



CONSTANTINO TOMÁS SENETE

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DA
LAGARTA-DO-CARTUCHO AO MILHO
EXPRESSANDO PROTEÍNAS Cry1A.105 e
Cry2Ab2**

LAVRAS - MG

2016

CONSTANTINO TOMÁS SENETE

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DA LAGARTA-DO-
CARTUCHO AO MILHO EXPRESSANDO PROTEÍNAS Cry1A.105 e
Cry2Ab2**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção de título de Doutor.

Orientador

Dr. João Cândido de Souza

Coorientadores

Dra. Simone Martins Mendes

Dra. Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Senete, Constantino Tomás.

Controle genético da resistência da lagarta-do-cartucho ao milho
expressando proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 / Constantino Tomás
Senete. – Lavras : UFLA, 2016.

81 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): João Cândido de Souza.

Bibliografia.

1. Herdabilidade.
2. *Spodoptera frugiperda*.
3. Ganho com seleção.
4. Valor genotípico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CONSTANTINO TOMÁS SENETE

**CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA DA LAGARTA-DO-
CARTUCHO AO MILHO EXPRESSANDO PROTEÍNAS Cry1A.105 e
Cry2Ab2**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção de título de Doutor.

APROVADA em 11 de março de 2016.

Dr. José Airton Rodrigues Nunes	UFLA
Dr. Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães	Embrapa Milho e Sorgo
Dra. Rosângela Cristina Marucci	UFLA
Dra. Simone Martins Mendes	Embrapa Milho e Sorgo

Dr. João Cândido de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2016**

Aos meus pais Carolina Chuquela e Tomás Senete, pela educação, apoio e amor incondicional durante toda a minha vida.

À minha esposa Florinda Ezequias Avela, pelo amor, compreensão e companheirismo.

Aos meus filhos Némesis, Edinélio e Gleidson e, a minha sobrinha Júlia pelo amor, amizade e alegria.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade concedida.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique e ao governo da República de Moçambique, pela liberação e todo o apoio prestado durante o tempo que durou o doutorado.

Ao professor João Cândido de Souza, à Dra Simone Martins Mendes e ao Dr. Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães pela orientação e agradável convivência durante o doutorado. Agradecimento é extensivo ao Dr. Rafael Major Pitta da Embrapa Agrossilvipastoril, pela ajuda na coleta de uma população da lagarta-do-cartucho em Sinop – MT.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e valiosas sugestões apresentadas na melhoria do presente trabalho e aos professores do curso de genética e melhoramento de plantas, Elaine, Flávia, João Bosco, João Cândido, Magno e José Airton, pelos ensinamentos transmitidos e agradável convivência.

Aos amigos queridos e companheiros do setor de milho, Márcia, Maria Biatriz, Carlos Henrique, Ana Izabella, Kaio, José Maria e demais amigos do GEN.

Aos amigos e colegas do laboratório, Alice Emanuele, Ana Carla, Adriano, Amanda, Ademilson, Camila, Clara, Estáquio, José Carlos, Lorena, Michele Rocha, Nathalia e Yuri, pelo apoio constante, colaboração e amigável convivência. Saudades!

Aos amigos Carlos Balate, Jenny Boane, Joaquim Uate, Gonçalves “Ndjito”, Elaine Leite e Nonoty.

Um agradecimento especial a Oflia Tamele e ao Joel Nuvunga que sempre estiveram por perto para em todos os momentos que precisei.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos na realização deste trabalho. Meu MUITO OBRIGADO!!!

“Semente

No início,
eu queria um instante.

A flor.

Depois,
nem a eternidade me bastava.

E desejava a vertigem
do incêndio partilhado.

O fruto.

Agora,
quero apenas
o que havia antes de haver vida.

A semente.”

Mia Couto

RESUMO

A espécie *Spodoptera frugiperda* é considerada um dos insetos pragas mais destrutivos da cultura de milho nas Américas. Um experimento com famílias de irmãos germanos e outro com populações foram conduzidos separadamente, em laboratório, com objetivos de estudar herdabilidade e respostas da seleção preditas, e, realizadas em caracteres ligados a resistência deste inseto, as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2. Tanto num como noutro experimento, as lagartas foram alimentadas com folhas de milho expressando as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 até alcançar a fase de pupa. Quando os adultos emergiram, foram contabilizadas as porcentagens de sobreviventes de cada geração. No experimento para a predição da herdabilidade foram formadas progênies de irmãos germanos, a partir de uma população coletada em Sinop – MT enquanto que para os ganhos realizados, foram usadas duas populações, uma já mencionada anteriormente e outra coletada em Sete Lagoas - MG. Por se tratar de dados de sobrevivência (proporção de indivíduos sobreviventes em função de proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2) e com muito desbalanceamento, para este caráter foi considerado o modelo linear generalizado e uma distribuição binomial. Para os outros caracteres, a análise considerou distribuição normal. A maior proporção da variabilidade observada nestas progênies, avaliadas para a sobrevivência na pressão da seleção com as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, expressas em milho, ocorreram em virtude de causas genéticas. Foram observadas herdabilidade de grande magnitude para todas as características avaliadas. Na predição da herdabilidade e de ganho por seleção, foi verificada boa confiabilidade na avaliação e na predição dos parâmetros genéticos (alta acurácia), uma relação linear entre a sobrevivência e outros caracteres (período larval, período letal e biomassa de pupa) e com isso a resposta à seleção foi influenciada para estes caracteres, tendo sido de cerca de seis dias para o período larval e cerca de 10 miligramas para biomassa de pupa. A resposta à seleção para sobrevivência foi de 3,17%. Na estimativa para a resposta a seleção realizada, a população coletada em Sinop - MT apresentou alto potencial para proporcionar descendência adaptada às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, contrária a população coletada em Sete Lagoas.

