLEZ-CABRERA, J., et al., (2003). **Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*).** Insect Biochemistry and Molecular Biology 33 (9): 929 - 935.

GORDON, et al., (1973). **The genus *Bacillus*.** Procyotes Cap 4, 530-562.

GORE J, et al., (2003). **Distribution of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie), injured reproductive structures on genetically engineered *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner cotton.** Journal of Economic Entomology 96 (3): 699-705.

GOULD, F., et al., (1992). **Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*.** Proceedings of the National Academy of Sciences 89 (17): 7986 - 7990.

GOULD F.; ANDERSON A. (1997). **Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 endotoxin on growth, behavior and fitness of susceptible and toxin adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae).** Environmental Entomology 20 (1): 30–38

GOULD, F., et al., (1997). **Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*.** Proceedings of the National Academy of



Sciences 94 (8): 3519 - 3523.

GOULD, F. (1998). **Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology.** Annual Review of Entomology 43 (1): 701 - 726.

GREENPLATE J., et al., (2003). **Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management.** Journal of Applied Entomology 127 (6): 340-347.

GRIFFITTS, J. S.; AROIAN, R. V. (2005). **Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins.** Bioessays 27 (6): 614 - 624.

GROETERS, F. R., et al., (1993). **Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae).** Journal of Economic Entomology 86 (4):1035–39

GROETERS, F. R., et al., (1994). **Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*).** Evolution 48 (1):197–201

GUNNING, R. V., et al., (2005). **New resistance mechanism in *Helicoverpa* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin.** Applied and Environmental Microbiology 71 (5): 2558-2563.

GUTIERREZ, A. P., et al., (2006). **Physiologically based demographics of Bt cotton pest interactions II. Temporal refuges, natural enemy interactions.** Ecological Modeling 191 (3): 360-382.

HE, D. J., et al., (2001). **Using F<sub>2</sub> genetic method of isofemale lines to detect the frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin from transgenic Bt cotton in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae).** Cotton Science 13 (1): 105 - 108.

HECKEL, D. G., et al., (2007). **The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera.** Journal of Invertebrate Pathology 95 (3): 192 - 197.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P., et al., (2009). **Broad-spectrum cross resistance Broad-spectrum cross-resistance in *Spodoptera exigua* from selection with a marginally toxic Cry protein.** Pest Management Science 65 (6): 645 - 650.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P., et al., (2010). **Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*.** PLoS One. 5 (9): e12795

HERRERO, S., et al., (2001). **Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth.** Applied and Environmental Microbiology 67 (3): 1085 - 1089.

HERRERO, S., et al., (2005). ***Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes.** BMC. Genomics 6: 96.

HIGGINSON D. M., et al., (2005). **Evolutionary trade-offs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: fitness cost affecting paternity.** International Journal of Organic Evolution 59 (4): 915-920.

HOSSAIN F., et al., (2004). **Genetically modified cotton and farmers' health in China.** International journal of occupational 10 (3): 296-303

HUANG, F., et al., (1999a). **Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer.** Science 284(5416): 965 - 967.

HUANG, F., et al., (1999b). **Heritability and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera; Pyralidae).** Bulletin of Entomological Research 89 (5): 449 - 454.

HUANG, F., et al., (2002). **Survival of Kansas dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt and non-Bt corn hybrids.** Journal of Economic Entomology 95 (3): 614-621.

HUANG, J., et al., (2005). **Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China.** Science 308(5722): 688-690.

HUANG, F., et al., (2007). **Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize.** Journal of Economic Entomology 100(1): 164-171.

HUANG, F. N., et al., (2008). **Allele frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab corn in Louisiana populations of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of Economic Entomology 101 (2): 492-498.

HUANG, F. N., et al., (2011). **Success of the high dose/refuge resistance management**

**strategy after 15 years of Bt crop use in North America.** Entomologia Experimentalis et Applicata 140 (1): 1-16.

HUANG, F. N., et al., (2012). **Extended monitoring of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab maize in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** GM Crops Food. 3(1): 245-254.

IBRAHIM, M. A., et al., (2010). ***Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective.** Bioengineered Bugs 1 (1): 31 - 50.

IBRAHIM, J. M., et al., (2016). **Advances of transgenic Bt-crops in insect pest management: An overview.** Journal of Entomology and Zoology Studies. 4(3): 48-52.

IMAI, K.; MORI, Y. (1999). **Levels, inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* formulation in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Thailand.** Applied Entomology and Zoology 34 (1): 23–29

JACKSON, R. E., et al., (2006). **Genetic variation for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina.** Journal of Economic Entomology 99 (5): 1790-1797.

JACKSON, R. E., et al., (2007). **Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein vip3A.** Journal of Economic Entomology 100 (1): 180-186.

JANMAAT, A. F; MYERS, J. (2003). **Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270 (1539): 2263 - 2270.

JIN, L., et al., (2013). **Dominant resistance to Bt cotton and minor cross-resistance to Bt toxin Cry2Ab in cotton bollworm from China.** Evol. Appl. 6(1): 1222-1235.

JOHNSON D. E.; McGAUGHEY W. H. (1996). **Natural mortality among Indianmeal moth larvae with resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Journal of Invertebrate Pathology 68 (2):170–72

JOHNSON M. T., et al., 1997. **Effects of natural enemies on relative fitness of *Heliothis virescens* genotypes adapted and not adapted to resistant host plants.** Entomologia experimentalis et applicata. 82 (2):219–30

JURAT-FUENTES, J. L., et al., (2003). **Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance.** Applied and Environmental Microbiology. 69 (10): 5898 - 5906.

JURAT-FUENTES, J. L., et al., (2011). **Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*.** PLoS One. 6: e17606.

KHAJURIA, C., et al., (2011). **Identification of a Novel Aminopeptidase P-Like Gene (OnAPP) Possibly Involved in Bt Toxicity and Resistance in a Major Corn Pest (*Ostrinia nubilalis*).** PLoS One. 6: e23983.

KHETAN, S. (2001). **Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*.** En: Khetan editor. Microbial Pest Control: 14.

KRANTHI, K. R., et al., (2006). **Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*.** Crop Protection 25 (1): 119 - 124.

KRUGER, M., et al., (2011). **Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa.** Environmental Entomology 40 (2): 477 - 483.

LEE, M. K., et al., (1995). **Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration.** Applied and Environmental Microbiology 61 (11): 3836 - 3842.

LEMESLE, V.; et al., (2010). **Role of spatial and temporal refuges in the evolution of pest resistance to toxic crops.** Acta Biotheoretica. 58 (2): 89-102.

LI, J., et al., (1996). **Structure of the mosquitocidal deltaendotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation** Journal of Molecular Biology 257 (1): 129 - 152.

LI, H., et al., (2004). **Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis* resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Insect biochemistry and insect molecular biology 34 (8): 753 - 762.

LI, G., et al., (2007). **Increasing tolerance to Cry1Ac cotton from cotton bollworm was**

confirmed in Bt cotton farming area of China. Ecological Entomology 32 (4): 366-375.

LIANG G. M., et al., (2007). **Diapause, cold hardiness and flight ability of Cry1Ac resistant and -susceptible strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).** European Journal of Entomology's 104 (1): 699–704

LIANG, G. M., et al., (2008). **Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin.** Journal of Invertebrate Pathology 97 (2): 142–149.

LIU, Y. B., et al., (1996). **Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae).** Journal of Economic Entomology 89 (4): 798–804.

LIU, Y.; TABASHNIK, B. E. (1997). **Inheritance of Resistance to the *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1C in the Diamondback Moth.** Applied and Environmental Microbiology 63 (6): 2218 - 2223.

LIU, F., et al., (2010). **Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China.** Pest Management Science 66 (2): 155 - 161.

LU, M. G., et al., (2004). **Selection and heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and transgenic cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).** Pest Management Science 60 (9): 887-893.

MA, G., et al., (2005). **Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae?** Insect Biochemistry and Molecular Biology 35 (7): 729 - 739.

MACRAE TC. et al., (2005) **Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera** Journal of Economic Entomology 98 (1): 577-587.

MAHON, R. J., et al., (2007). **Frequency of alleles conferring resistance to the Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economic Entomology 100 (6): 1844 - 1853.

MALLET, J.; PORTER, J. (1992). **Preventing insect adaptation to insect-resistant crops:**

are seed mixtures or refugia the best strategy? Biological Sciences 250 (1): 165-169.

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C., et al., (1999). **Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*.** Biocontrol Science and Technology 9 (1): 239 - 246.

MATTEN S. R., et al., (2008). **How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs, in Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs,** (Eds) ROMEIS J., SHELTON A.M., & KENNEDY G.G. Springer: 27-39.

McGAUGHEY, W. H. (1985). **Insect Resistance to the Biological Insecticide *Bacillus thuringiensis*.** Science 229 (4709): 193 - 195.

MCGAUGHEY W. H., BEEMAN, R. W. (1988). **Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae).** Journal of Economic Entomology 81 (1): 28–33

MEISSLE, M., et al. (2010): **Pest, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects.** Journal of Applied Entomology, 134 (5): 357–375.

MOAR, W. J., et al., (1995). **Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).** Applied and Environmental Microbiology 61 (6): 2086–2092.

MOAR, W., et al., (2008). **Field-evolved resistance to Bt toxins.** Nature Biotechnology 26 (1): 1072 - 1074.

MONNERAT, R., et al., (2015). **Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins.** Plos One. 10(4): 119544.

MÜLER-COHN, J., et al., (1996). ***Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to CryIC and crossresistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins.** Journal of Economic Entomology 89 (1): 791-797.

NAIR, R., et al., (2013). **Variation in the cadherin gene sequence of Cry1Ac susceptible and resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and the identification of mutant alleles in resistant strains.** Current Science. 104(2): 215-223.

OMOTO, C., et al., (2016). **Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil.** Pest Management Science. 72(9):1727-1736.

OPPERT, B., et al., (1997). **Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins.** Journal of Biological Chemistry 272 (38): 23473 - 23476.

OPPERT et al., (2000). **Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*.** Entomologia experimentalis et applicata 96 (3): 281-287.

PARDO-LÓPEZ, L., et al., (2012). ***Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection.** Microbiology Ecology 37 (1): 3-22.

PEREZ, C. J., et al., (1996). **Effects of application technology and *Bacillus thuringiensis* subspecies on management of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*-resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae).** Journal of Economic Entomology 88 (1):1113–19

RAHMAN, M. M., et al., (2004). **Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*.** Proceedings of the National Academy of Sciences 101 (9): 1696 - 1699.

RAMACHANDRAN, S., et al., (1998a) **Movement and survival of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae in mixtures of nontransgenic and transgenic canola containing a cryIA (c) gene of *Bacillus thuringiensis*.** Environmental Entomology 27 (3): 649-656.

RAMACHANDRAN, S., et al., (1998b). **Survival, development, and oviposition of resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin.** Journal of Economic Entomology 91(6): 1239-1244.

RAYMOND, B., et al., (2005). **Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 272 (1571): 1519–24

RAYMOND, B., et al., 2006. **The compatibility of a nucleopolyhedrosis virus control with**

resistance management for *Bacillus thuringiensis*: co-infection and cross-resistance studies with the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Journal of Invertebrate Pathology 93 (2):114–20

RAYMOND, B., et al., (2007). **Exploiting pathogens and their impact on fitness costs to manage the evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis***. Journal of Applied Ecology 44 (4): 768–80

ROUSH, R. T.; MACKENZIE, J. A. (1987). **Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance**. Annual Review of Entomology. 32 (1): 361-380.

ROUSH, R. T. (1994). **Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays?** Biocontrol Science and Technology 4 (1): 501 - 516.

SANAHUJA, G., et al., (2011). ***Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications**. Plant Biotechnology Journal 9 (1): 283 - 300.

SAYYED, A. H., et al., (2000). **Mode of inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki in a diamondback moth (*Plutella xylostella*) population from Malaysia**. Pest Management Science 56 (9): 743–48

SAYYED, A. H., et al., (2001). **Susceptibility of a field-derived, *Bacillus thuringiensis*-resistant strain of diamondback moth to in vitro-activated Cry1Ac toxin**. Applied and Environmental Microbiology 67 (9): 4372 - 4373.

SAYYED, A. H.; WRIGHT, D.J. (2001). **Fitness costs and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella***. Ecological Entomology 26 (1): 502-508.

SAYYED A. H., et al., (2003). **Inheritance of resistance to Bt canola in a field-derived population of *Plutella xylostella***. Pest Management Science 59 (11): 1197-1202.

SAYYED A. H., et al., (2004). **Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella***. Applied and Environmental Microbiology 70 (12): 7010–7017

SAYYED, A. H., et al., (2005). **Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac**. Applied and Environmental Microbiology 71 (11): 6863 - 6869.



SAYYED, A. H., et al., (2008). **Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth.** Pest Management Science 64 (8): 813 - 819.

SHIRAI Y., et al., (1998). **Low intrinsic rate of natural increase in Bt-resistant population of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae).** Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology 42 (2): 59–64

SIEGFRIED, B. D; HELLMICH, R. L. (2012). **Understanding successful resistance management: the European corn borer and Bt corn in the United States.** GM Crops Food. 3 (3): 184 - 93.

SIQUEIRA, H. A., et al., (2006). **Analyses of Cry1Ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae).** Appl. Environ. Microbiol. 72 (8): 5318 - 5324.

SISTERSON, M. S., et al., (2005). **Evolution of resistance to transgenic crops: interactions between insect movement and field distribution.** Journal of Economic Entomology 98(6): 1751-1762.

SOBERÓN, M., et al., (2007). **Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance.** Science 318 (5856): 1640 - 1642.

SOBERÓN, M., et al., (2009). **Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?** Cellular and Molecular Life Sciences 66 (8): 1337-1349.

SOSA-GÓMEZ, D. R; J. E. MIRANDA. (2012). **Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae)** Revista Brasileira de Entomologia 56(3): 359-362.

STEWART, C. N., et al., (1996). **Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene.** Plant Physiology 112 (1): 115-120.

STEWART, S., et al., (2001). **Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae.** Journal of Economic Entomology 94 (3): 752-760.

STONE, T. B., et al., (1989). **Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.** Journal of Invertebrate Pathology 53 (2):228–34

STORER, N. P., et al., (2010). **Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico.** Journal of Economic Entomology 103 (4): 1031 - 1038.

TABASHNIK, B. E., et al., (1990). **Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae).** Journal of Economic Entomology 83 (5): 1671 - 1676.

TABASHNIK, B. E. (1994). **Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Annual Review of Entomology, 39 (1): 47 - 79.

TABASHNIK, B. E., et al., (1997). **Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*.** Proceedings of the National Academy of Sciences 94 (24): 12780 - 12785.

TABASHNIK, B. E., et al., (1998). **Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse?** Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 353 (1376): 1751 - 1756.

TABASHNIK B, et al., (2002) **Control of Resistant Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by Transgenic Cotton That Produces *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab.** Applied and Environmental Microbiology 68 (7714): 3790-3794.

TABASHNIK, B. E., et al., (2005). **Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm.** Proceedings of the National Academy of Sciences 102 (43): 15389-15393.

TABASHNIK, B. E., et al., (2008). **Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory.** Nature Biotechnology 26 (2): 199 - 202.

TABASHNIK, B. E., et al., (2009). **Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data.** Journal of Economic Entomology 102 (6): 2011 - 2025.

TABASHNIK, B. E., et al. (2010). **Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect**

releases. Nature Biotechnology 28 (12): 1304–1307

TABASHNIK, B. E., et al., (2011). **Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance.** Nature Biotechnology 29 (12): 1128-1131.

TABASHNIK, B, E., et al., (2013). **Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres.** Nat. Biotechnol. 31(1): 510-521.

TABASHNIK, B, E., et al., (2014). **Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides.** Journal Economic Entomology. 107(1): 496-507.

TAMEZ-GUERRA P., et al., (2006). **Differences in susceptibility and physiological fitness of Mexican field *Trichoplusia ni* strains exposed to *Bacillus thuringiensis*.** Journal of Economic Entomology 99 (3): 937–945

TANG, J. D., et al., (1997). **Inheritance, stability, and lack of fitness costs of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida.** Journal of Economic Entomology 90 (3):732-741.

VAECK, M., et al., (1987). **Transgenic plants protected from insect attack.** Nature 328: 33 - 37.

VAN RENSBURG, J. B. J. (2007). **First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller), to Bt-transgenic maize.** South African Journal of Plant and Soil. 24 (3):147-151.

VILARINHO, E. C. (2007). **Marcação de *Diatraea saccharalis* (fabr) (Lepidoptera: Crambidae) e dispersão de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista.

WANG, P., et al., (2007). **Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*.** Applied and Environmental Microbiology 73 (4): 1199 - 1207.

WANG, P., et al., (2012). **Increased frequency of Pink bollworm resistance to Bt toxin cry1Ac in China.** Plos One. 7(1) 29975.

WAQUIL, J. M., et al., (2002). **Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** Revista Brasileira de Milho e Sorgo. 1 (3): 1-11

WIRTH, M. C., et al., (1997). **CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in mosquito, *Culex quinquefasciatus*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94 (20): 10536–10540

WU, K., et al., (2002). **Evaluation of the natural refuge function for *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) within *Bacillus thuringiensis* transgenic cotton growing areas in north China.** Journal of Economic Entomology 95(4): 832-837.

WU, K.; GUO, Y. (2003). **Influences of *Bacillus thuringiensis* Berliner cotton planting on population dynamics of the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover, in Northern China.** Environmental Entomology. 32 (2): 312-318.

WU, K., et al., (2005). **Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China.** Pest Management Science 61(5): 491-498.

WU, K., et al., (2006). **Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt insecticidal protein during 2001-2004 in China.** Journal of Economic Entomology 99(3): 893-898.

WU, X., et al., (2009). **Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae).** Journal of Invertebrate Pathology 102 (1): 44 - 49.

XIAO, Y., et al., (2014). **Mis-splicing of ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*.** Sci. Rep. 4: 6184.

XU, X; WU, Y. (2008). **Disruption of Ha-BtR alters binding of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac to midgut BBMVs of *Helicoverpa armigera*.** Journal of Invertebrate Pathology 97 (1): 27 - 32.

YANG, Y., et al., (2010). **Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and - resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 40 (8): 592 - 603.

YANG, Y., et al., (2011). **Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*.** PLoS One 6 (10): e25783

YU, S. J. (2008). **The toxicology and biochemistry of insecticides.** CRC Press, 2 edition 115-142

ZHANG, S., et al., (2009). **Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 39 (7): 421 - 429.

ZHANG, H., et al., (2011). **Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China.** Plos One. 6 (1): 22874.

ZHANG, H., et al., (2014). **Inheritance Patterns, Dominance and Cross-resistance of Cry1Ab- and Cry1Ac- selected *Ostrinia furnacalis* (Guenée).** Toxins. 6(1): 2694-2707.

ZHAO, J. Z., et al., (2000). **Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C.** Applied Environmental Microbiology. 66 (9): 3784-3789.

ZHAO, J. Z., et al., (2005). **Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants.** Proceedings of the National Academy of Sciences 102 (24): 8426-8430.

ZHAO, X. C, et al., 2008. **Altered mating behaviour in a Cry1Ac-resistant strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Applied Entomology 132 (5): 360–365

ZHAO, Z., et al., (2016). **Identification of ABCC2 as binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay.** Microbiology Open. 1-11.

**CAPÍTULO II\*****HERANÇA DA RESISTÊNCIA, RESISTÊNCIA CRUZADA DE *Anticarsia gemmatalis*  
Hübner (LEPIDOPTERA: EREBIDAE) RESISTENTE À TOXINA Cry1Ac**

\*Capítulo formatado para a revista **Journal of Economic Entomology**

## RESUMO

A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* é considerada uma das principais pragas da cultura da soja, seu controle é realizado através do uso de produtos químicos e biológicos, assim como com a utilização da planta da soja que expressa a toxina Cry1Ac. No entanto, a disponibilidade de grandes áreas com soja Bt e a reduzida adoção de refúgio é um cenário favorável para a seleção de populações resistentes de *A. gemmatalis* a esta cultura. Frente a este cenário e visando contribuir com informações que auxiliem para o programa de Manejo de Resistência de Insetos mais efetivo, no presente trabalho foi avaliado o impacto da variedade de soja Bt (BR283 Bt RR) que expressa a toxina Cry1Ac sobre uma raça resistente de *A. gemmatalis* a Cry1Ac, foram determinados aspectos relacionados a herança da resistência, tais como, recessividade ou dominância dos alelos de resistência; foi verificada se a resistência se deve a um ou vários genes e constatou-se a possibilidade de ocorrer resistência cruzada com as toxinas Cry1F e Cry1Ab. Durante o estudos do impacto da soja Bt, a raça resistente não apresentou mortalidade e apenas mortalidade parcial com uma média de 96,49 % de mortalidade no raça suscetível quando foi diluído 25 vezes o tecido da soja Bt (BR283BTRR). Avaliaram-se lagartas neonatas, do 3º e 5º instar da raça resistente e suscetível, alimentados com folíolos de soja, coletados no estadio vegetativo V5. A mortalidade foi registrada diariamente e os dados submetidos à análise de sobrevivência. Todos os ínstars mostraram mortalidade total quando alimentadas com soja Bt. No entanto, o tempo de sobrevivência (TS) média das lagartas neonatas suscetíveis foi de 1,05 dias, e nas avaliações da neonatas resistentes foi de 1,73 dias. As lagartas suscetíveis 3º instar mostrou uma TS média de 1,23 dias e as lagartas resistentes ao mesmo estágio foi de 2,57 dias. Quando as larvas estavam no quinto instar TS média foi de 1,56 dias para o raça suscetível e 3,26 dias para a raça resistente. Raças com razão de resistência de 81 vezes e com 111,15 vezes pode ser controlada pela soja Bt durante a fase vegetativa. Resultados dos cruzamentos recíprocos entre as raças resistentes e suscetíveis à Cry1Ac revelaram que a resistência era de caráter autossômica e incompletamente recessiva. Posteriormente foram conduzidos retrocruzamentos da F<sub>1</sub> (♀R♂S e ♀S♂R) com o parental resistente para determinar o número de genes envolvidos na resistência, mediante o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) das respostas das progênies dos retro cruzamentos ou F<sub>2</sub> (♀RR♂RS, ♀RR♂SR, ♀SR♂RR e ♀RS♂RR), observou-se que a resistência é determinada por um gene principal. Resultados dos experimentos de resistência cruzada às toxinas Cry1F e Cry1Ab com um raça de *Anticarsia gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac, mostraram resistência cruzada com a toxina Cry1Ab mas uma ausência com relação à Cry1F.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatalis*, soja Bt, Cry1Ac, herança, resistência cruzada.

## ABSTRACT

The Caterpillar of soybean *Anticarsia gemmatalis* is considered one of the main pests of soybean, its control is accomplished through the use of chemical and biological products, as well as the use of soybean plant the gene Cry1Ac toxin. However, the availability of large areas with Bt soy and low adoption of refuge is a favorable scenario for the selection of resistant pest population outbreaks to this culture. Faced with this scenario and to contribute with information to help to Insect Resistance Management program more effective, the present study evaluated the impact of the variety of Bt soybean (BR283 Bt RR) expressing Cry1Ac toxin over a tough race *A. gemmatalis* to Cry1Ac. Besides also were certain aspects of the inheritance of resistance, such as recessiveness or dominance of resistance alleles; It was recorded if the resistance is due to one or several genes and found out the possibility of cross resistance with Cry1F and Cry1Ab toxin. During the studies the impact of Bt soybean, RR did not show mortality breed and only partial mortality with a mean of 96.49% mortality in SS race when diluted 25 times the tissue Bt soybean (BR283BTRR). They evaluated neonate caterpillars, 3rd and 5th instar of resistant and susceptible race, fed soybean leaflets collected in the vegetative stage V5. Mortality was recorded daily and the data submitted to analysis of survival. All instars showed total mortality when fed with Bt soybeans. However, the survival time (TS) neonate susceptible caterpillars average was 1.05 days and evaluations of resistant neonate was 1.73 days. Susceptible caterpillars 3rd instar showed a TS average of 1.23 days and resistant caterpillars at the same stage was 2.57 days. When the larvae were in the fifth instar TS average was 1.56 days to 3.26 days and susceptible race for the tough race. 81 races with times of resistance ratio and 111.15 times can be controlled by Bt soybean during the vegetative stage. Results of reciprocal crosses between the RR and SS to Cry1Ac races showed that the resistance was autosomal incompletely recessive character. Subsequently they were conducted F1 backcross ( $\text{♀R}\text{♂S}$  and  $\text{♀S}\text{♂R}$ ) with the resistant parent to determine the number of genes involved in resistance by analysis of the chi-square test ( $\chi^2$ ) the responses of the progenies of retro crossings or F2 ( $\text{♀RR}\text{♂RS}$ ,  $\text{♀RR}\text{♂SR}$ ,  $\text{♀SR}\text{♂RR}$  and  $\text{♀RS}\text{♂RR}$ ), it was observed that the resistance is determined by a single major gene. Results of cross-resistance experiments to Cry1F and Cry1Ab toxins with a race *Anticarsia gemmatalis* resistant to Cry1Ac toxin showed cross-resistance to the Cry1Ab toxin but a lack regarding the Cry1F.

**Keywords:** *Anticarsia gemmatalis*, Bt soy, Cry1Ac, inheritance of resistance, cross-resistance.



## 2.1 Introdução

No Brasil, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebididae) este inseto é uma das pragas de maior prevalência na cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill, Fabaceae) (Sosa-Gómez, 2004; Conte et al. 2015). No entanto, Silva *et al.*, (2004) relataram que *A. gemmatalis* apresenta elevada suscetibilidade a diversas toxinas de *Bacillus thuringiensis*, sendo, portanto, um dos alvos da soja Bt. No entanto, a disponibilidade de grandes áreas com soja Bt é um cenário favorável para a seleção de populações resistentes de *Anticarsia gemmatalis* a esta cultura. Pelo anterior, a utilização da estratégia de expressão de altas doses de proteína nas plantas, se combinada com o plantio e a manutenção de zonas de refúgio, pode postergar o surgimento da resistência (Roush e Shelton, 1997).

O conhecimento da herança da resistência a toxinas Cry1Ac é essencial para o desenvolvimento de estratégias a fim de atrasar ou prevenir a sua ocorrência no campo. (Roush e Daly 1990, Tabashnik 1991, McKenzie 2000). Essas informações podem auxiliar no monitoramento da resistência, na avaliação do controle das plantas transgênicas e nos estudos de resistência cruzada (Roush e McKenzie 1987, Roush e Daly 1990, Tabashnik 1991).

Para a avaliação da expressão da proteína inseticida em alta dose, a Agência de Proteção Ambiental Americana (US-EPA) indica cinco métodos distintos, os quais são: realizar bioensaios com diluições do tecido da planta Bt em dieta artificial e com planta convencional como tratamento controle, avaliar cultivares com expressão da proteína inseticida em nível 25 vezes menor do que no evento comercial, avaliar um grande número de cultivares comerciais a campo para determinar a sobrevivência larval (1 em 10.000) derivada da oviposição natural após a exposição à proteína inseticida, avaliar um grande número de cultivares comerciais à campo para determinar a sobrevivência derivada (1 em 10.000) da infestação artificial após a exposição à proteína inseticida e, por último, realizar bioensaios com larvas de instar avançado com uma tolerância à proteína inseticida 25 vezes maior daquela de larvas neonatas (Caprio et al., 2000).

Quando consideramos a bactéria *B. thuringiensis* no controle de insetos, pode ocorrer interações complexas devido à presença de diversas toxinas, McGaughey e Johnson (1987) observaram a ocorrência de resistência cruzada a diferentes toxinas em algumas espécies de insetos. A resistência cruzada, ocorre em populações de insetos resistentes, e que também apresenta resistência a outros inseticidas aos quais nunca tinham sido expostos. Exemplos destes últimos aparecem nas raças resistentes de *Plutella xylostella* (Sayyed et al, 2000; Tabashnik et al, 1994; Tabashnik et al, 1997), em *Chloridea virescens* (Gould et al., 1995) e

*Spodoptera exigua* (Hernandez-Martinez et al, 2009; Moar et al., 1995). Atualmente não há referências sobre estudos de resistência cruzada em *A. gemmatalis* resistentes a toxina Cry1Ac.

No presente trabalho, foi determinada a resposta de populações resistentes de *A. gemmatalis* a diluições de 25 vezes dos tecidos de soja Bt, para verificar a sobrevivência nas condições teóricas que seriam de alta dose para uma raça suscetível. Se realizaram estudos de herança da resistência de *A. gemmatalis* à toxina Cry1Ac, e resistência cruzada com as toxinas Cry1F e Cry1Ab.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Raças de *A. gemmatalis*

As populações de *A. gemmatalis* utilizadas nos estudos de resistência eram provenientes da criação da Embrapa Soja. A população resistente foi obtida a partir de uma população suscetível coletada na cultura de soja na região de Sertãozinho, PR, na safra de 1995/1996. A raça resistente (RR) à toxina Cry1Ac foi obtida através da pressão de seleção, em condições de laboratório, a seleção foi realizada por meio de pressão de seleção exercida com inoculações da bactéria HD-73, que produz exclusivamente a toxina Cry1Ac. Paralelamente as alterações de suscetibilidades foram verificadas através de bioensaios com a proteína Cry1Ac liofilizada com 96% de pureza obtida da Dra. Marianne P. Carey (Case Western Reserve University School of Medicine Department of Biochemistry, Cleveland, OH). As mortalidades causadas durante o processo de seleção variaram entre 70 e 90% e a seleção foi aplicada sobre nove gerações, de forma alternada. Ambas as populações foram mantidas em dieta de Greene *et al.* (1976) a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , 75% de UR, 14h de fotofase e 10 h de escotofase. A população SS encontrava-se na 38ª geração de laboratório sem pressão de seleção, e a população RR encontrava-se na 30ª geração de laboratório com pressão de seleção.

### 2.2.2 Bioensaios com tecidos de soja Bt sobre populações de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis

Para avaliar a resposta de duas cultivares desenvolvidas por Embrapa com parceria com a Fundação Meridional e liberada no mercado no 2009. As variedades avaliadas foram a soja não Bt (BR283RR) e soja Bt (BR283BTRR), com as populações selecionadas e não selecionadas, realizando semeadura em casa de vegetação em vasos com capacidade de cinco

litros na densidade de quatro plantas por vaso. Foram coletados trifólios das plantas no estágio vegetativo (V5), foram obtidos o peso fresco dos trifólios, os quais foram secados em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 50° C por 48 horas, depois de secas os folíolos foram moídos para incorporação na dieta. A quantidade de matéria seca de cada cultivar foi calculada de maneira que resultasse em uma diluição de 25 vezes (em relação ao peso fresco) quando incorporado (mg tecido/mL de dieta) em volume total a 128 mL de dieta. Foi incorporado um total de 0,9216 mg de tecido seco em 128 mL de dieta artificial, quando a dieta encontrava-se a 55°C. A dieta ainda líquida foi vertida em caixa de poliestireno (11x 11x 3,5 cm) com capacidade de 250 ml (Gerbox®). Após a gelificação e esfriamento da dieta, foi cortada e colocada em bandejas de 32 células com capacidade para 25 mL cada célula (Advento do Brasil, Diadema, SP, [www.adventodobrasil.com.br](http://www.adventodobrasil.com.br)), com auxílio de um pincel fino foi inoculada uma lagarta neonata (0-24h de idade) de *A. gemmatalis* em cada célula, As bandejas foram fechadas com tampas plásticas e acondicionadas em câmara climatizada (27± 1°C, umidade relativa 60 ± 10% e fotofase de 14 e escotofase de 10 h). Foram realizadas duas repetições por tratamento (96 lagartas/repetição), totalizando 128 lagartas neonatas por tratamento, sendo eles testemunha (sem tecido), controle (BR283RR) e soja Bt (BR283BTRR), com duas repetições. Aos sete dias após a infestação avaliou-se a mortalidade das lagartas sobreviventes.

### 2.2.3 Bioensaios sobre folhas de soja Bt

Em casa de vegetação foi realizada a semeadura das cultivares da soja BR283RR e BR283BTRR em vasos com capacidade de cinco litros na densidade de quatro plantas por vaso. Foram coletados trifólios das plantas no estágio vegetativo (V5), e fornecidos as lagartas neonatas, as lagartas em início de terceiro instar e lagartas em início de quinto instar. Para manter os folíolos túrgidos, seus pecíolos foram envolvidos com algodão umedecido. Os ensaios foram realizados com quatro lagartas por caixa tipo Gerbox®, sendo acondicionadas em câmara climatizada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições/tratamento, sendo cada repetição constituída por 24 lagartas, totalizando 120 lagartas por instar testadas para cada cultivar da soja, com duas repetições. A mortalidade foi contabilizada e registrada diariamente até a mortalidade total das lagartas.

#### 2.2.4 Bioensaios de herança da resistência à Cry1Ac

O método de bioensaio adotado foi a incorporação da toxina Cry1Ac na dieta. Lagartas neonatas (até 24 horas de idade), foram inoculadas com sete concentrações da toxina, e um grupo não inoculado foi considerado como testemunha. As concentrações da proteína Cry1Ac foram incorporadas à dieta por meio de um agitador do tipo Vortex e mantida em banho-maria na temperatura de  $53 \pm 1^\circ\text{C}$ . Para a população resistente (RR) se utilizaram as seguintes concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ ): 0,00; 93,80; 187,50; 375,00; 750,00; 1500,00; 3000,00 e 6000. Para a população suscetível (SS) se utilizaram as seguintes concentrações 0,00; 0,23; 0,42; 0,76; 1,37; 2,47; 4,44 e 8,00. Aproximadamente 1 ml de dieta contendo as diferentes concentrações da proteína foi colocada em cada célula das bandejas de bioensaio com 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), com auxílio de uma pipeta de repetição. Após a gelificação da dieta, uma lagarta neonata de 0-24 horas de idade foi transferida em cada célula. As placas foram fechadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO- CV-16, CD International Inc., Pitman, NJ) que permitiam as trocas gasosas com o ambiente externo e mantidas em câmara climatizada a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 14:10 (L:D) h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para cada concentração, totalizando 128 lagartas neonatas por tratamento, incluindo uma testemunha (sem Cry1Ac). Aos sete dias após a infestação avaliou-se a mortalidade das lagartas.

#### 2.2.5 Bioensaios da genética da resistência

Inicialmente foi realizada a caracterização da resistência de *A. gemmatalis* à Cry1Ac através da obtenção da curva de concentração-resposta a partir de sete concentrações da proteína liofilizada que proporcionassem mortalidades entre  $>5\%$  e  $<99\%$  para as raças SS e RR. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para as estimativas das concentrações letais ( $CL_{50}$ ) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) por meio do programa estatístico POLO-Plus (LeOra Software 2002). A razão de resistência foi determinada através da divisão da  $CL_{50}$  da raça RR pela  $CL_{50}$  da raça SS.

Para o estudo da herança da resistência, pupas das raças SS e RR foram sexadas e mantidas separadamente em caixas de poliestireno cristal (Gerbox®), 11 x 11 x 3,5 cm) com capacidade de 250 ml. À medida que os adultos foram emergindo, cruzamentos recíprocos entre 15 casais (RR fêmea x SS macho e SS fêmea x RR macho), foram realizados em gaiolas de acrílico (40 x 40 x 40 cm), para acasalamento. As progênies dos cruzamentos recíprocos  $F_1$  (RS e SR) foram submetidas a bioensaios para a caracterização das curvas de concentração-resposta

para Cry1Ac e estimativa das CL<sub>50</sub>s. A possibilidade da resistência estar ligada ao sexo ou sob efeito maternal foi verificada através da análise dos resultados obtidos nos cruzamentos recíprocos.

Os níveis de dominância da resistência foram estimados através da comparação das CL<sub>50</sub>s das progênes F<sub>1</sub> em relação às CL<sub>50</sub>s das raças parentais, a partir da seguinte fórmula apresentada por Stone (1968):

$$D = ( (2X_3 - X_2 - X_1) / (X_2 - X_1) )$$

em que,

D= grau médio de dominância,

X<sub>1</sub> = log<sub>10</sub> (CL<sub>50</sub>) da raça S,

X<sub>2</sub> = log<sub>10</sub> (CL<sub>50</sub>) da raça R e,

X<sub>3</sub> = log<sub>10</sub> (CL<sub>50</sub>) da raça híbrida F<sub>1</sub> (Stone, 1968).

Para estimar o número de genes envolvidos na resistência, foram realizados retrocruzamentos da progênie F<sub>1</sub> com o parental apresentando o fenótipo mais diferente da F<sub>1</sub> (Tsukamoto 1983, Roush e Daly 1990). Para garantir o acasalamento entre a progênie F<sub>1</sub> com o parental mais distante foram separados fêmeas e machos resultando quatro progênes ou F<sub>2</sub>. A possibilidade de herança monogênica foi testada pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) pelo método de Cochran-Mantel-Haenszel entre os dados de mortalidade observada e esperada do retrocruzamento de F<sub>1</sub> com um dos parentais.

#### 2.2.6 Bioensaios da resistência cruzada às toxinas Cry1F e Cry1Ab

Foram usadas duas toxinas para o estudo de resistência cruzada, as toxinas Cry1F e Cry1Ab liofilizadas com 96% de pureza obtidas da Dra. Marianne P. Carey (Case Western Reserve University School of Medicine Department of Biochemistry, Cleveland, OH). O material foi mantido em freezer à temperatura de -20°C.