Palavras-chave: Herdabilidade. *Spodoptera frugiperda*. Ganho com seleção. Valor genotípico.

ABSTRACT

The *Spodoptera frugiperda* species is considered one of the most destructive insect pests of maize crop in the Americas. Experiment with full-sib progenies and another with two populations were conducted separately in the laboratory. The experiment aims to study the predicted heritability and responses to selection realized on characters associated to resistance of this insect to the Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins. In both experiments larvae were fed with maize leaves expressing Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins until it reaches the pupal stage. When the adults emerged it was recorded percentages of survivors of each generation. In the experiment for the prediction of heritability, full-sib progenies were formed from a population collected in Sinop - MT while for the gains it was used two populations, one already mentioned and the other collected in Sete Lagoas - MG. Because it is survival data (proportion of individuals surviving in function of Cry1A. 105 and Cry2Ab2 proteins) and very unbalanced data, for this character was considered the generalized linear model and a binomial distribution. For other characters the analysis considered normal distribution. The largest proportion of the variability observed in these progenies for survival in the selection pressure with the Cry1A. 105 and Cry2Ab2 proteins were expressed in maize due to genetic causes. Large magnitude of heritability was observed for all evaluated characteristics. The prediction of heritability and selection gain was observed good reliability in the evaluation and prediction of genetic parameters (high accuracy), a linear relationship between survival and other characters (larval period, lethal period and pupa biomass) and with it the response for the selection was influence for these characters, having about six days for larval period and about 10 milligrams for pupae biomass. The response to selection for survival was 3.17%. The estimate for the response to selection made in the population collected in Sinop - MT showed high potential to provide offspring adapted to Cry1A. 105 and Cry2Ab2 proteins contrary the population collected in Sete Lagoas -MG.

Keywords: Heritability. *Spodoptera frugiperda*. Selection gain. Genotypic value.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Resposta à seleção para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa em função da proporção dos indivíduos selecionados. Sete Lagoas – MG, 2015.....48

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Porcentagem de Sobrevivência (\pm intervalo de confiança) de *Spodoptera frugiperda* por população em função dos ciclos seletivos em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 2015.....68
- Figura 2 Período de desenvolvimento larval (\pm intervalo de confiança) da *Spodoptera frugiperda* por população em função dos ciclos seletivos com proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 2015.....69
- Figura 3 Biomassa de pupa (\pm Intervalo de confiança) da *Spodoptera frugiperda* por população em função dos ciclos seletivos em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 201570
- Figura 4 Resposta a seleção para porcentagem de sobrevivência de populações de *Spodoptera frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 201571
- Figura 5 Resposta a seleção para o período de desenvolvimento larval em populações *Spodoptera frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 201572
- Figura 6 Resposta a seleção para biomassa de pupa nas duas populações de *Spodoptera frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas-MG, 201573

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1 Alguns eventos com proteínas do *Bacillus thuringiensis* expressas em milho geneticamente modificado liberado para o cultivo no Brasil entre os anos 2007 -201519

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Estimativa de componentes de variâncias para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa da população de *Spodoptera frugiperda* coletada em Sinop MT, sob seleção em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, expressas em milho. Sete Lagoas-MG, 2015.....42
- Tabela 2 Valores genotípicos para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa da população de *Spodoptera frugiperda* coletada em Sinop – MT sob seleção em proteínas Cr1A. 105 e Cry2Ab2 expressas em milho. Sete Lagoas-MG, 2015.....44
- Tabela 3 Médias genotípicas para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa da população de *Spodoptera frugiperda* coletada em Sinop – MT, sob seleção em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 expressas em milho. Sete Lagoas-MG, 201547