Os ensaios de verificação de resistência cruzada foram realizados com as proteínas Cry1F e Cry1Ab aplicados sobre a superfície da dieta, indivíduos não tratados com as toxinas foram considerados como testemunha, na qual só se acrescentou com água destilada. As proteínas Cry1F e Cry1Ab foram diluídos em água destilada e aplicados sobre a superfície da dieta. Embora ensaios de incorporação da toxina na dieta apresentam maior precisão, devido ao custo e pouca disponibilidade das toxinas, a inoculação foi realizada por distribuição na superfície da dieta. Aproximadamente 1 ml de dieta foi colocada em cada célula das bandejas

de bioensaio (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), com auxílio de uma pipeta de 100 mL. Após a gelificação da dieta foram aplicadas as concentrações das proteínas Cry1F e Cry1Ab sobre sua superfície, as concentrações utilizadas foram 0; 0,46; 4,6 e 4,6 ng/cm<sup>2</sup>, após secar a suspensão na dieta, foi colocada uma lagarta neonata de 0-24 horas de idade em cada célula. As placas foram fechadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO- CV-16, CD International Inc., Pitman, NJ) que permitiram as trocas gasosas com o ambiente externo e mantidas em câmara climatizada a 26±2°C e fotoperíodo de 14:10 (L:D) h.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete repetições para cada concentração, representadas por um grupo de 16 lagartas, sendo testadas no mínimo 112 lagartas por concentração. A atividade das proteínas (Cry1F e Cry1Ab) foram verificadas mediante a avaliação da mortalidade após de 7 dias da inoculação

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Verificação de alta dose nas populações resistentes e suscetíveis

O tecido das folhas da soja Bt (BR283BtRR) diluído 25 vezes e incorporada na dieta não provocou mortalidade da raça de *A. gemmatalis* resistente (RR) com as razões de resistência de 81,57 e 111,15 vezes, entretanto ocasionou mortalidade parcial entre 95,31% e 97,66% na raça suscetível (SS), em contraste com a soja convencional (BR283RR) a qual não causou mortalidade em ambas raças (Tabela 4).

**Tabela 4.** Bioensaios alta dose (diluição de 25 vezes do tecido na dieta artificial)

	Tratamento	Raça	Concentração (g folha /128ml dieta)	n*	% Mortalidade (Após 7 dias)	Peso em g (Após 7 dias)
Bioensaio 1	Testemunha	RR	0	128	0	2,1740 n.s
	BR283RR	RR	0,9216	128	0	2,2357 n.s
	BR283BTRR	RR	0,9216	128	0	2,1507 n.s
	Testemunha	SS	0	128	0	2,3357 n.s
	BR283RR	SS	0,9216	128	0	2,2956 n.s
	BR283BTRR	SS	0,9216	128	95,31 ±4,42	0,1177 **
Bioensaio 2	Testemunha	RR	0	128	0	2,2813 n.s
	BR283RR	RR	0,9216	128	0	2,2667 n.s
	BR283BTRR	RR	0,9216	128	0	2,2430 n.s
	Testemunha	SS	0	128	0	2,2947 n.s
	BR283RR	SS	0,9216	128	0	2,2717 n.s
	BR283BTRR	SS	0,9216	128	97,66 ±4,65	0,1054 **

\* Número de lagartas. RR: Resistente à Cry1Ac. SS: Suscetível à Cry1Ac.  
n.s: Não significativa, \*\*: Diferença significativa (Kruskal-Wallis  $p > 0,05$  %).

### 2.3.2 Avaliação da suscetibilidade das populações resistentes e suscetíveis a soja Bt

As lagartas dos três ínstares das raças SS e RR foram sensíveis a proteína Cry1Ac expressa nas folhas de soja Bt (BR283BtRR). Em todos os casos as lagartas não conseguiram sobreviver após quatro dias da alimentação em tecidos Bt (Tabela 5).

**Tabela 5.** Tempo de sobrevivência das lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com soja Bt (BR283BtRR).

Raça	Bioensaio 1 <sup>1</sup>			Bioensaio 2 <sup>2</sup>		
	N <sup>5</sup>	TS <sup>6</sup> (dias)	Holm-Sidak (p >0.05%) <sup>7</sup>	N <sup>5</sup>	TS <sup>6</sup> (dias)	Holm-Sidak (p >0.05%) <sup>7</sup>
Neonata SS <sup>3</sup>	120	1,03 ±0,18	a	150	1,06 ±0,24	a
Neonata RR <sup>4</sup>	120	1,68 ±0,50	b	150	1,78 ±0,60	b
3º instar SS	240	1,15 ±0,37	a	150	1,30 ±0,42	a
3º instar RR	240	2,85 ±1,65	b	150	2,29 ±1,18	b
5º instar SS	120	1,67 ±0,51	a	150	1,44 ±0,76	a
5º instar RR	120	3,02 ±2,01	b	150	3,49 ±1,19	b

<sup>1</sup>Razão de resistência no bioensaio 1: 81,57 <sup>2</sup> Razão de resistência no bioensaio 2: 111,15 <sup>3</sup>SS:

Suscetível à Cry1Ac <sup>4</sup>RR: Resistente à Cry1Ac. <sup>5</sup> Número de lagartas. <sup>6</sup>TS: Tempo de sobrevivência.

<sup>7</sup>Comparações dentro do mesmo instar.

### 2.3.3 Avaliação da herança da resistência a Cry1Ac

As CL<sub>50</sub>s de toxina estimadas com os dados obtidos nas raças SS e RR de *A. gemmatalis* foram de 1,35 e 109,88 µg/ml de dieta artificial, no bioensaio realizado na geração 30º (com nove fases de pressão de seleção) a razão de resistência foi de 82 vezes. No segundo bioensaio as CL<sub>50</sub>s estimadas da raça SS foi de 1,43 µg/ml, e na raça RR o valor foi de 158,39 µg/ml da toxina Cry1Ac, com uma razão de resistência de 111 vezes (Tabela 6).



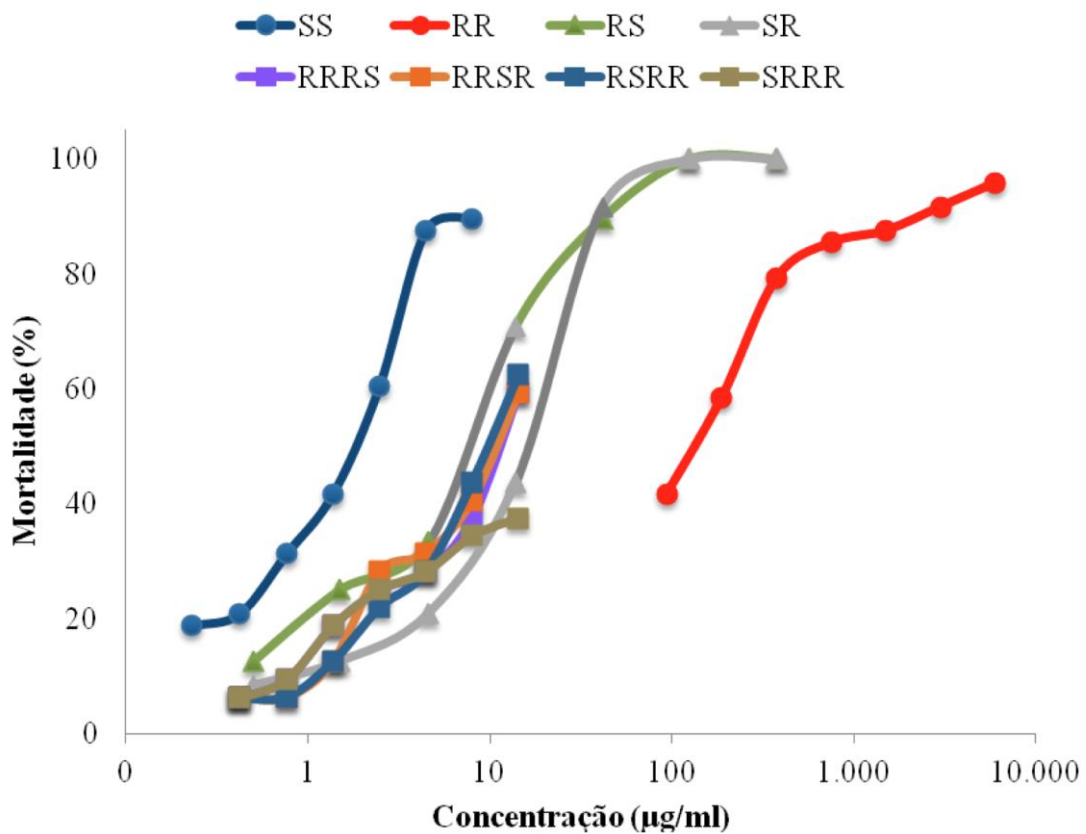
**Tabela 6.** Respostas das CL<sub>50</sub>s das raças SS, RR e F<sub>1</sub> resultantes de cruzamentos recíprocos entre as raças de *A. gemmatalis* SS e RR à toxina Cry1Ac

	Raça	N*	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	CL <sub>99</sub> (µg/ml)	Coefficiente angular (±EP)	χ <sup>2</sup>
<b>Bioensaio 1</b>	SS	384	1,35	83,37	1,536 ±0,162	6,86 n.s
	RR	384	109,88	29.196,00	1,067 ±0,151	3,08 n.s
	F <sub>1</sub> RS	384	5,30	441,63	1,392 ±0,139	6,83 n.s
	F <sub>1</sub> SR	384	9,53	430,86	1,569 ±0,139	20,43 n.s
<b>Bioensaio 2</b>	SS	384	1,43	74,06	1,605 ±0,165	6,03 n.s
	RR	384	158,39	65.668,00	1,029 ±0,142	1,45 n.s
	F <sub>1</sub> RS	384	5,23	437,21	1,391 ±0,130	5,38 n.s
	F <sub>1</sub> SR	384	10,24	454,19	1,581 ±0,140	18,23 n.s

<sup>1</sup> Razão de resistência: 81,57 <sup>2</sup> Razão de resistência: 111.15. \* Número de lagartas. SS: Suscetível RR: Resistente. RS: (R fêmea x S macho) SR: (S fêmea x R macho). n.s: Não significativa,  $\chi^2_{tab(7df;0.05)} = 14,07$

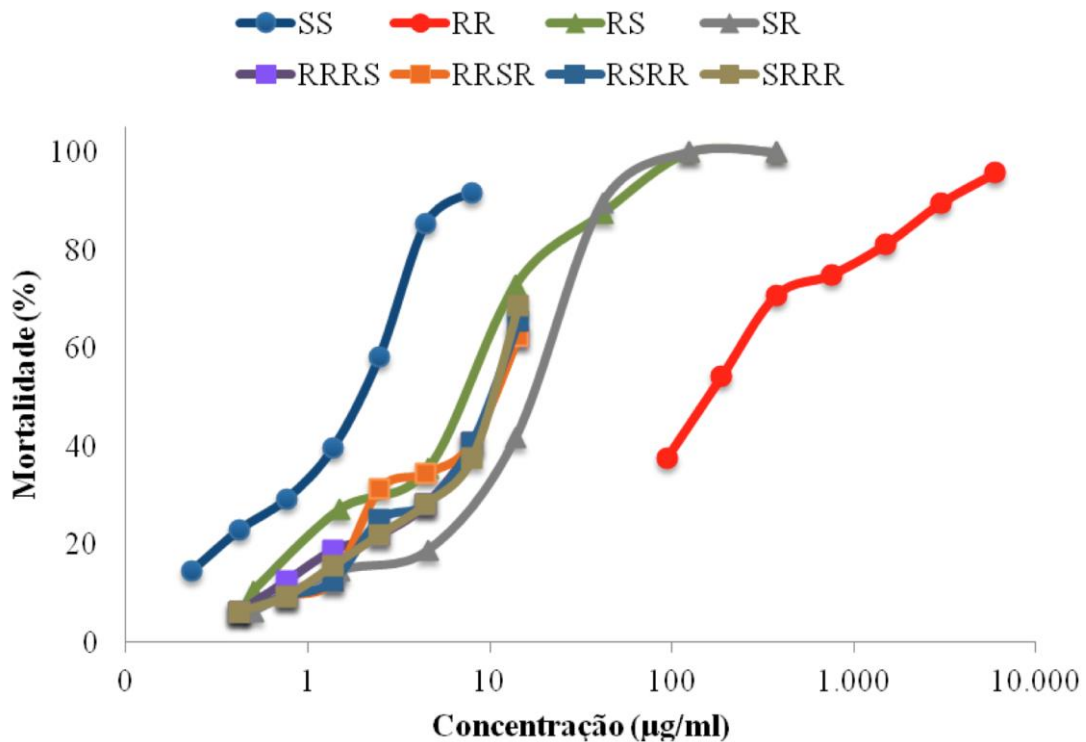
Não foram observadas diferenças nas respostas a Cry1Ac para as progênies F<sub>1</sub> obtidas a partir dos cruzamentos recíprocos entre as raças suscetível (SS) e resistente (RR) (Tabela 6). Foi verificada uma sobreposição dos intervalos de confiança das CL<sub>50</sub>s e, também, a igualdade dos coeficientes angulares estimados para as progênies F<sub>1</sub> recíprocas, através da análise de Probit.

Os níveis de dominância (D) obtidos foram de -0,93 para o híbrido RS (R = fêmea resistente x S = macho suscetível) e -0.85 para o híbrido SR (S = fêmea e R = macho) para o primeiro bioensaio (Figura 2).



**Figura 2.** Curvas de concentração-resposta à Cry1Ac (valores observados) para as raças de *A. gemmatalis* suscetível (SS), resistente (RR), progênies de F<sub>1</sub> (♀R♂S e ♀S♂R) e retrocruzamento (♀RR♂RS, ♀RR♂SR, ♀RS♂RR e ♀SR♂RR) do primeiro bioensaio onde a razão de resistência foi de 81,57 vezes.

No segundo bioensaio, os graus de dominância (D) obtidos foram de -0,95 para o híbrido RS (R fêmea e S macho) e -0,89 para o híbrido SR (S fêmea e R macho) (Figura 3).



**Figura 3.** Curvas de concentração-resposta à Cry1Ac (valores observados) para as raças de *A. gemmatalis* suscetível (SS), resistente (RR), progênie de F<sub>1</sub> (♀R♂S e ♀S♂R) e retrocruzamento (♀RR♂RS, ♀RR♂SR, ♀RS♂RR e ♀SR♂RR) do segundo bioensaio onde a razão de resistência foi de 111,15 vezes.

A dominância efetiva calculada para os dois bioensaios avaliados demonstrou que a herança foi incompletamente recessiva, por ser  $-1 < D < 0$  (Bourguet *et al.*, 2000). A suscetibilidade à Cry1Ac das progênie F<sub>1</sub> recíprocas foi mais próxima à raça suscetível (SS).

A hipótese de herança monogênica para a resistência de *A. gemmatalis* à Cry1Ac foi confirmada mediante a análise das proporções de segregação dos retrocruzamentos das raças da progênie F<sub>1</sub> com o parental resistente (RR) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) entre as mortalidades observadas e esperadas dos retrocruzamentos ou F<sub>2</sub> para o modelo monogênico.

Raça F <sub>2</sub>	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mort. obs.	Mort. esp.	$(\chi^2) *$	Mort. obs.	Mort. esp.	$(\chi^2) *$
RRRS (RR fêmea x RS macho)	0,42	2	1,95	0,71	2	1,99	0,75
	0,76	3	3,26	0,96	4	3,35	0,90
	1,37	6	5,09	0,88	6	5,26	0,81
	2,47	8	7,49	0,81	7	7,77	0,95
	4,44	9	10,40	0,94	9	10,80	0,86
	8,00	12	13,71	0,91	13	14,22	0,94
	14,40	19	17,17	0,90	20	17,76	0,88
RRSR (RR fêmea x SR macho)	0,42	2	1,50	0,73	2	1,76	0,82
	0,76	2	2,74	0,83	3	3,14	0,77
	1,37	4	4,63	0,87	4	5,17	0,87
	2,47	9	7,24	0,87	10	7,90	0,82
	4,44	10	10,50	0,87	11	11,23	0,94
	8,00	13	14,26	0,99	13	14,99	0,90
	14,40	19	18,16	0,94	20	18,84	0,97
RSRR (RS fêmea x RR macho)	0,42	2	1,22	0,69	2	1,46	0,76
	0,76	2	2,39	0,96	3	2,73	0,81
	1,37	4	4,25	0,86	4	4,66	0,88
	2,47	7	6,94	0,80	8	7,36	0,92
	4,44	9	10,38	0,88	9	10,74	0,89
	8,00	14	14,40	0,64	13	14,62	0,90
	14,40	20	18,58	0,74	21	18,62	0,90
SRRR (SR fêmea x RR macho)	0,42	2	1,73	0,83	2	1,47	0,78
	0,76	3	3,06	0,77	3	2,74	0,82
	1,37	6	5,02	0,88	5	4,68	0,97
	2,47	8	7,65	0,54	7	7,38	0,94
	4,44	9	10,88	0,99	9	10,75	0,89
	8,00	11	14,54	0,95	12	14,62	0,80
	14,40	22	18,33	0,97	22	18,61	0,78

Bioensaio 1 com razão de resistência de 81,57 vezes e no bioensaio 2: 111,15 vezes. Mort. obs: Mortalidade observada. Mort. esp: Mortalidade esperada. \*Não significativa,  $\chi^2_{tab(7df;0.05)} = 14,07$

As mortalidades observadas nos retrocruzamentos (F<sub>2</sub>) não foram significativamente diferentes das mortalidades esperadas para os bioensaios 1 e 2, o que sugere que a resistência é determinada por um gene principal.

#### 2.3.4 Avaliação da resistência às toxinas Cry1F e Cry1Ab com a raça resistente de *A. gemmatalis* à Cry1Ac

Foi observada ausência de resistência cruzada da raça de *A. gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac com a toxina Cry1F, todas as lagartas das duas populações (SS e RR),

apresentaram mortalidade de 100 % após a exposição à toxina Cry1F.

No entanto, foi observada resistência cruzada da raça RR à toxina Cry1Ac com a toxina Cry1Ab, na concentração 4,6 ng/cm<sup>2</sup> nas quais apresentaram mortalidades entre 43,75 e 53,13 % e nas concentrações 0,46 e 4,6 ng/cm<sup>2</sup> apresentaram mortalidades entre 10 e 12,50% (Tabela 8).

**Tabela 8.** Mortalidade de *A. gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac após a alimentação com dieta tratada com à toxina Cry1Ab.

Raça	Concentração (ng/cm <sup>2</sup> )	Bioensaio 1		Bioensaio 2	
		n*	% Mortalidade	n*	% Mortalidade
RR	0	32	0	80	0
RR	46,6	32	100	80	100
RR	4,6	32	53,13	80	43,75
RR	0,46	32	12,50	80	10
SS	0	32	0	80	0
SS	46,6	32	100	80	100
SS	4,6	32	100	80	100
SS	0,46	32	100	80	100

Razão de resistência no bioensaio 1: 81,57 e no bioensaio 2: 111,15

\* Número de lagartas. RR: Resistente à Cry1Ac. SS: Suscetível à Cry1Ac.

## 2.4 Discussão

### 2.4.1 Impacto da soja Bt sobre raças de *A. gemmatalis*

A resposta das populações resistentes e suscetíveis alimentadas com soja Bt foi avaliada por meio de bioensaios realizados alimentando os indivíduos com trifólios da soja Bt (BR283BTRR) e convencional (BR283RR) para as raças suscetíveis (SS) e resistentes (RR) a Cry1Ac de *A. gemmatalis*.

O conceito de alta dose proposto por Caprio et al., (2000) foi testado na população resistente (taxa de resistência 81,57 vezes no bioensaio 1 de 111,15 vezes no bioensaio 2) utilizando tecido de soja BR283BTRR diluído 25 vezes na dieta artificial. Esta concentração de toxina não foi suficiente para causar mortalidade nas lagartas após uma semana. Embora ambas as raças SS e RR de *A. gemmatalis* tenham sobrevivido nos bioensaios com tecido da soja Bt diluído 25 vezes, esse estudo apresentou diferenças no tempo de sobrevivência quando foram alimentadas com soja Bt, indicando que a raça resistente tinha uma maior oportunidade de sobreviver, no caso que o inseto obteve a possibilidade de movimentação para uma planta não Bt, no entanto, nosso estudo apenas forneceu soja Bt no período de 10 dias, onde a população

resistente mostrou sobreviver em média de três dias e algumas das lagartas sobreviventes após o tempo da avaliação, conseguiram chegar a pupa quando se forneceu a soja não Bt. O que concorda com vários autores que observaram que as lagartas com possibilidade de movimentação aos hospedeiros alternativos, as plantas não Bt tem uma maior oportunidade de sobrevivência (Herzog e Todd, 1981; Slansky 1989; Panizzi et al. 2004). Adicionalmente, a raça suscetível também apresentou mortalidade parcial na raça SS, indicando que uma resposta marginal considerando o conceito de alta dose para o controle de *A. gemmatalis*, já que a expressão da toxina Cry1Ac na planta deveria controlar 100% da raça suscetível da lagarta-da-soja como observado no estudo de Bernardi (2012) com a soja MON 877701 x MON 89788. No entanto, o resultado deste trabalho foi semelhante com Bernardi (2012) e MacRae et al., (2005) com a espécie *Chrysodexis includens* com a soja MON 877701 x MON 89788 e com o tecido liofilizado da soja tic107 com na toxina Cry1Ac. O que é possível, que com a exposição do cultivar Bt pode fazer pressão de seleção obtendo um risco de evoluir resistência na soja BR283BTRR. Nesse cenário, quando não é atingida a alta dose, é necessário o aumento do tamanho e abundância das áreas de refúgio (Tabashnik et al 2004; Bernardi, 2012). Para retardar o processo de seleção de fenótipos resistentes é recomendado pelo menos 20% de área de refúgio (soja não Bt) estruturado, localizado próximo (800 m) da área cultivada (CTNBIO, 2010). O princípio do uso de refúgio é que qualquer inseto resistente sobrevivente em soja Bt tem maiores chances de acasalar com adultos suscetíveis, presentes nos refúgios do que com outro adulto resistente.

Por outro lado, o bioensaio de alimentação direta dos tecidos foliares com a espécie resistente indica, que os níveis de expressão foram suficientes para controlar a raça com taxas de resistência 81,57 vezes no bioensaio 1, de 111,15 vezes no bioensaio 2. A pressão de seleção exercida durante nove ciclos de seleção é um indicador da rápida seleção de taxas de resistência elevadas em pouco tempo, principalmente considerando as condições climáticas adequadas e a presença de hospedeiros para evolução de ciclos de vida contínuos no cenário agrícola brasileiro, especialmente nas condições atuais de exposição das populações a grandes áreas de soja expressando Cry1Ac. Tendo como resultado semelhante, com o cultivar de soja tic107 expressando a toxina Cry1A e controlando as espécies de *A. gemmatalis*, *C. includens* e *Helicoverpa Zea* (MacRae et al., 2005; Miklos et al., 2007; McPherson e MacRae, 2009; Bernardi 2012). Nosso resultado com trifólios é similar com o estudo de Homrich et al., (2008) com o cultivar da soja Bt 1AS5 (expressando a toxina Cry1Ac) ocasionando uma mortalidade completa de *A. gemmatalis*. No entanto, foram determinadas diferenças nos tempos de sobrevivência das raças SS e RR à Cry1Ac de *A. gemmatalis* nos três ínstares avaliados.

#### 2.4.2 Herança da resistência à Cry1Ac

Foi observada uma sobreposição dos intervalos de confiança das  $CL_{50}$ s e uma ausência de diferenças nas respostas a Cry1Ac para as progêneses  $F_1$  obtidas dos cruzamentos, isso permitiu concluir que a resistência de *A. gemmatalis* a Cry1Ac é autossômica (Uyenayama, 1986; Roush e Daly, 1990; Diez-Rodríguez e Omoto, 2001). Essa resposta foi semelhante ao observado em *Ostrinia nubilalis* com Cry1Ab (Crespo *et al.*, 2009), *Pectinophora gossypiella* resistente à Cry1Ac (Tabashnik *et al.*, 2000), *Ostrinia furnacalis* (Zhang *et al.*, 2014), onde a resistência não apresentou influência materna.

A dominância efetiva calculada para os dois bioensaios avaliados demonstrou que a herança foi incompletamente recessiva, semelhante aos resultados obtidos com populações resistentes de *O. nubilalis* à Cry1Ab (Crespo *et al.*, 2009), *P. gossypiella* resistente a Cry1Ac (Tabashnik *et al.*, 2000), *Helicoverpa armigera* resistente às toxinas Cry1Ac (Kranthi *et al.*, 2006) e Cry2Ab (Mahon *et al.*, 2007), parcial *Trichoplusia ni* resistente à Cry1Ac (Kain *et al.*, 2004), *H. armigera* resistente à Cry1Ac (Liang *et al.*, 2008), as quais apresentaram uma resistência incompletamente recessiva. Embora na maior parte dos casos a resistência é recessiva é possível encontrar situações em que é dominante como em algumas populações de *H. armigera* (Wu *et al.*, 2009).

A herança da resistência de *A. gemmatalis* resistente à Cry1Ac foi monogênica, deferindo do resultado do estudo de *O. nubilalis* resistente à Cry1Ab, neste caso a herança foi poligênica com cinco locis envolvidos (Crespo *et al.*, 2009). Outros casos de resistência monogênica tem sido determinados em populações de *T. ni* resistente à Cry1Ac e *O. furnacalis* resistente à Cry1Ab (Kain *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014), o que indicaria que a resistência determinada por um gene principal, parece ser um fenômeno frequente.

#### 2.4.3 Resistência cruzada às toxinas Cry1F e Cry1Ab

Foi observada ausência de resistência cruzada à toxina Cry1F, na raça de *A. gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac. Resultados semelhantes foram observados com *Trichoplusia ni* quando a raça resistente à Cry1Ab foi inoculada com as toxinas Cry1Aa e Cry1Ac (Estada e Ferre, 1994). Entretanto, as interações envolvendo resistência cruzada são muito variáveis, dependendo das espécies e das toxinas consideradas. Assim, não foi observada resistência cruzada às toxinas Cry1Aa e Cry1Ac em *Plutella xylostella* resistente a Cry1Ab

(Ballester *et al.*, 1994) e uma raça resistente de *Spodoptera frugiperda* à Cry2A-P quando tratada com às toxinas Cry1 e Cry2Ab2 (Bernardi *et al.*, 2015).

Mas, por outro lado, neste trabalho foi encontrada resistência cruzada na raça de *A. gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac quando foi tratada com a toxina Cry1Ab, o anterior por uma similitude no modo de ação das toxinas, da mesma maneira, na literatura também foram relatados casos da mesma interação em raças de *Plodia interpunctella* e *P. xylostella* com relação às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac e Cry1Ad, *S. frugiperda* na raça resistente à Cry2A-P com às toxinas Cry1F, Cry1Ab e Cry1Ac.105, e com *Chloridea virescens* com às toxinas Cry1Ac e Cry2Aa (McGaughey and Beeman, 1988; Tabashnik *et al.*, 1990; McGaughey e Johnson, 1992; Bernardi *et al.*, 2015, Jurat-Fuentes *et al.*, 2003).

## 2.5 Conclusão

Lagartas neonatas de *A. gemmatalis* que apresentam taxas de resistência próximas de 100 vezes têm condições de sobreviver por períodos de 1,73 dias em soja Bt BR283BTRR que expressa à toxina Cry1Ac, de maneira semelhante, lagartas de quinto instar sobrevivem em média até 3,26 dias em soja Bt. A herança da resistência de *A. gemmatalis* à Cry1Ac é monogênica, incompletamente recessiva e não ligada ao sexo. A raça de *A. gemmatalis* resistente à Cry1Ac apresentou resistência cruzada à toxina Cry1Ab, entretanto, quando inoculada com Cry1F a população foi suscetível. Portanto, o uso de Cry1F é apropriado para o desenvolvimento de cultivares que expressam esta toxina para o controle da lagarta-da-soja.



## 2.6 Referências

- Ballester, V., B. Escriche, J. L., Mensua, G.W. Rithmacher; J. Ferre., 1994. Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to Cry1A(b). *Biocontrol Sci. And Technol.* 4(1): 437-443.
- Bernardi, D., E. Salmeron, R. J. Horikoshi, O. Bernardi, P. M. Dourado, R. A. Carvalho, S. Martinelli, G. P. Head; C. Omoto. 2015. Cross-Resistance between Cry Proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. *PloS One.* 10(10): e140130.
- Bernardi, O. 2012. Avaliação do conceito de anta dose e eficácia da soja MON 87701 x MON 89788 contra *A. gemmatalis* e *P. includens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. In: A validação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 8701 x MON 89788 no Brasil. Tese doutorado ESALQ/USP. Pp 41-71.
- Bourguet, D., A. Genissel; M. Raymond. 2000. Insecticide Resistance and Dominance Levels. *Journal Economical Entomology*, 93(6):1588-1595.
- Braga, D.P.V., W.S. Oliveira, S. Martinelli, D.R. Sosa-Gómez; M. F. Oliveira. 2011. Estudo de Caso de Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: Borém, A; G. Almeida (Ed). *Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais.* Suprema, cap. 17, pp: 347-390.
- Caprio, M. A., D. V. Summerford; S. R. Sims., 2000. Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. In: Lacey, L. A., H. K., Kaya (Ed.). *Field manual of techniques in invertebrate pathology.* Dordrecht: Kluwer Academic, Cap 8, pp 805-828.
- Conte, O., F. Teixeira de Oliveira, N. Harder, B. S. Corrêa-Ferreira e S. Roggia, 2015. Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2014/15 no Paraná. Documentos 361. Emater Embrapa, 60 p.
- Crespo A.L.B., T.A. Spencer, A. p. Alves, R. L. Hellmich, E. E. Blankenship, L. C. Mahalhães; B. D. Siegfried. 2009. On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Pest Manag Sci*, 65(1): 1071-1081.
- Cruz, N. A. 2014. Desenvolvimento Biológico e Alterações Morfofisiológicas no Intestino Médio da Lagarta da Soja *Anticarsia gemmatalis* Resistentes ao Baculovírus AgMNPV Alimentadas com Genótipos de Soja. Tese Doutorado Universidade Estadual de Londrina. p 15.
- CTNBIO. Comissão Técnica nacional de Biossegurança. 2010. Liberação comercial de soja geneticamente modificada resistente a insetos e tolerante a herbicida, soja MON87701 x MON 89788. In: Parecer Técnico nº 2542/2010.
- Diez-Rodríguez G.I; C. Omoto. 2001. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.

Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. *Neotropical Entomology* 30(2): 311-316.

Estada U; J. Ferre., 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1): 3840-3846.

Gould F. 1994. Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. *Biocontrol Science and Technology*, 4(4): 451-461.

Gould, F; B. E. Tabashnik, 1998. Bt-cotton resistance management. In Risseler, J (Ed.) *Now or Never: Serious new plans to save natural pest control*. Cambridge: Union of Concerned Scientists of USA.

Gould, F., 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: ingraining pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, Stanford, V. 43, P 701-726.

Gould, F., A., Anderson, R. Reynolds, L. Bumgarner, W. Moar. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal Economic Entomology*, 88(1): 1545–1559.

Hernandez-Martinez P., J. Ferre; B. Eseriche. 2009. Broad-spectrum cross-resistance in *Spodoptera exigua* from selection with a marginally toxic Cry protein. *Pest Manag. Sci.* 65: 645-650.

Herzog, D. C; J. W. Todd. 1980. Sampling velvetbean caterpillar on soybean, pp. 107-140. In M. Kogan; D. C. Herzog [eds.], *Sampling methods in soybean entomology*. Springer, New York.

Hoffmann-Campo C.B., F. Moscardi, B. Corrêa-Ferreira, D.R. Sosa-Gómez, A.R. Panizzi, I.C. Corso, D.L. Gazzoni, e E.B. de Oliveira. 2000. *Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado*. Embrapa Soja. Circular Técnica, 30.

Homrich M.S., L.M. Pereira, J. F. Pereira, P.F. Bertagnolli, G. Pasquali, M.A. Zaidi, I. Altosaar; M. H. Bodanese-Zanettini. 2008. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hbner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified CryAc encotoxin. *Genetics and Molecular Biology*, 31 (2): 522-531.

Jurat-Fuentes, J.L., F. L. Gould; M. J. Adang. 2003. Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac; Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (10): 5898-5906.

Kain W. C., J. Z. Zhao, A.F. Janmaat, J. Myers, A.M. Shelton; P. Wang. 2004. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in a greenhouse-derived strain of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Economic Entomologic*, 97(6):2073-2078.

- Kranthi, K.R., C.S. Dhawad, S.R. Naidu, K. Mate, G.T. Behere, R.M. Wadaskar; S. Kranthi. 2006. Inheritance of resistance in indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Crop Prot.* 25(1), 119–124.
- Leppla, N. C. (1976). Circadian rhythms of locomtion; reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. *Annals of the Entomological Society of America*, 69 (1): 45-48.
- Liang, G.-M., K.-M. Wu, H.-K. Yu, K.-K. Li, X. Feng, Y.Y. Guo. 2008. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. *Journal Invertebrate Pathology*, 97(1): 142–149.
- Liu, Y. B; B. E. Tabashnik. 1997. Experimental evidence that refuges deay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, London. 264 (1381):605-610.
- MacRae, T. C., M. E. Baur, D. J. Boethel, B.J. Fitzpatrick, A.G. Gao, J.C. Gamundi, L.A. Harrisson, V.T. Kabuye, R.M. Mcpherson, J.A. Miklos, M.S. Paradise, A. S. Toedebusch, e A. Viegas. 2005. Laboratory and field evaluation of trangenic soybean exhibiting high dose expression. Of synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for controlo of Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology*. 98 (2):577-587.
- Mahon, R.J., K.M. Olsen, K.A. Garsia; S.R. Young. 2007. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Journal Economic Entomology*, 100(1), 894–902.
- McGaughey W. H; D. E. Johnson., 1987. Toxicity of diferente serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and susceptible Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal Economic Entomology*. 80(1): 112-1126.
- McGaughey W. H; R.W. Beeman. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pylidae). *Journal of Economic Entomology*. 81(1): 28-33.
- Mcpherson, R. M; T.C. Macrae. 2009. Evaluation of transgenic soybean exhibiting gigh expression. Of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A trangene for suppressing lepidopteran populations densities and crop injury. *Journal of Economic Entomology*. 102(4): 1640-1648.
- Miklos, J. A., M.F. Alibhai, S.A. Bleding, D.C. Connor-Ward, A. Gao, B.A. Holmes, K.H. Kolacz, V.T. Kabuye, T.C. Macrae, M.S. Paradise, A.S. Toedebusc; L.A. Harison. 2007. Characterization of soybean exhibitng high expression. Of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A transgene that conferes a high dregree of resistance to lepidopteran pest. *Crop Science*. 47(1): 148-157.
- Moar, W. J. M. Pusztai-Carey, H. Van Faassen, D. Bosch, R. Frutos, C. Rang, K. Luo; M.J. Adang., 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C Resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Eviron. Microbiol.* 61 (1): 2086-2092.

Panizzi, A.R. L. J. Oliveira; J. Silva. Survivorship, larval development and pupal weight of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on potential leguminous host plants. *Neotropical Entomology*, 33 (5): 563-567.

Rahman, M. M., H. Rashid, A. A. Shahid, K. Bashir, T. Husnain, S. Raizuddin., 2007. Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Electronic Biotechnology*, 10 (2): 241-251.

Roush, R. T; E. A. M. Shelton., 1997. Assessing the odds: The emergence of resistance to Bt transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 15(9): 816-817.

Roush, R.T; J.C. Daly. 1990. The role of population genetics in resistance research and management, pp 97- 152. In R.T. Roush & B.E. Tabashnik (eds.), *Pesticide resistance in arthropods*. New York, Chapman and Hall, p. 303

Sayyed, A. H., R. Haward, S. Herrero, J. Ferre; D.J. Wright., 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1509-1516.

Shelton, A. M., J. D. Tang, R. T. Roush, T. D. Metz; E. D. Earle., 2000. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nature Biotechnology*, 18(3): 339-342.

S. M. B. da Silva., J. O. Silva-Werneck, R. Falcão, A. C. Gomes, R. R. Fragoso, M. T. Quezado, O. B. O. Neto, J. B. Aguiar, M.F.G. de Sa, A. Bravo; R. G. Monnerat, 2004. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. *J. Appl. Ent.* 128, 102–107

Slansky 1989. Early season weedy legumes: potential larval food plants for the migratory velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 819--824.

Sosa-Gómez, D. R. (2004). Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Genetics and Molecular Biology* 27 (3): 378-384.

Stone B.F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull World Health Organ*, 38(2): 325-326.

Tabashnik, B. E., A. L. Patin, T. J. Dennehy, Y. B. Liu, Y. Carrière, M. A. Sims; L. Antilla. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(1): 12980-12984.

Tabashnik, B. E., F. Gould; Y. Carrière. 2004. Velaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. *Journal of Evolutionary Biology.* 17(2):904-912.

Tabashnik, B. E., N. Finson, M. W. Jonhson; D. G. Heckel., 1994. Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the Diamondback Moth (*Plutella xylostela*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1): 4627-4629.

**Tabashnik, B. E., Y. B. Liu, T. Malvar, D.G. Heckel, L. Masson, V. Ballester, F. Granero, J.L. Mensua; J. Ferre., 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Sci. 94(1): 12780-12785.**

**Tabashnik, B. E., N.L Cushing, N. Finson; M.W. Jonhson. 1990. Field development fo resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Journal of Economic Entomology. 82(1): 1671-1676.**

**Tang, J. D., H. L. Collins, T.D. Metz, E. D. Earle, J.Z. Zhao; R.T. Roush., 2001. Greenghous tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. Journal of Economic Entomology, 94(1): 240-247.**

**Tsukamoto, M. 1983. Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In Georghiou, G.P. & T. Saito (eds.), Pest resistance to pesticides, p. 809.**

**Uyenoyama, M.K. 1986. Pleiotropy and the evolution of genetic systems conferring resistance to pesticides, pp 207-221. In: National Research Council. Pesticide resistance: strategies and tactics for management. Washington, National Academy Press, p. 471**

**Vilarinho, E.C., Fernandes, O.A., Hunt, T.E. Caixeta D.F. 2011.Movement of *Spodoptera frugiperda* Adults (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize in Brazil. Florida Entomologist 94(3):480-488.**

**Wu, Y., J.M. Vassal, M. Royer, I. Pieretti, 2009. A single linkage group confers dominant resistance to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. Journal Applicate Entomology, 133(1): 375–380.**

**Zhang T., M. He, A.M.R. Gatehouse, Z. Wang, M. G. Edwars, Q. Li; K. He. 2004. Inheritance patterns, dominance and cross-resistance of Cry1ab- and Cry1Ac-selected *Ostrinia furnacalis* Guenée). Toxins, 6(1):2694-2707.**

**CAPÍTULO III\*****ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS PROMOVIDAS PELA TOXINA Cry1Ac NO  
INTESTINO MÉDIO DE POPULAÇÕES SUSCETÍVEIS E RESISTENTES DE  
*Anticarsia gemmatalis* Hübner (LEPIDOPTERA: EREBIDAE)**

\*Capítulo formatado para a revista **Arthropod Structure & Development**

## RESUMO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) é uma das principais pragas da cultura da soja e seu controle poder ser realizado utilizando a soja transgênica que expressa a toxina Cry1Ac. Entretanto, seu uso em grande escala pode conduzir à seleção de indivíduos resistentes a essa toxina. O intestino médio (IM) é a principal via de acesso dos alimentos e o sítio primário de atuação de bactérias entomopatogênicos. O conhecimento dos mecanismos de defesa das lagartas é necessário para desenvolver estratégias de controles mais eficazes. Desta forma, o estudo das alterações das células do epitélio intestinal poderá contribuir na elucidação dos mecanismos e ação da toxina, auxiliando o entendimento do fenômeno de resistência. Este trabalho visa caracterizar as alterações do IM em lagartas resistentes e não resistentes à toxina Cry1Ac, utilizando-se de análises morfológicas ao microscópio de luz. Nossos resultados constataram alterações celulares ao longo do IM no estudo comparativo entre em lagartas resistentes e suscetíveis. O IM das lagartas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes a Cry1Ac, apresentaram alterações morfológicas em toda sua arquitetura, tanto epitelial quanto muscular, quando tratadas com a toxina Cry1Ac, no terceiro e quinto ínstars. Estas alterações mais evidentes foram observadas no terceiro instar da população suscetível, estas alterações foram pontuais e ocorreram principalmente nas células colunares, que apresentaram intensa vacuolização citoplasmática, presença de vazios citoplasmáticos, aumento nas protrusões liberadas em direção ao lúmen.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatalis*, morfologia, intestino médio, Cry1Ac, alterações celulares, suscetibilidade e resistência.

## ABSTRACT

The soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: erebidae) is a major pest of soybean and their control can be performed using transgenic soybeans expressing Cry1Ac toxin. However, its use on a large scale can lead to the selection of these insects making them resistant to this toxin. The midgut (MI) is considered the main route of access to food and the primary site of entomopathogenic bacteria activity. Knowledge of the caterpillars of the defense mechanisms is necessary to develop more effective control strategies. Thus, the study of changes in intestinal epithelial cells may contribute in elucidating the mechanisms and action of the toxin, aiding the understanding of the resistance phenomenon. This work aims to characterize the changes in MI resistant caterpillars and not resistant to Cry1Ac toxin, using morphological analysis by light microscopy. Our results found cell changes over MI in the comparative study in resistant and susceptible caterpillars. The MI *A. gemmatalis* susceptible and resistant to Cry1Ac showed morphological changes throughout its architecture, both epithelial as muscle, when treated with Cry1Ac toxin in the third and fifth instars. These most obvious changes were observed in the third instar of the susceptible population, these changes were punctual and occurred mainly in the columnar cells, which showed intense vacuolation, presence of cytoplasmic empty, increase in protrusions released into the lumen.

Keywords: *Anticarsia gemmatalis*, morphology, midgut, Cry1Ac, cellular changes, susceptibility and resistance.



### 3.1 Introdução

A cultura da soja *Glycine max* (L.) Merrill, é uma das principais *commodities* dos países do continente Americano, com 118,135 milhões de hectares plantadas no mundo, onde Estados Unidos e Brasil são os principais produtores com 33 e 31 milhões de hectares plantadas respectivamente (USDA, 2015). Em toda sua extensão, esta cultura no continente americano pode ser alvo de ataques da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Para seu controle é efetuado o uso de diversas estratégias, dentre elas, o uso da soja transgênica com a toxina Cry1Ac. A cultura de soja transgênica lidera na adoção de Organismos Geneticamente Modificados (OGM), atingindo 27 milhões de hectares ou 67,2% da área total com culturas Bt (CELERES, 2013).

O uso constante desta cultura transgênica pode levar à seleção de fenótipos resistentes a toxina. O desconhecimento da maneira exata de atuação da toxina Cry1Ac em *A. gemmatalis*, assim, como dos mecanismos de defesa desenvolvidos pela mesma, reforça a necessidade de maiores estudos sobre o intestino médio deste inseto, já que, esta parte do intestino é considerada a principal via de acesso dos alimentos e o sítio primário de ação de patógenos ingeridos junto da alimentação. O conhecimento sobre as possíveis alterações histológicas dos diferentes tipos de células no epitélio poderiam contribuir no entendimento dos mecanismos que determinam a suscetibilidade/resistência da larva à infecção pela toxina Cry1Ac.

### 3.2 Material e Métodos

#### 3.2.1 Obtenção das larvas

Foram utilizadas duas populações de *A. gemmatalis*, uma suscetível e outra resistente a Cry1Ac, estabelecidas na Embrapa Soja, Londrina, Paraná e mantidas em dieta de Greene et al. (1976) a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , 75% de UR, 14h de fotofase e 10 h de escotofase. A população suscetível (SS) encontrava-se na 38ª geração de laboratório sem pressão de seleção. A raça de *A. gemmatalis* resistente à toxina Cry1Ac (RR) foi obtida através da pressão de seleção em condições laboratoriais, a partir da população suscetível coletada na cultura de soja na região de Sertanópolis, PR, na safra de 1995/1996. A seleção foi realizada com a bactéria HD-73 que expressa unicamente a toxina Cry1Ac. As concentrações utilizadas provocaram mortalidades entre 70 e 90% durante nove ciclos de seleção.

### 3.2.2 Inoculação das lagartas com a proteína Cry1Ac

Para inocular as lagartas com a proteína Cry1Ac foi utilizado um método de incorporação da proteína Cry1Ac na dieta de Greene *et al.* (1976). O tratamento controle consistiu na alimentação com dieta artificial com apenas adição de água destilada sem toxina. A proteína desalinizada e liofilizada com 96% de pureza foi proveniente do Department of Biochemistry (Case Western Reserve University School of Medicine Cleveland, OH) obtida pela Dra. Marianne P. Carey. Após a gelificação da dieta, 20 lagartas neonatas, 20 lagartas de terceiro instar e 20 lagartas de quinto instar, das duas populações foram inoculadas com as CL<sub>25</sub> diferenciadas para as duas populações, sendo 14,4 µg de Cry1Ac para as lagartas resistentes e 0,42 µg de Cry1Ac para as lagartas suscetíveis, com seis repetições utilizando 120 lagartas por tratamento, ambas populações foram expostas para se alimentar dos tratamentos por 18 hrs. As bandejas utilizadas possuíam 32 células com capacidade para 25 mL em cada célula e foram mantidas em câmara climatizada a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  umidade e fotofase de 14:10 (L:D) h.

### 3.2.3 Coleta dos tubos digestivos

Todo o procedimento histológico foi realizado no Laboratório de Insetos, do Departamento de Histologia, da Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Foram coletados 20 tubos por tratamento, com 16 horas após infecção (LEVY, 2005). Para a coleta, as lagartas de *A. gemmatalis* foram anestesiadas por resfriamento a  $-4^\circ\text{C}$  (5 minutos) e dissecadas sob microscópio estereoscópio, com solução salina (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO<sub>3</sub> e água destilada-q.s.p 100 mL). As lagartas foram presas pelas extremidades, por alfinetes entomológicos em placa de Petri preenchida com parafina. Utilizando tesoura oftalmológica, foi realizada uma incisão longitudinal na região ventral do primeiro segmento torácico ao penúltimo segmento abdominal, com rebatimento lateral da cutícula das lagartas de terceiro e quinto instar de idade. Para a análise das lagartas neonatas, as mesmas foram fixadas inteiras após a remoção das cabeças e da porção terminal do abdôme.

### 3.2.4 Fixação

Os tubos foram fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por seis horas. Após a fixação, o material foi lavado em solução de álcool etílico 70%, por três vezes (cinco minutos cada);

desidratado em série crescente de álcool etílico (70, 90 e 100% por 30 minutos cada); pré-infiltrado em solução de resina pura (hidroxetilmetacrilato + ativador) + álcool etílico 100% (1:1) por quatro horas em temperatura ambiente; infiltrado em resina pura (kit de embebição Historesin® Leica) em temperatura ambiente por 24 horas; incluído em moldes apropriados de polietileno contendo solução de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + ativador (dibenzoilperóxido) + endurecedor (dimetilsulfóxido) e mantido em temperatura ambiente até a polimerização da resina. O material emblocado foi cortado com 5 µm de espessura, com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo e colocado em lâminas de vidro previamente limpas com álcool etílico-éter.

### 3.2.5 Coloração

Os cortes foram hidratados (2 minutos) em água destilada; corados pela Hematoxilina de Harris (30 minutos); lavados em água corrente (10 minutos); passagem em etanol 90% (2 min); corados com Eosina aquosa (30 min); lavados em água destilada (10 min); desidratados em álcool etílico 90% (10 min) e 100% (10 min); diafanizados em dois banhos de xilol (10 min cada um); montados em bálsamo do Canadá. Após secagem, as lâminas foram analisadas e as imagens capturadas em fotomicroscópio de luz (Zeiss: Axiophot), do Departamento de Histologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

## 3.3 Resultados

O intestino médio (IM) das lagartas suscetíveis e resistentes no tratamento controle, em todos os ínstares estudados (Figs. 4A, 4B, 5A, 5B, 6A e 6B), era formado pela camada epitelial e camada muscular (CM). O epitélio era pseudoestratificado prismático com bordadura estriada, com três tipos celulares: células colunares (Co), caliciformes (Ca) e regenerativas (Cr). Revestindo o epitélio encontrou-se a membrana peritrófica (Mp) que separa o IM em dois espaços o ectoperitrófico e endoperitrófico. O epitélio repousa sobre a camada muscular composta pelos músculos longitudinal e circular.

No tratamento com a toxina Cry1Ac foram observadas pequenas alterações na morfologia do epitélio e da camada muscular. Sendo que as alterações foram mais observadas nas Co (Figs. 4C, 4D, 5C, 5D, 6C e 6D).

No IM de lagartas neonatas das ambas as populações, observou-se alterações no arranjo cromatínico das Co (tipo descondensação), sendo mais visível nas lagartas resistentes (Figs. 4C e 4D).

No IM das lagartas do terceiro instar, observou-se nas lagartas suscetíveis, grande quantidade de protruções citoplasmáticas, ausência de Mp, ninho de células Cr e fragmentação da CM (Fig. 5C), enquanto que, nas lagartas resistentes notou-se algumas alterações como a presença de protruções citoplasmáticas (Fig. 5D).

No tratamento com a toxina Cry1Ac, os IM das lagartas do quinto instar da população suscetível, apresentaram algumas protruções citoplasmáticas e presença de ninho de células Cr (Fig. 6C). Nas lagartas resistentes, as Co eram hipertróficas (volumosas) e bastante vacuolizadas (Fig. 6D).

### 3.4 Discussão

O IM das lagartas de *A. gemmatalis* das populações suscetíveis e resistentes à toxina Cry1Ac nos três ínstares avaliados com o tratamento controle (sem toxina na dieta artificial) apresentou arquitetura semelhante à descrita por Levy (2005) e Cruz (2014) com *A. gemmatalis* onde estudaram IM de lagartas suscetíveis e resistentes ao AgMNPV, e com outros lepidópteros (Mathur, 1966; Anderson e Harvey, 1966; Judy e Gilbert, 1969; Judy e Gilbert, 1970; Chi *et al.*, 1975; Lello *et al.*, 2001; Barbehenn e Martin, 1992; Spence e Kawata, 1993; Billingsley e Lehane, 1996; Ribeiro *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 2002, Sousa, 2009).

O tratamento com a toxina Cry1Ac, nas populações resistentes e suscetíveis, provocou alterações principalmente no epitélio. As alterações eram distintas e visíveis, como ausência de membrana peritrófica; presença de vacúolos citoplasmáticos nas células Co; aumento de protruções citoplasmáticas sendo descartadas, às vezes contendo porções da bordadura estriada e/ou núcleo em seu interior, concordando com o estudo realizado por Cruz (2014) com *A. gemmatalis*. Além disso, o epitélio apresentou-se mais alto, com várias células e núcleos em posições variadas, a exemplo de uma estratificação epitelial. Fato este semelhante ao estudo de Sousa (2009).

Sabe-se que a ingesta de alimento contendo patógenos (vírus, fungos e bactérias), compostos químicos (flavonoides), produtos fitossanitários químicos e biológicos, podem promover alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas no intestino médio, resultando em fragilidades as quais poderão levar a morte do inseto (Fugi *et al.*, 2005; Salvador, 2008; Cruz, 2010; Costa *et al.*, 2012, Cruz, 2014).

A aparente ausência da Mp foi um indicativo de forte alteração, pois essa estrutura é responsável pela defesa do epitélio, e atua como barreira permeável às enzimas digestivas na proteção contra agentes patogênicos e abrasivos (Terra, 2001; Wang e Granados, 2001). Quando comparamos a estrutura da Mp das lagartas suscetíveis e resistentes tratadas com a toxina Cry1Ac, constatamos que elas apresentavam diferenças. A ausência desta membrana pode ser associada à desorganização que as células Co sofreram em seu citoplasma, o que pode prejudicar a formação e a liberação dos produtos a serem secretados e conseqüentemente, interferir na qualidade do produto a ser utilizado na síntese e formação da própria membrana (Harper e Hopkins, 1997; Harper e Granados, 1999, Sousa, 2009, Cruz, 2014). Aparentemente, a Mp era mais espessa na população resistente tratada com a toxina Cry1Ac. Nossos resultados são similares aos de Levy (2005), que descreveu que a Mp da população resistente era mais espessa que a população suscetível ao AgMNPV, quando descreveu a morfologia das populações suscetíveis e resistentes ao vírus.

As células Co são consideradas as mais numerosas no epitélio e descritas como células digestivas ou principais. Apresentam características morfológicas de células absorptivas, com citoplasma basófilo e extensões citoplasmáticas (microvilosidades) em sua região apical que formam a bordadura estriada (Levy *et al.*, 2004; Okuda *et al.*, 2007; Fialho *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2009). Na porção apical das células Co, observamos alterações como espessamento da bordadura estriada na população resistente à toxina, desorganização e desestruturação dessa bordadura e até a sua ausência na população suscetível tratada com a toxina.

Na região basolateral do IM das lagartas resistentes neonatas, tratados com a toxina Cry1Ac, o núcleo celular apresentou aspecto granuloso e cromatina descondensada. Tal fato pode estar relacionado possivelmente à alta atividade metabólica das células. Os resultados deste trabalho são corroborados por Cruz (2014) que trabalhou com *A. gemmatalis* tratadas com genótipos de soja resistentes a insetos.

Assim, de modo geral, as células Co das lagartas com o tratamento da toxina Cry1Ac em ambas as populações, apresentavam notáveis alterações na porção apical, desde a liberação de protruções citoplasmáticas com núcleo ou porção dele e intensa vacuolização citoplasmática da porção basolateral, em concordância com a descrição dos efeitos dos genótipos dos compostos foliares observados por Salvador (2008) e por Cruz (2014).

No entanto, nossos resultados diferem dos encontrados por Levy (2005), esta autora observou que lagartas resistentes ao vírus apresentaram células Co com maior quantidade de protruções citoplasmáticas e maior número de células Cr, quando comparadas a população

suscetível. Possivelmente esta diferença deve-se aos diferentes patógenos testados, no caso do Levy (2005) foi AgMNPV, enquanto utilizamos a toxina Cry1Ac.

A formação de protruções citoplasmáticas no processo de liberação e/ou descarte para o espaço ectoperitrófico pode ser considerada um processo normal de renovação epitelial, ou ainda, pode estar relacionado ao processo de degeneração celular como resultado da renovação epitelial (Anderson e Harvey, 1966; De Priester, 1971); eliminação de artefato (Ryerse *et al.*, 1992); pela secreção apócrina ou microapócrina na liberação de enzimas digestivas (Santos *et al.*, 1984; Wood e Lehane, 1991), e à ação de microrganismos ou da ingesta de produtos nocivos, no qual as células buscam esse recurso para “eliminar e/ou expulsar” os agentes tóxicos do interior das células (Brooks *et al.*, 2002).

As células Ca, também são semelhantes às de outros lepidópteros descritos na literatura (Santos *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2008), apresentando cavidade em forma de cálice, chamada de câmara globosa e têm como função principal realizar o transporte de potássio da hemolinfa para o lúmen, mantendo a homeostase iônica e cooperando com as células Co na absorção de metabólitos (Cavalcante e Cruz-Landim 1999; Klowden, 2002). Levy *et al.* (2004) trabalhando com *A. gemmatalis* e Moscardi (2014) trabalhando com *S. cosmioides*, descreveram que as células Ca apresentaram uma grande região basal, citoplasma acidófilo e núcleo basal. Essa cavidade em forma de cálice está delimitada por projeções citoplasmáticas. O ápice mostra projeções menores e mais finas, que são organizados na forma de um tipo de válvula que quase fecha a cavidade (Levy, 2004). Embora as células Ca do intestino médio de lagartas *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes aos tratamentos com e sem toxina Cry1Ac e nos ínstaes testados não tenham mostrado grandes alterações morfológicas, observamos algumas alterações em relação à turgência da câmara e também com relação à quantidade de células, pois estas aparentemente se encontram hipertrófica, com ligeiro aumento do volume celular e talvez aumento na quantidade, entretanto, esses dados carecem de análise morfométrica e histométrica que possam corroborar nossas observações visuais.

As células Cr se assemelham aos resultados encontrados por Levy *et al.* (2004) e Pinheiro, Quagio-Grassiotto e Gregório (2008). Esses autores relatam que, na camada epitelial de *A. gemmatalis* e *Diatraea saccharalis*, respectivamente, estas células foram encontradas isoladamente, emparelhadas ou em grupos na região basal do epitélio e são redondas ou ovais, com citoplasma fortemente basófilo. As células Cr foram observadas na região basal do epitélio, isoladamente ou aos pares ou em grupos, denominados de “ninhos”. Estas células apresentavam formato oval a esférico, com o citoplasma basófilo como descrito por Wanderley-Teixeira *et al.* (2006) em *Tropidacris collaris* (Stoll) e Scudeler (2012) em *C. claveri*. Foi observado um

aparente aumento numérico destas células, no tratamento com a toxina Cry1Ac, porém, para validar esses resultados devem-se realizar estudos quantitativos das células. Outra alteração observada foi em relação à presença dos “ninhos de células regenerativas”. Os “ninhos” podem estar relacionados ao processo de renovação epitelial, o qual consiste na substituição de células eliminadas e/ou danificadas, geralmente células Co e células Ca, por outras desenvolvidas a partir da divisão mitótica dessas células (Billingsley e Lehane, 1996; Chapman, 1998; Cavalcante e Cruz-Landim, 1999). Assim, pode-se inferir que houve aumento na atividade mitótica destas células, semelhante ao observado por Cruz (2014) com *A. gemmatalis*, após tratamentos com genótipos resistentes aos insetos.

A CM, que reveste externamente o todo digestivo, foi observada fragmentada e com ligeira atrofia no tratamento da toxina Cry1Ac na população suscetível. Mesmo com pouco grau de fragmentação, indica forte alteração, pois mesmo que pontuais essas camadas estavam desorganizadas, o que afeta, portanto, toda a arquitetura e funcionalidade do tubo digestivo. Nossos resultados são corroborados por Sousa (2009) que trabalhou com *Alabama argillacea* tratadas com Cry1Ac. Estas alterações podem prejudicar o processo de digestão, as trocas metabólicas com a hemolinfa e os outros órgãos, como corpo gorduroso, alterando a integridade funcional do IM das lagartas testadas, levando-as provavelmente não ter sucesso para completar seu desenvolvimento (Moscardi, 2014).

De forma geral, observou-se que o terceiro instar das lagartas suscetíveis com tratamento Cry1Ac apresentou maiores alterações à toxina quando comparado com as lagartas neonatas das duas populações, com as lagartas resistentes do terceiro instar e com as lagartas do quinto instar das duas populações. Além disso, observou-se um epitélio mais espesso e Mp sem modificação nas lagartas da população resistente em todos os ínstaes, o que provavelmente aumenta o nível de proteção na exposição da toxina. Este fato é corroborado por Levy (2004) quando descreveu a Mp das lagartas resistentes ao AgMNPV.

Por outro lado, não se observou alterações nas lagartas neonatas, provavelmente devido ao fato de que essas lagartas se alimentam em sua eclosão dos nutrientes da ovipostura e tem reservas que permite não se alimentar quando elas percebem um agente tóxico em sua dieta. Do mesmo jeito, as lagartas de quinto instar estão se desenvolvendo para a formação de pupas, onde sua alimentação pode encontrar-se diminuída. Podemos inferir que nesses dois ínstaes (neonato e quinto) o acesso à toxina pode estar diminuído.

### 3.5 Conclusão

O IM das lagartas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes a Cry1Ac, apresentaram alterações morfológicas em toda sua arquitetura, tanto epitelial quanto muscular, quando tratadas com a toxina Cry1Ac, no terceiro e quinto ínstars. Estas alterações mais evidentes foram observadas no terceiro instar da população suscetível, estas alterações foram pontuais e ocorreram principalmente nas células colunares, que apresentaram intensa vacuolização citoplasmática, presença de vazios citoplasmáticos, aumento nas protruções liberadas em direção ao lúmen.



### 3.6 Referências

- Anderson, E; W., Harvey. 1966. Active transport by cercopia midgut. The journal of Cell Biology. 31 (1): 107-134.
- Barbehenn, R.V; M.M. Martin. 1992. The protective role of the peritrophic membrane in the tannin-tolerant larvae of *Orgyia leucostigma* (Lepidoptera). J. Insect Physiol. 38: 973-980.
- Billingsley, P. F; M. J., Lehane. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane, M. J., Billingsley, P. F. (Eds). Biology of the Insect Midgut. London: Chapman and Hall. pp. 3-30.
- Brooks, M. E.; K. H., Gordon, S. J., Dorrian, E. R., Hines; T. N., Hanzlik. 2002. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera stunt virus* (Tetraviridae). Journal of Invertebrate Pathology, 80: 97-111.
- Cavalcante, V. M; C. Cruz-Landim. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. Naturalia 24: 19-39.
- CELERES, 2015. Relatório biotecnologia. <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2015/12/IB13021.pdf>
- Chapman, R. F. 1998. The insects: structure and function. 4 ed. Cambridge, University Press, 770p.
- Chi, C., W.A. Drew, J.H. Young; M.R. Curd. 1975. Comparative morphology and histology of the larval digestive system of two genera of Noctuidae (Lepidoptera): *Heliothis* and *Spodoptera*. Ann. Entomol. Soc. Am. 68: 371-380.
- Costa, M. S., D. O. Pinheiro, J. E. Serrão, M. J Pereira. 2012. Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. Neotropical Entomology, 41: 311-314.
- Cruz, N. A. 2010. Estudo Morfológico e Histoquímico do Intestino Médio de Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) Suscetíveis e Resistentes ao AgMNPV Alimentadas com Genótipos de Plantas Resistentes a Insetos. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná. 161p.
- Cruz, N. A. 2014. Desenvolvimento Biológico e Alterações Morfofisiológicas no Intestino Médio da Lagarta da Soja *Anticarsia gemmatalis* Resistentes ao Baculovírus AgMNPV Allimentadas com Genótipos de Soja. Tese Doutorado Universidade Estadual de Londrina.
- De Priester, W. 1971. Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Callifora erythrocephala*. Journal of Ultrastructure Research, 36 (5): 783-805.
- Fialho, M. do C. Q., J. C. Zanuncio, C. A. Neves., F. S. Ramalho., J. E. Serrão. 2009. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus*

(heteroptera: pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. *Annals of the Entomological Society of America*. 102: 119-127.

Fugi, C. G.; A. L. Lourenção, J. R. P. Parra. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agricola*, 62: 31-35.

Greene, G. L., N. C. Lepla, W. A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*. 69 (4): 488-497.

Harper, M. S; R. R Granados. 1999. Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. *Tissue and Cell*, Oxford, 31 (2): 202-211.

Harper, M. S; T. L. Hopinks. 1997. Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue and Cell*, 29 (2): 463-475.

Judy, K. J; L. I. Gilbert. 1969. Morphology of the alimentary canal during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* L. *Ann. Entom. Soc. Amer.* 62: 1438-1446.

Judy, K. J; L. I. Gilbert. 1970. Histology of the alimentary canal during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* L. *J. of Morphol.* 131: 277-300.

Klowden, M. J. 2002. *Physiological systems in insects*. New York, Academic Press. 415p.

Lello, E; A. M. Vieira 2001. Desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera:Cuterebridae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 18: 91-98.

Levy, S. M., Am.F. Falleiros, E. A. Gregório, N. R. Arrebola and L.A. Toledo. 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Braz. J. Biol.* 64: 633-638.

Levy, S. M. 2005. Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Campus de Botucatu, Botucatu.

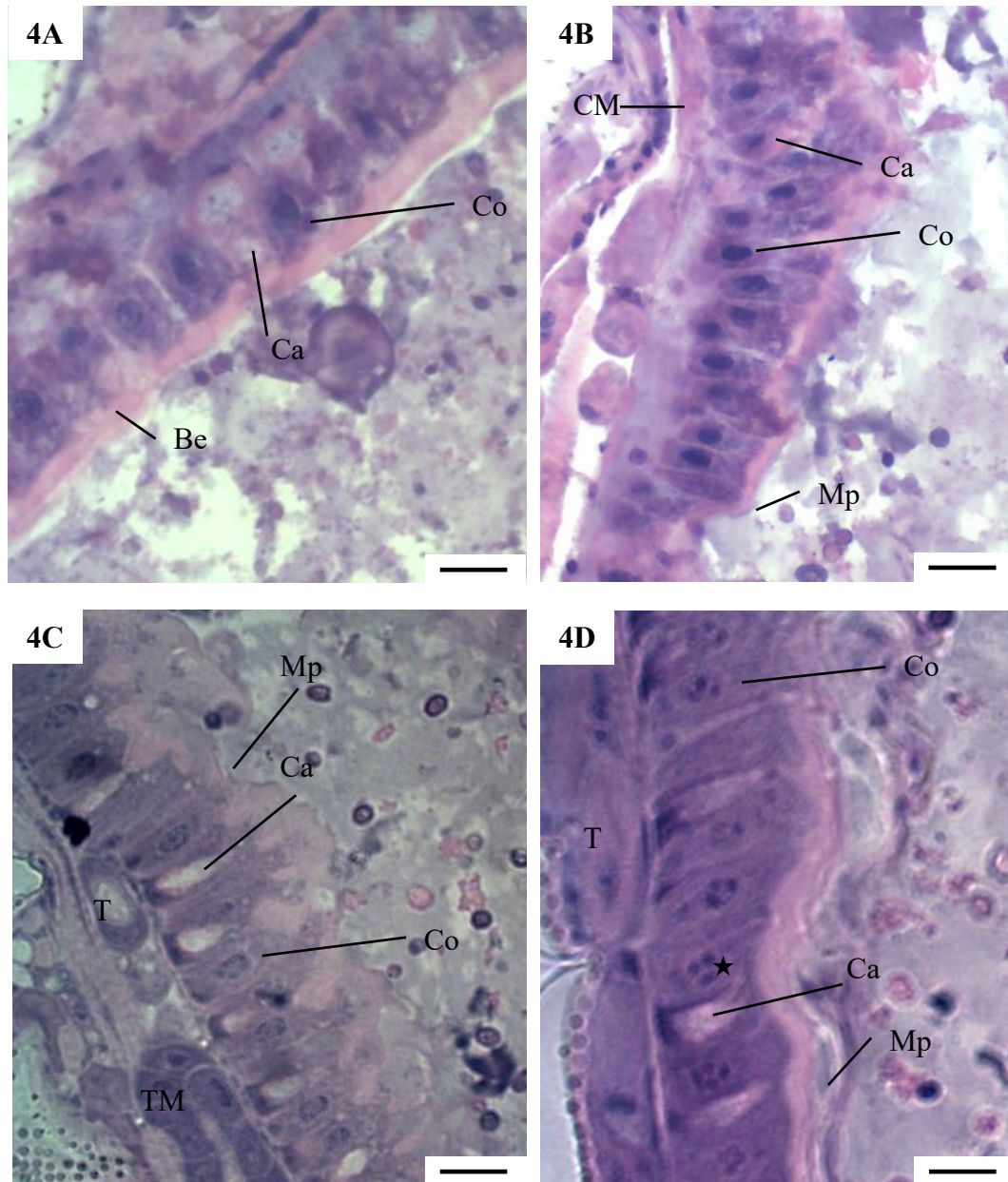
Mathur, L. M. L. 1966. Developmental changes in the alimentary canal of *Prodenia litura* Fabr. (Lepidoptera). *J. Nat. Hist.* 6: 39-46.

Moscardi, M. L. 2014. Passagens sequenciais do múltiplo nucleopoliedrovírus de *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae): mortalidade e aspectos morfológicos do intestino médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

Okuda, K.; F. Almeida, R. A. Mortara, H. Krieger, O. Marinotti, A. T. Bijovsky. 2007. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 1307-1315.

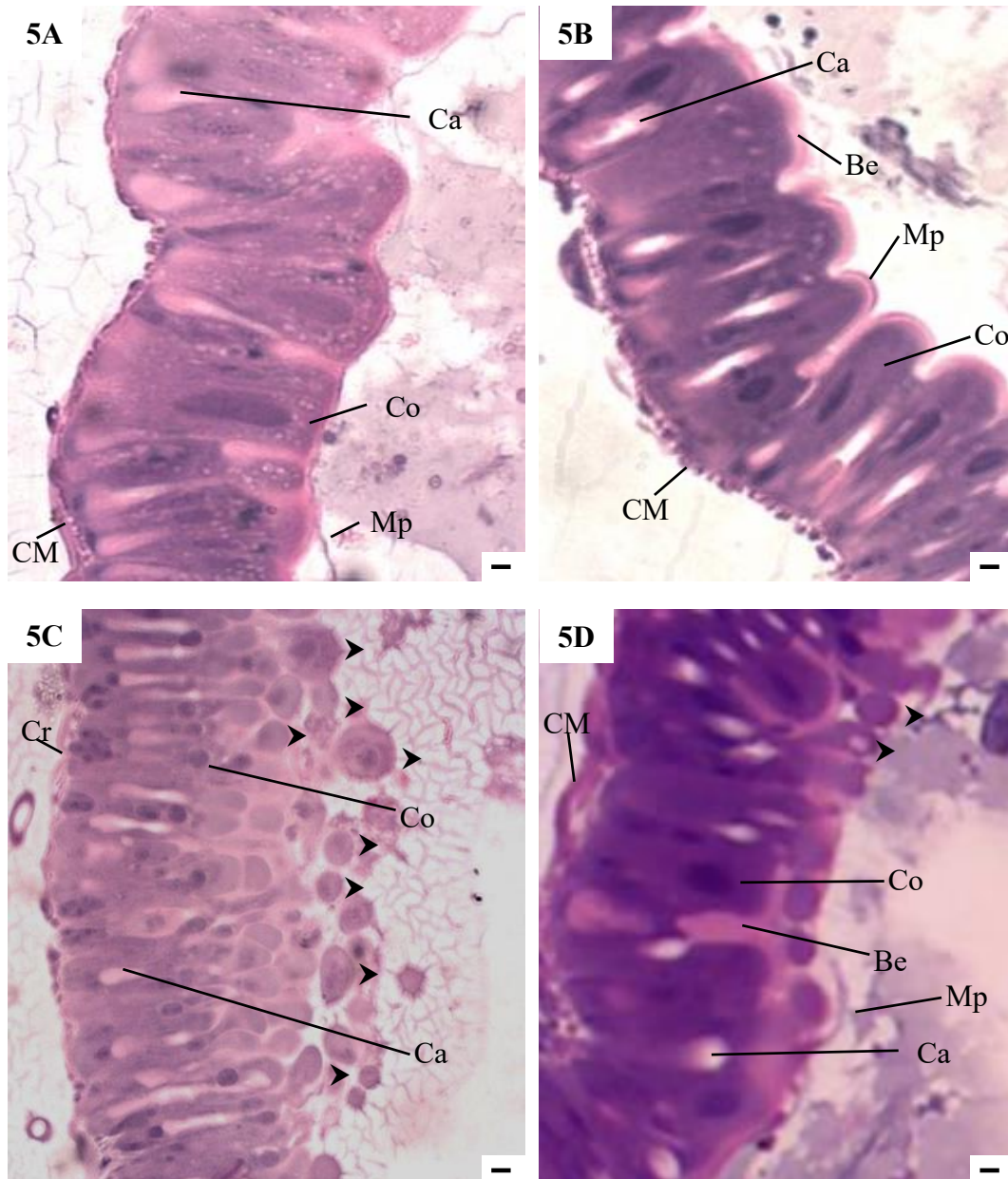
- Pinheiro, D. O., I. Quaggio-Grassiotto; E. A. Gregório. 2008. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Neotropical Entomology*. 37: 413-419.
- Ribeiro, A. F., C. Ferreira, W. R. Terra. 1997. Morphological basis of digestion in insects. *Acta Microscopia*, 6: 71-73.
- Ryerse, J. S., J. P. Pursell, R. D. Sammon, P. B. Lavrix. 1992. Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue and Cell*. 24: 751-771.
- Salvador, M. C. 2008. Efeito de genótipos de soja e flavonoides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatilis*. 2008. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal. 116p.
- Santos, C. D., A. F. Ribeiro, C. Ferreira; W. R. Terra. 1984. The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue res*. 237: 565-574.
- Scudeler, E. L. 2012. Efeito do óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no intestino médio de *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae): Estudo citoquímico, imunocitoquímico e ultraestrutural. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 228p.
- Sousa, M.E. 2009. Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) midgut. *Micron*, 40: 743-749.
- Spence, K.D.; M.Y. Kawata. 1993. Permeability characteristics of the peritrophic membranes of *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 39: 785–790.
- Terra, W. R. 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 47: 47-61.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2015. USDA Agricultural Projections to 2024. <http://www.ers.usda.gov/media/1776036/oce151.pdf>
- Wanderley-Teixeira, V., A. A. C. Teixeira, F. M. Cunha, M.K.C.M. Costa, A. F. S. L. Veiga; J. V. Oliveira. 2006. Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). *Braz. J. Biol.* 66: 1045-1049.
- Wang, P.; R.R. Granados, 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 47 (2): 110–118.
- Wood, A. R.; M. J. Lehane. (1991). Relative contributions of apocrine and eccrine secretion to digestive enzyme release from midgut cells of *Stomoxys calcitrans* (Insecta: Diptera). *Journal of Insect Physiology*, 37: 161-166.

**Figura 4:** Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas do primeiro instar de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao Cry1Ac. Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Barra = 1  $\mu$ m.



**Morfologia geral do IM:** Lagartas suscetíveis com tratamento controle (4A), lagartas resistentes com tratamento controle (4B), lagartas suscetíveis com tratamento Cry1Ac (4C) e lagartas resistentes com tratamento Cry1Ac (4D). Células colunares (Co), caliciformes (Ca) e membrana peritrófica (Mp), bordadura estriada (Be), camada muscular (CM), Traqueia (T), túbulos de Malpighi (TM) e mudança do arranjo cromatínico (★).

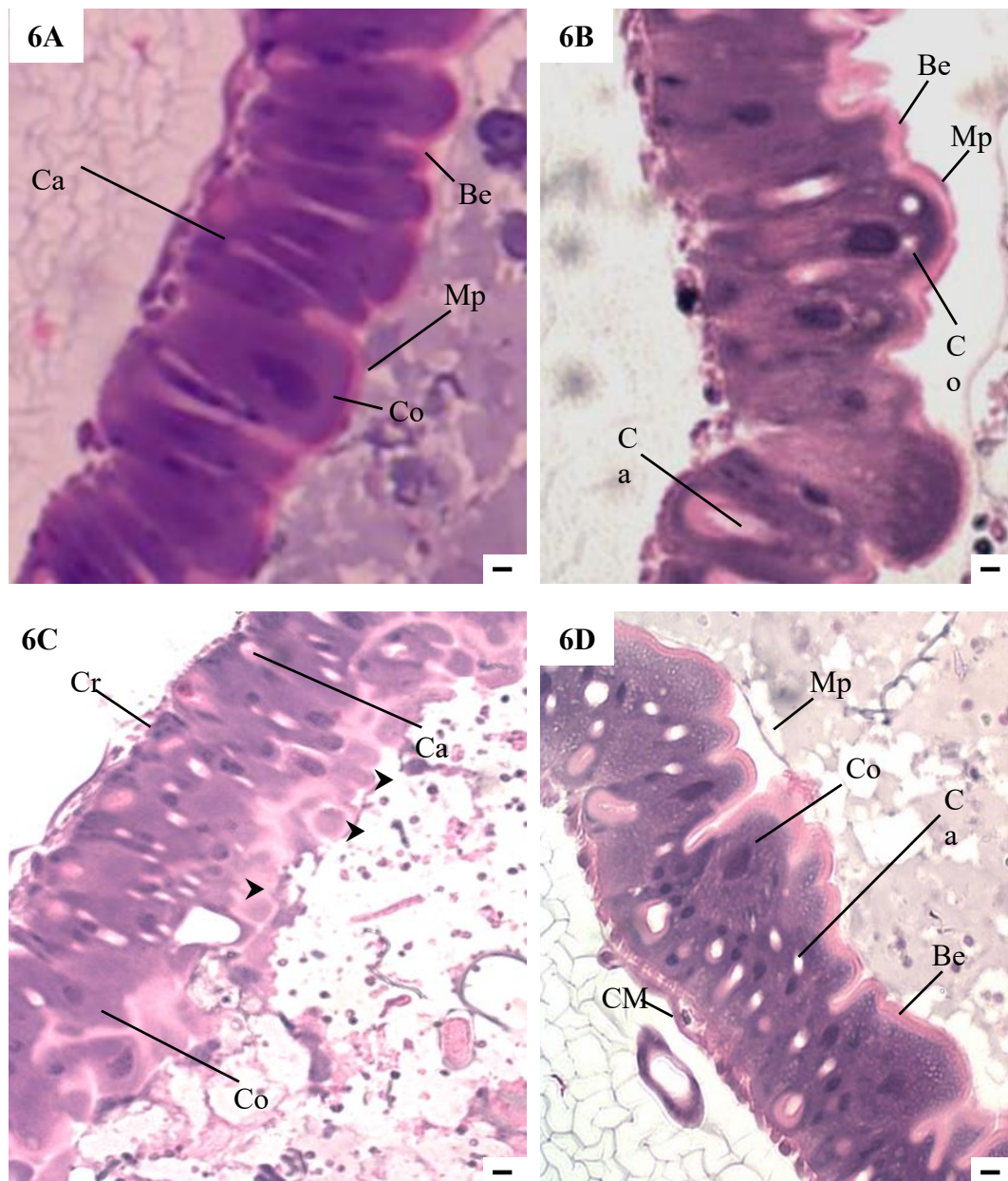
**Figura 5:** Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas do terceiro instar de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao Cry1Ac. Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Barra = 10  $\mu$ m.



**Morfologia geral do IM:** Lagartas suscetíveis com tratamento controle (5A), lagartas resistentes com tratamento controle (5B), lagartas suscetíveis com tratamento Cry1Ac (5C) e lagartas resistentes com tratamento Cry1Ac (5D). Células colunares (Co), caliciformes (Ca) e membrana peritrófica (Mp), bordadura estriada (Be), ninho de células regenerativas (Cr), camada muscular (CM) e grande quantidade de protruções citoplasmáticas (▶).



**Figura 6:** Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas do quinto instar de *Anticarsia gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao Cry1Ac. Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina (HE). Barra = 10  $\mu$ m.



**Morfologia geral do IM:** Lagartas suscetíveis com tratamento controle (6A), lagartas resistentes com tratamento controle (6B), lagartas suscetíveis com tratamento Cry1Ac (6C) e lagartas resistentes com tratamento Cry1Ac (6D). Células colunares (Co), caliciformes (Ca), ninho de células regenerativas (Cr), membrana peritrófica (Mp) bordadura estriada (Be), camada muscular (CM), protrusões citoplasmáticas (▶).

## REFERÊNCIA GERAL

- ADREADIS, S. S., et al., (2007). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 100 (1): 195-201.
- AIMANOVA K. G., et al., (2006). Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology** 92 (3): 178-187.
- AKHURST, R. J., et al., (2003). Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 96 (4): 1290-1299.
- ALI, M. I., et al., (2006). Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology** 99 (1): 164-175.
- ALINIA F., et al., (2000). Effect of plant age, larval age, and fertilizer treatment on resistance of a Cry1Ab-transformed aromatic rice to lepidopterous stem borers and foliage feeders. **Journal of Economic Entomology** 93 (2): 484-493.
- ALSTAD, D. N.; ANDOW, D. A. (1995). Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science** 268 (5219): 1894-1896.
- ALVES, A. P., et al., (2006). Inheritance of resistance to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology** 99 (2): 494-501.
- ANDERSON, E; W., HARVEY. (1966). Active transport by cercopia midgut. **The journal of Cell Biology**. 31(1): 107-134.
- ANDOW, D. A; ALSTAD, D. N. (1998). F<sub>2</sub> screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology** 95 (1): 14-21
- ANDOW, D. A. (2008). The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews** 4 (1):142-199.
- ANDOW, D. A., et al., (2000). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology** 93 (1): 26 - 30.
- ATSUMI, S., et al., (2012). Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes to Bt toxin Cry1Ab in the silk-worm, *Bombyx mori*. **Proc. Natl. Sci.** 109 (1): 1591-1598.
- BALLESTER, V., B., et al., (1994). Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to Cry1A(b). **Biocontrol Sci. And Technol.** 4(1): 437-443.
- BALLESTER, V., et al., (1999). Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins

in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology** 65 (4): 1413-1419.

BARBEHENN, R.V; M.M. MARTIN. (1992). The protective role of the peritrophic membrane in the tannin-tolerant larvae of *Orgyia leucostigma* (Lepidoptera). **J. Insect Physiol.** 38: 973-980.

BATES, S. L., et al., (2005). Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology** 23 (1): 57-62.

BAXTER, S. W., et al., (2005). Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. **Insect Molecular Biology** 14 (3): 327 - 334.

BAXTER, S. W., et al., (2011). Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. **Genetics** 189 (2): 675–679.

BERNARDI, D., et al., (2015). Cross-Resistance between Cry Proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. **PloS One.** 10(10): e140130.

BERNARDI, O. (2012). Avaliação do conceito de anta dose e eficácia da soja MON 87701 x MON 89788 contra *A. gemmatalis* e *P. includens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. In: Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 8701 x MON 89788 no Brasil. **Tese doutorado ESALQ/USP.** Pp 41-71.

BERNARDI, O., et al., (2011). Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; DIAS, G. (Ed.). Plantas geneticamente modificada: desafios e oportunidades para regiões tropicais. **Suprema** Cap, 9: 179-204.

BILLINGSLEY, P. F; M. J., LEHANE. (1996). Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane, M. J., Billingsley, P. F. (Eds). *Biology of the Insect Midgut*. London: **Chapman & Hall.** pp. 3-30.

BIRD, L. J; R. J. AKHURST, (2004). Relative fitness of Cry1A-resistant and - susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on conventional and transgenic cotton. **Journal of Economic Entomology** 97 (5): 1699 - 1709.

BIRD, L. J; R. J. AKHURST, (2005). Fitness of Cry1A-resistant and susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton with reduced levels of Cry1Ac. **Journal of Economic Entomology** 98 (4): 1311 - 1319.

BLANCO, C. A., et al., (2009). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac resistance frequency in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 102 (1): 381 - 387.

BOLIN P. C., et al., (1998.) Long-term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology** 92 (5):1021–30



BOURGUET, D. et al., (2000). Insecticide Resistance and Dominance Levels. **Journal of Economic Entomology**, 93(6):1588-1595.

BOURGUET, D., et al., (2003). Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Theoretical and Applied Genetics** 106 (7): 1225 - 1233.

BRAGA, D.P.V., et al., (2011). Estudo de Caso de Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: Borém, A; G. Almeida (Ed). Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais. **Suprema**, cap. 17, pp: 347-390.

BRAVO, A., et al., (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 41 (7): 423 - 431.

BRAVO, A; M. SOBERÓN, (2008). How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology** 26 (10): 573 - 579.

BROOKS, M. E., et al., (2002). Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera stunt virus* (Tetraviridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, 80: 97-111.

BURD AD, et al., (2003). Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), in eastern North Carolina. **Journal of Economic Entomology** 96 (1):137-42

CACCIA, S., et al., (2010). Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. **PLoS One** 5 (4): e9975.

CANDAS, M., et al., (2003). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. **Molecular and Cellular Proteomics** 2 (1): 19 - 28.

CAPRIO, M. A. (1998). Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. **Journal of Economic Entomology** 91 (5):1021-1031.

CAPRIO, M. A., et al., (2000). Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. In: Lacey; L. A., H. K., Kaya (Ed.). Field manual of techniques in invertebrate pathology. Dordrecht: **Kluwer Academic**, Cap 8, pp 805-828.

CARRIERE, Y., et al., (2001). Large-scale management of insect resistance to transgenic cotton in Arizona: can transgenic insecticidal crops be sustained? **Journal of Economic Entomology** 94 (2): 315-325.

CAVALCANTE, V. M; C. CRUZ-LANDIM. (1999). Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia** 24: 19-39.

CERDA H, et al., (2003). Laboratory culture conditions affect stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae). **Journal of Applied Entomology** 127 (3): 142-45

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBIO). (2010).

Commercial release of genetically modified insect-resistant and herbicide –tolerant soy containing genetically modified MON 87701 and MON 89788. **Technical Opinion** No. 2542/2010.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBIO). (2010). Liberação comercial de soja geneticamente modificada resistente a insetos e tolerante a herbicida, soja MON87701 x MON 89788. In: **Parecer Técnico** nº 2542/2010.

CONSULTORIA FOCADA NA ANÁLISE DO AGRONEGÓCIO (CELERES), (2013). Relatório informativo biotecnologia. <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/12/IB13021.pdf>

COSTA, M. S., et al., (2012). Morphological changes in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvae following exposure to *Annona coriacea* (Magnoliales: Annonaceae) extract. **Neotropical Entomology**, 41: 311-314.

CRESPO A.L.B., et al, (2009). On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Pest Manag Sci**, 65(1): 1071-1081.

CRESPO, A. L., et al., (2011). Cross-resistance and mechanism of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 107 (3): 185 - 192.

CRUZ, N. A. (2010). Estudo Morfológico e Histoquímico do Intestino Médio de Larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) Suscetíveis e Resistentes ao AgMNPV Alimentadas com Genótipos de Plantas Resistentes a Insetos. **Dissertação (Mestrado em Agronomia) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, Paraná. 161p.

CRUZ, N. A. (2014). Desenvolvimento Biológico e Alterações Morfofisiológicas no Intestino Médio da Lagarta da Soja *Anticarsia gemmatalis* Resistentes ao Baculovírus AgMNPV Alimentadas com Genótipos de Soja. **Tese Doutorado Universidade Estadual de Londrina**. p 15.

CHANDRASHEKAR, K; G. T. GUJAR, (2004). Development and mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin Cry1Ac in the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Indian Journal of Experimental Biology** 42 (2): 164 -173.

CHAPMAN, R. F. 1998. The insects: structure and function. 4 ed. Cambridge, **University Press**, 770p.

CHAUFAUX J, S. M., et al., (2001). Chronic exposure of the european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology** 94(6): 1564-1570.

CHI, C., W.A. et al., (1975). Comparative morphology and histology of the larval digestive system of two genera of Noctuidae (Lepidoptera): *Heliothis* and *Spodoptera*. **Ann. Entomol. Soc. Am.** 68: 371-380.

CHRISTOU, P., et al., (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Sciences** 11 (6): 302 - 308.

CONTE, O., et al.(2015) Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2014/15 no Paraná. Documentos 361. **Emater Embrapa**, 60 p.

DE PRIESTER, W. (1997). Ultrastructure of the midgut epithelial cells in the fly *Callifora erythrocephala*. **Journal of Ultrastructure Research**, 36 (5): 783-805.

DEVINE, G. J., et al., (2007). Insecticide use: Contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**. 24 (3): 281-306.

DHURUA, S; G. T. GUJAR, (2011). Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Management Science** 67 (8): 898 - 903.

DIEZ-RODRÍGUEZ G.I; C. OMOTO. (2001). Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology** 30(2): 311-316.

DINGHA B. N., et al., (2004). Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin on the metabolic rate of Cry1C resistant and susceptible *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Physiological Entomology** 29 (5): 409–18

DOWNES, S., et al., (2009). Frequency of alleles conferring resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from 2002 to 2006. **Journal of Economic Entomology** 102 (2): 733-742.

DOWNES, S., et al., (2010). Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. **PLoS One**. 5 (9): e12567.

ENGELS, H., et al., (2010). Evaluating resistance to Bt toxin Cry1Ab by F<sub>2</sub> screen in European populations of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology** 103 (3): 1803 - 1809.

ESTADA U; J. FERRE., (1994). Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.** 60(1): 3840-3846.

FABRICK, J. A., et al., (2014). Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. **Plos One**. 9(1): 97900.

FALCONER, D. S; T. F. MACKAY, (1996). Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Longman. 38-56

FARIAS, J. R., et al., (2014). Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brasil. **Crop Protection**. 64 (1): 150-158.

FENGXIA M, et al., (2004). Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science** 60 (2): 167-172.

FERRÉ, J., et al., (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 88 (12): 5119 - 5123.

FERRÉ, J., et al., (2008). Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). En: Integration of insectresistant genetically modified crops within IPM programs, Eds.: ROMEIS, J., SHELTON, A. M., & KENNEDY. G. C. **Springer Science + Business Media** B.V. pp. 41-85.

FERRÉ, J; J. VAN RIE, (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 47 (1): 501 - 533.

FERREIRA, B.S.C; A.R. PANIZZLI. (1978). Distribuição de ovos e lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner em plantas de soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 7 (1): 54-59.

FIALHO, M.C.Q., et al., (2009). Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (heteroptera: pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. **Annals of the Entomological Society of America**. 102: 119-127.

FIRKO, M. J; J. L. HAYES, (1990). Quantitative genetics tools for insecticide resistance risk assessment: estimating the heritability of resistance. **Journal of Economic Entomology** 83 (3): 647 - 654.

FITT, G. P. (1989). The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, 34 (1): 17-52.

FORCADA, C., et al., (1999). Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 42 (1): 51 - 63.

FRANKLIN, M. T., et al., (2009). Modified *Bacillus thuringiensis* toxins and a hybrid *B. thuringiensis* strain counter greenhouse-selected resistance in *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**. 75 (7): 5739 - 5741.

FRUTOS, R. C. (1999). Rang and M. Royer: Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology** 19 (3): 227-276

FUGI, C. G. et al., (2005). Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola**, 62: 31-35.

GAHAN L. J., et al., (2007a) A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology** 100 (1): 187-194.

- GAHAN L. J., et al., (2007b) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science** 293(5531): 857-860.
- GAHAN, L. J., et al., (2005). Genetic basis of resistance to Cry1Ac and Cry2Aa in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 98 (4): 1357 - 1368.
- GAHAN, L. J., et al., (2010.) An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLoS Genet** 6: e1001248.
- GAMUNDI, J.C. (1988). Biologia comparada e nutrição quantitativa de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas e vagens de soja. **Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo**. p. 137.
- GAO, Y., et al., (2009). Frequency of Bt resistance alleles in *H. armigera* during 2006-2008 in Northern China. **Environmental Entomology** 38 (4): 1336 - 1342.
- GASSMANN A. J., et al., (2008). Synergism between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* crops: integrating biological control and resistance management. **Journal of Applied Ecology**. 45 (3):957-66
- GASSMANN, A. J., et al., (2009). Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 54 (1): 147 - 163.
- GEORGHIOU, G.P; C.E. TAYLOR (1986). Factors influencing the evolution of resistance. **National Academy Press**, 1 (1): 157-169.
- GONZÁLEZ-CABRERA, J., et al., (2003). Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 33 (9): 929 - 935.
- GORDON, et al., (1973). The genus *Bacillus*. **Procyotes** Cap 4, pp. 530-562.
- GORE J, et al., (2003). Distribution of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie), injured reproductive structures on genetically engineered *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner cotton. **Journal of Economic Entomology** 96 (3): 699-705.
- GOULD F; A. ANDERSON (1997). Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 endotoxin on growth, behavior and fitness of susceptible and toxin adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology** 20 (1): 30-38
- GOULD, F. (1998). Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology** 43 (1): 701 - 726.
- GOULD, F; B. E. TABASHNIK, (1998). Bt-cotton resistance management. In Risseler, J (Ed.) Now or Never: Serious new plans to save natural pest control. Cambridge: Union of Concerned Scientists of USA.
- GOULD, F., A., et al., (1995). Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal Economic Entomology**, 88(1): 1545-1559

GOULD, F., et al., (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 89 (17): 7986 - 7990.

GOULD, F., et al., (1997). Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 94 (8): 3519 - 3523.

GREENE, G. L., N. C. et al., (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial mediu. **Journal of Economic Entomology**. 69 (4): 488-497.

GREENPLATE J., et al., (2003). Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal of Applied Entomology** 127 (6): 340-347.

GRIFFITTS, J. S; R. V. AROIAN, (2005). Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. **Bioessays** 27 (6): 614 - 624.

GROETERS, F. R., et al., (1993). Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** 86 (4):1035–39

GROETERS, F. R., et al., (1994). Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Evolution** 48 (1):197–201

GUNNING, R. V., et al., (2005). New resistance mechanism in *Helicoverpa* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology** 71 (5): 2558-2563.

GUTIERREZ, A. P., et al., (2006). Physiologically based demographics of Bt cotton pest interactions II. Temporal refuges, natural enemy interactions. **Ecological Modeling** 191 (3): 360-382.

HARPER, M. S; R.R GRANADOS. (1999). Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. **Tissue & Cell, Oxford**, 31(2): 202-211.

HARPER, M. S; T. L. HOPINKS. (1997). Peritrophic membrane structure and secretion in European corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). **Tissue & Cell, Ouxford**, 29 (2): 463-475.

HE, D. J., et al., (2001). Using F<sub>2</sub> genetic method of isofemale lines to detect the frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin from transgenic Bt cotton in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Cotton Science** 13 (1): 105 - 108.

HECKEL, D. G., et al., (2007). The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology** 95 (3): 192 - 197.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P., et al., (2009). Broad-spectrum cross resistance Broad-spectrum cross-resistance in *Spodoptera exigua* from selection with a marginally toxic Cry protein. **Pest Management Science** 65 (6): 645 - 650.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P., et al., (2010). Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS One**. 5 (9): e12795

HERRERO, S., et al., (2001). Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology** 67 (3): 1085 - 1089.

HERRERO, S., et al., (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. BMC. **Genomics** 6: 96.

HIGGINSON D. M., et al., (2005). Evolutionary trade-offs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: fitness cost affecting paternity. **International Journal of Organic Evolution** 59 (4): 915-920.

HOSSAIN F., et al., (2004). Genetically modified cotton and farmers' health in China. **International journal of occupational** 10 (3): 296-303

HUANG, F. N., et al., (2008). Allele frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab corn in Louisiana populations of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology** 101 (2): 492–498.

HUANG, F. N., et al., (2011). Success of the high dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 140 (1): 1-16.

HUANG, F. N., et al., (2012). Extended monitoring of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab maize in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **GM Crops Food**. 3(1): 245-254.

HUANG, F., et al., (1999a). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. **Science** 284(5416): 965 - 967.

HUANG, F., et al., (1999b). Heritability and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera; Pyralidae). **Bulletin of Entomological Research** 89 (5): 449 - 454.

HUANG, F., et al., (2002). Survival of Kansas dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt and non-Bt corn hybrids. **Journal of Economic Entomology** 95 (3): 614-621.

HUANG, F., et al., (2007). Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. **Journal of Economic Entomology** 100(1): 164-171.

HUANG, J., et al., (2005). Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China. **Science** 308(5722): 688-690.

IBRAHIM, J. M., et al., (2016). Advances of transgenic Bt-crops in insect pest management: An overview. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. 4(3): 48-52.

IBRAHIM, M. A., et al., (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics

perspective. **Bioengineered Bugs** 1 (1): 31 - 50.

IMAI, K.; Y. MORI,. (1999). Levels, inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* formulation in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Thailand. **Applied Entomology and Zoology** 34 (1): 23–29

JACKSON, R. E, et al., (2007). Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein vip3A. **Journal of Economic Entomology** 100 (1): 180-186.

JACKSON, R. E., et al., (2006). Genetic variation for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. **Journal of Economic Entomology** 99 (5): 1790-1797.

JANMAAT, A. F; J. MYERS, (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 270 (1539): 2263 - 2270.

JIN, L., et al., (2013). Dominant resistance to Bt cotton and minor cross-resistance to Bt toxin Cry2Ab in cotton bollworm from China. **Evol. Appl.** 6(1): 1222-1235.

JOHNSON D. E; W. H. McGAUGHEY, (1996). Natural mortality among Indianmeal moth larvae with resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 68 (2):170–72

JOHNSON M. T., et al., (1997). Effects of natural enemies on relative fitness of *Heliothis virescens* genotypes adapted and not adapted to resistant host plants. **Entomologia experimentalis et applicata**. 82 (2):219–30

JUDY, K. J; L. I. GILBERT. (1970). Histology of the alimentary canal during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* L. **J. of Morphol.** 131: 277-300.

JUDY, K. J; L. I. GILBERT. (1969). Morphology of the alimentary canal during the metamorphosis of *Hyalophora cecropia* L. **Ann, Entom. Soc. Amer.** 62: 1438-1446.

JURAT-FUENTES, J. L., et al., (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS One**. 6: e17606.

JURAT-FUENTES, J.L., et al., (2003). Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. **Applied and Environmental Microbiology**. 69(10): 5898-5906.

KAIN W. C., et al., (2004). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in a greenhouse-derived strain of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomologic**, 97(6):2073-2078.

KHAJURIA, C., et al., (2011). Identification of a Novel Aminopeptidase P-Like Gene (OnAPP) Possibly Involved in Bt Toxicity and Resistance in a Major Corn Pest (*Ostrinia nubilalis*). **PLoS One**. 6: e23983.



KHETAN, S. (2001). Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. **Microbial Pest Control**: 14.

KLOWDEN, M. J. (2002). Physiological systems in insects. New York, **Academic Press**. 415p.

KRANTHI, K. R., et al., (2006). Inheritance of resistance in Indian *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Crop Prot.** 25(1), 119–124.

KRUGER, M., et al., (2011). Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. **Environmental Entomology** 40 (2): 477 - 483.

LEE, M. K., et al., (1995). Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Applied and Environmental Microbiology** 61 (11): 3836 - 3842.

LELLO, E; A. M. VIEIRA (2001). Desenvolvimento pós-embriônico do intestino médio de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Diptera:Cuterebridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 18: 91-98.

LEMESLE, V.; et al., (2010). Role of spatial and temporal refuges in the evolution of pest resistance to toxic crops. **Acta Biotheoretica**. 58 (2): 89-102.

LEPPLA, N. C. (1976). Circadian rhythms of locomotion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, 69 (1): 45-48.

LEVY, S. M. (2005). Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP**. Campus de Botucatu, Botucatu.

LEVY, S. M., et al., (2004). The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Braz. J. Biol.** 64: 633-638.

LEVY, S.M. et al., (2005). Morfologia do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*, susceptível e resistente ao vírus da poliedrose nuclear (AgMNPV), em larvas controle e infectadas pelo vírus. **Simpósio de Controle Biológico**, 4: 188.

LI, G., et al., (2007). Increasing tolerance to Cry1Ac cotton from cotton bollworm was confirmed in Bt cotton farming area of China. **Ecological Entomology** 32 (4): 366-375.

LI, H., et al., (2004). Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis* resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Insect biochemistry and insect molecular biology** 34 (8): 753 - 762.

LI, J., et al., (1996). Structure of the mosquitocidal deltaendotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation **Journal of**

**Molecular Biology** 257 (1): 129 - 152.

LIANG G. M., et al., (2007). Diapause, cold hardiness and flight ability of Cry1Ac resistant and -susceptible strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology's** 104 (1): 699–704

LIANG, G.-M., et al., (2008). Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. **Journal Invertebrate Pathology**, 97(1): 142–149.

LIU, F., et al., (2010). Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science** 66 (2): 155 - 161.

LIU, Y. B.; B. E. TABASHNIK., (1997). Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series B, London. 264(1381):605-610.

LIU, Y. B., et al., (1996). Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** 89 (4): 798–804.

LU, M. G., et al., (2004). Selection and heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and transgenic cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science** 60 (9): 887-893.

MA, G., et al., (2005). Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 35 (7): 729 - 739.

MACRAE, T. C., et al., (2005). Laboratory and field evaluation of transgenic soybean exhibiting high dose expression. Of synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**. 98 (2):577-587.

MAHON, R. J., et al., (2007). Frequency of alleles conferring resistance to the Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 100 (6): 1844 - 1853.

Mahon, R.J., K.M. et al., (2007). Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. **Journal Economic Entomology**, 100(1), 894–902.

MALLET, J; , J. PORTER (1992). Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? **Biological Sciences** 250 (1): 165-169.

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C., et al., (1999). Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science and Technology** 9 (1): 239 - 246.

MATHUR, L. M. L. 1972. Developmental changes in the alimentary canal of *Prodenia litura* Fabr. (Lepidoptera). **J. Nat. Hist.** 6: 39-46.

MATTEN S. R., et al., (2008). How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs, in Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs, (Eds) ROMEIS J., SHELTON A.M; KENNEDY G.G. **Springer**: pp. 27-39.

MCGAUGHEY W. H; D. E. JOHNSON., (1987). Toxicity of diferente serotypes and toxins of *Bacillus thuringiensis* to resistant and susceptible Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal Economic Entomology.** 80(1): 112-1126.

MCGAUGHEY W. H; R.W. BEEMAN. (1988). Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pylidae). **Journal of Economic Entomology.** 81(1): 28-33.

MCGAUGHEY, W. H. (1985). Insect Resistance to the Biological Insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science** 229 (4709): 193 - 195.

MCPHERSON, R. M; T.C. MACRAE. (2009). Evaluation of transgenic soybean exhibiting gigh expression. Of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A trangene for suppressing lepidopteran populations densities and crop injury. **Journal of Economic Entomology.** 102(4): 1640-1648.

MEISSLE, M., et al. (2010). Pest, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. **Journal of Applied Entomology**, 134 (5): 357–375.

MIKLOS, J. A., et al., (2007). Characterization of soybean exhibitng high expression. Of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A transgene that conferes a high dregree of resistance to lepidopteran pest. **Crop Science.** 47(1): 148-157.

MOAR, W. et al., (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C Resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl. Eviron. Microbiol.** 61 (1): 2086-2092.

MOAR, W., et al., (2008). Field-evolved resistance to Bt toxins. **Nature Biotechnology** 26 (1): 1072 - 1074.

MONNERAT, R., et al., (2015). Evidance of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **Plos One.** 10(4): 119544.

MOSCARDI, M. L. (2014). Passagens sequenciais do múltiplo nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae): mortalidade e aspectos morfológicos do intestino médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae). **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.**

MÜLER-COHN, J., et al., (1996). *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to

CryIC and crossresistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **Journal of Economic Entomology** 89 (1): 791-797.

NAIR, R., et al., (2013). Variation in the cadherin gene sequence of Cry1Ac susceptible and resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and the identification of mutant alleles in resistant strains. **Current Science**. 104(2): 215-223.

NEGREIRO M.C. et al., (2004). Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina Ciências Agrárias**, 25 (4): 293-308.

OKUDA, K. et al., (2007). Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, 53: 1307-1315.

OMOTO, C., et al., (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, 72(9):1727-1736.

OPPERT et al., (2000). Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. **Entomologia experimentalis et applicata** 96 (3): 281-287.

OPPERT, B., et al., (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Biological Chemistry** 272 (38): 23473 - 23476.

PARDO-LÓPEZ, L., et al., (2012). *Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **Microbiology Ecology** 37 (1): 3-22.

PEREZ, C. J., et al., (1996). Effects of application technology and *Bacillus thuringiensis* subspecies on management of *B. thuringiensis* subsp. kurstaki-resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** 88 (1):1113–19

PINHEIRO, D. O., et al., (2008). Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Neotropical Entomology**. 37: 413-419.

RAHMAN, M. M., et al., (2004). Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 101 (9): 1696 - 1699.

RAHMAN, M. M., et al., (2007). Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Electronic Biotechnology**, 10 (2): 241-251.

RAMACHANDRAN, S., et al., (1998a) Movement and survival of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae in mixtures of nontransgenic and transgenic canola containing a cryIA (c) gene of *Bacillus thuringiensis*. **Environmental Entomology** 27 (3): 649-656.

RAMACHANDRAN, S., et al., (1998b). Survival, development, and oviposition of resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology** 91(6): 1239-1244.

- RAYMOND, B., et al., (2005). Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272 (1571): 1519–24
- RAYMOND, B., et al., (2007). Exploiting pathogens and their impact on fitness costs to manage the evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Ecology* 44 (4): 768–80
- RAYMOND, B., et al., (2006). The compatibility of a nucleopolyhedrosis virus control with resistance management for *Bacillus thuringiensis*: co-infection and cross-resistance studies with the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology* 93 (2):114–20
- RIBEIRO, A. F., et al., (1997). Morphological basis of digestion in insects. *Acta Microscopia*, 6: 71-73.
- ROUSH, R. T. (1994). Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays? *Biocontrol Science and Technology* 4 (1): 501 - 516.
- ROUSH, R. T; E. A. M. SHELTON., (1997). Assessing the odds: The emergence of resistance to Bt transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 15(9): 816-817.
- ROUSH, R. T; J. A. MACKENZIE, (1987). Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology*. 32 (1): 361-380.
- ROUSH, R.T; J.C. DALY. (1990). The role of population genetics in resistance research and management, pp 97- 152. In R.T. Roush & B.E. Tabashnik (eds.), *Pesticide resistance in arthropods*. New York, **Chapman and Hall**, p. 303
- RYERSE, J. S., et al., (1992). Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue & Cell*. 24: 751-771.
- SALVADOR, M. C. (2008). Efeito de genótipos de soja e flavonoides na biologia e no intestino médio de *Anticarsia gemmatilis* . 2008. **Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal. 116p.**
- SANAHUJA, G., et al., (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9 (1): 283 - 300.
- SANTOS, C. D., A. et al., (1984). The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnyis ello*). Ultrastructure, fluid fluxes, the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue res*. 237: 565-574.
- SAYYED A. H., et al., (2003). Inheritance of resistance to Bt canola in a field-derived population of *Plutella xylostella*. *Pest Management Science* 59 (11): 1197-1202.
- SAYYED A. H., et al., (2004). Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*.

**Applied and Environmental Microbiology** 70 (12): 7010–7017

SAYYED, A. H., et al., (2000). Mode of inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a diamondback moth (*Plutella xylostella*) population from Malaysia. **Pest Management Science** 56 (9): 743–48

SAYYED, A. H., et al., (2001). Susceptibility of a field-derived, *Bacillus thuringiensis*-resistant strain of diamondback moth to in vitro-activated Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology** 67 (9): 4372 - 4373.

SAYYED, A. H., et al., (2005). Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. **Applied and Environmental Microbiology** 71 (11): 6863 - 6869.

SAYYED, A. H., et al., (2008). Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-Bt insecticides in the diamondback moth. **Pest Management Science** 64 (8): 813 - 819.

SAYYED, A. H., et al., (2000). Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 1509-1516.

SAYYED, A. H.; D.J. WRIGHT, (2001). Fitness costs and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Ecological Entomology** 26 (1): 502-508.

SCUDELER, E. L. (2012). Efeito do óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no intestino médio de *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae): Estudo citoquímico, imunocitoquímico e ultraestrutural. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 228p.**

SHIRAI Y., et al., (1998). Low intrinsic rate of natural increase in Bt-resistant population of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology** 42 (2): 59–64

SIEGFRIED, B. D; R.L. HELLMICH, (2012). Understanding successful resistance management: the European corn borer and Bt corn in the United States. **GM Crops Food**. 3 (3): 184 - 93.

SIQUEIRA, H. A., et al., (2006). Analyses of Cry1Ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). **Appl. Environ. Microbiol.** 72 (8): 5318 - 5324.

SISTERSON, M. S., et al., (2005). Evolution of resistance to transgenic crops: interactions between insect movement and field distribution. **Journal of Economic Entomology** 98(6): 1751-1762.

SOBERÓN, M., et al., (2007). Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. **Science** 318 (5856): 1640 - 1642.

SOBERÓN, M., et al., (2009). Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences** 66 (8): 1337-1349.

SOSA-GÓMEZ, D. R; J. E. MIRANDA. (2012). Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) **Revista Brasileira de Entomologia** 56(3): 359-362.

SOSA-GÓMEZ, D. R. (2004). Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology** 27 (3): 378-384.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al., (2014). Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. **Embrapa Soja**

SOUSA, M.E. (2009). Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) midgut. **Micron**, 40: 743-749.

SPENCE, K.D; M.Y. KAWATA. (1993). Permeability characteristics of the peritrophic membranes of *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology** 39: 785–790.

STEWART, C. N., et al., (1996). Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* CryIAc gene. **Plant Physiology** 112 (1): 115-120.

STEWART, S., et al., (2001). Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. **Journal of Economic Entomology** 94 (3): 752-760.

STONE, T. B., et al., (1989). Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. **Journal of Invertebrate Pathology** 53 (2):228–34

STORER, N. P., et al., (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology** 103 (4): 1031 - 1038.

TABASHNIK, B. E., et al., (2000). Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 97(1): 12980-12984.

TABASHNIK B, et al., (2002) Control of Resistant Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by Transgenic Cotton That Produces *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab. **Applied and Environmental Microbiology** 68 (7714): 3790-3794.

TABASHNIK, B, E., et al., (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nat. Biotechnol.** 31(1): 510-521.

TABASHNIK, B, E., et al., (2014). Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal Economic Entomology**. 107(1): 496-507.

TABASHNIK, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, 39 (1): 47 - 79.

TABASHNIK, B. E., et al. (2010). Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. **Nature Biotechnology** 28 (12): 1304–1307

TABASHNIK, B. E., et al., (1990). Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** 83 (5): 1671 - 1676.

TABASHNIK, B. E., et al., (1997). Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 94 (24): 12780 - 12785.

TABASHNIK, B. E., et al., (1998). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353 (1376): 1751 - 1756.

TABASHNIK, B. E., et al., (2005). Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102 (43): 15389-15393.

TABASHNIK, B. E., et al., (2008). Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology** 26 (2): 199 - 202.

TABASHNIK, B. E., et al., (2009). Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology** 102 (6): 2011 - 2025.

TABASHNIK, B. E., et al., (2011). Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. **Nature Biotechnology** 29 (12): 1128-1131.

TABASHNIK, B. E., et al., (2004). Velaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. *Journal of Evolutionary Biology*. 17(2):904-912.

TABASHNIK, B. E., et al., (1994). Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the diamondback Moth (*Plutella xylostela*). **Appl. Environ. Microbiol.** 60(1): 4627-4629.

TABASHNIK, B. E., et al., (1997). Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proc. Natl. Sci.** 94(1): 12780-12785.

TABASHNIK, B. E., et al., (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**. 82(1): 1671-1676.

TAMEZ-GUERRA P., et al., (2006). Differences in susceptibility and physiological fitness of Mexican field *Trichoplusia ni* strains exposed to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology** 99 (3): 937–945

TANG, J. D., et al., (1997). Inheritance, stability, and lack of fitness costs of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida. **Journal of Economic Entomology** 90 (3):732-741.

TERRA, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and



peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 47-61.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). (2015). USDA Agricultural Projections to 2024. <http://www.ers.usda.gov/media/1776036/oce151.pdf>

UYENOYAMA, M.K. (1986). Pleiotropy and the evolution of genetic systems conferring resistance to pesticides, pp 207-221. In: National Research Council. Pesticide resistance: strategies and tactics for management. Washington, **National Academy Press**, p. 471

VAECK, M., et al., (1987). Transgenic plants protected from insect attack. **Nature** 328: 33 - 37.

VAN RENSBURG, J. B. J. (2007). First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller), to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil.** 24 (3):147-151.

VILARINHO, E. C. (2007). Marcação de *Diatraea saccharalis* (fabr) (Lepidoptera: Crambidae) e dispersão de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Tese Doutorado. Universidade Estadual Paulista.**

WANDERLEY-TEIXEIRA, V., A. et al., (2006). Histological description of the mudgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Braz. J. Biol.** 66: 1045-1049.

WANG, P; R.R. GRANADOS, (2001). Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology.** 47 (2): 110–118, 2001.

WANG, P., et al., (2007). Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology** 73 (4): 1199 - 1207.

WANG, P., et al., (2012). Increased frequency of Pink bollworm resistance to Bt toxin Cry1Ac in China. **Plos One.** 7(1) 29975.

WOOD, A. R; M. J. LEHANE. (1991). Relative contributions of apocrine and eccrine secretion to digestive enzyme release from midgut cells of *Stomoxys calcitrans* (Insecta: Diptera). **Journal of Insect Physiology**, 37: 161-166.

WU, K., et al., (2002). Evaluation of the natural refuge function for *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) within *Bacillus thuringiensis* transgenic cotton growing areas in north China. **Journal of Economic Entomology** 95(4): 832-837.

WU, K., et al., (2005). Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China. **Pest Management Science** 61(5): 491-498.

WU, K., et al., (2006). Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt insecticidal protein during 2001-2004 in China. **Journal of Economic Entomology** 99(3): 893-898.

WU, K; Y. GUO, (2003). Influences of *Bacillus thuringiensis* Berliner cotton planting on population dynamics of the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover, in Northern China. **Environmental Entomology**. 32 (2): 312-318.

WU, X., et al., (2009). Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 102 (1): 44 - 49.

WU, Y., J.M. et al., (2009). A single linkage group confers dominant resistance to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. **Journal Applied Entomology**, 133(1): 375–380.

XIAO, Y., et al., (2014). Mis-splicing of ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. **Sci. Rep.** 4: 6184.

XU, X.; Y. WU, (2008). Disruption of Ha-BtR alters binding of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac to midgut BBMV of *Helicoverpa armigera*. **Journal of Invertebrate Pathology** 97 (1): 27 - 32.

YANG, Y., et al., (2010). Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and - resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 40 (8): 592 - 603.

YANG, Y., et al., (2011). Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **PLoS One** 6 10): e25783

YU, S. J. (2008). The toxicology and biochemistry of insecticides. **CRC Press**, 2 edition 115-142

ZHANG T., et al., (2004). Inheritance patterns, dominance and cross-resistance of Cry1ab- and Cry1Ac-selected *Ostrinia furnacalis* Guenée). **Toxins**, 6(1):2694-2707.

ZHANG, H., et al., (2011). Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. **Plos One**. 6 (1): 22874.

ZHANG, H., et al., (2014). Inheritance Patterns, Dominance and Cross-resistance of Cry1Ab- and Cry1Ac- selected *Ostrinia furnacalis* (Guenée). **Toxins**. 6(1): 2694-2707.

ZHANG, S., et al., (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 39 (7): 421 - 429.

ZHAO, J. Z., et al., (2000). Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. **Applied Environmental Microbiology**. 66 (9): 3784-3789.

ZHAO, J. Z., et al., (2005). Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences** 102 (24): 8426-8430.

ZHAO, X. C, et al., (2008). Altered mating behaviour in a Cry1Ac-resistant strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology** 132 (5): 360–365

ZHAO, Z., et al., (2016). Identification of ABCC2 as binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. **Microbiology Open**. pp. 1-11.