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Lagarta-do-cartucho no milho	16
2.2	Milho com eventos transgênicos para resistência a insetos	17
2.3	Manejo da resistência de insetos	20
2.4	Herança da resistência da <i>S. frugiperda</i> à proteína Cry	21
2.5	Teste de progênes	23
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS	26
	CAPÍTULO 2 Predição de parâmetros genéticos para caracteres associados à resistência da lagarta-do-cartucho às proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 expressas em Milho.....	30
1	INTRODUÇÃO	31
2	MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1	Coleta de insetos	34
2.2	Progênes de irmãos-germanos	34
2.3	Milho expressando proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2	35
2.4	Condução do experimento	35
2.5	Análise estatística	36
3	RESULTADOS	41
4	DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54
	CAPÍTULO 3 Evolução da resistência de populações de lagarta-do-cartucho em seleção com proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2.....	58
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.1	Coleta de insetos	61
2.2	Dinâmica dos ciclos seletivos	62
2.3	Milho expressando proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2	62
2.4	Condução do experimento	63
2.5	Análise estatística	64
3	RESULTADOS	67
4	DISCUSSÃO	75
5	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Um dos estresses bióticos comprometedores do rendimento do milho nas lavouras é a incidência de pragas. Dentre as mais prejudiciais para a cultura de milho, está a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Esta praga é considerada a mais prejudicial no Brasil para a cultura de milho, pois ataca as plantas tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva (AFONSO et al., 2013; OTA et al., 2011).

As novas ferramentas usadas no campo da engenharia genética e da biotecnologia moderna tem permitido o desenvolvimento de alternativas para viabilizar um emprego mais amplo do controle genético de pragas nas culturas. Dentre elas, destaca-se a possibilidade de obtenção e uso de plantas geneticamente modificadas que contém genes codificadores das endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (MORAIS; PINHEIRO, 2012; MUGO et al., 2011).

Os níveis e localização da expressão dos genes bt na planta transformada podem ser regulados, permitindo a presença da toxina em toda a planta ou somente nas partes relevantes, dependendo dos hábitos de ataque da praga (ARAÚJO et al., 2011).

Uma das maiores preocupações no uso do milho Bt é a resistência dos insetos resistentes o que pode reduzir a vida útil da tecnologia. Isto ocorre pela seleção de indivíduos resistentes que, com a eliminação dos indivíduos susceptíveis da população, têm maiores chances de se reproduzir e passar esta característica a seus descendentes (ATSUMIA et al., 2012; JANMAAT et al., 2004; PEREIRA et al., 2010; YE et al., 2012).

Tabashnik, Brévault e Carrière (2013) analisaram resultados de 77 estudos de monitoramento de resistência em campo de culturas Bt, com milho e algodão, que expressam as proteínas Cry (Cry1Ab, Cry3Bb, Cry1Ac, Cry1F e Cry2Ab), realizados nos cinco continentes, e, observaram que, embora a maioria das populações de pragas, incluindo *S. frugiperda*, permaneça suscetível a eficácia de culturas Bt ficou reduzida em função da resistência desenvolvida em campo. Cinco, das 13 espécies de pragas estudadas apresentaram resistência em campo. Estudo anterior realizado em 2005 apresentou apenas uma espécie.

Resistência desenvolvida em campo pela *S. frugiperda* ao milho Bt expressando Cry1F, ocorreu em três anos nos territórios de Puerto Rico, nos Estados Unidos da América. Este é o mais rápido caso documentado de resistência desenvolvida em campo Cry1F, reduzindo a eficácia da tecnologia. Também é o primeiro caso de resistência que levou à retirada de uma cultura Bt do mercado. A resistência de campo para o milho Bt expressando Cry1Ab ocorreu em *Busseola fusca* na África do Sul em oito anos. Outros casos relatados ocorreram no algodão na China e na Austrália (DOWNES; MAHON, 2012; STORER et al., 2010; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013; TABASHNIK; WUB; WU, 2012).

Dados de 77 estudos publicados a partir de 2012 relatam as primeiras análises estatísticas da associação entre padrões observados de resistência desenvolvida em campo e efeitos previstos de dois principais parâmetros biológicos: dominância da resistência e da frequência inicial do alelo. Os resultados fornecem informações que podem ser usados de forma proativa para melhorar o manejo da resistência (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013).

Avanços no estudo dos mecanismos de resistência da lagarto-do-cartucho aos eventos transgênicos podem proporcionar uma introspecção sobre métodos para retardar ou superar a evolução da resistência das pragas a estes

eventos. Assim, o objetivo deste estudo é estudar a herança da resistência da lagarta-do-cartucho às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção é apresentada uma revisão da literatura que visa abordar os conceitos básicos sobre a biologia da lagarta do cartucho, das proteínas do *B. thuringiensis* e da resistência desta lagarta nestas proteínas, sua herança para as gerações vindouras e alguns métodos de dados para estudos de resistência.

2.1 Lagarta-do-cartucho no milho

A lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda*, também conhecida pelo nome de lagarta dos milharais, é uma espécie polífaga, ocorre em mais de 100 espécies de hospedeiros e uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil. Essa praga encontra-se distribuída em todas as regiões onde se cultiva esse cereal (WAQUIL et al., 2004).

É considerada uma das principais da cultura do milho, por atacar a planta durante todo o seu ciclo. As perdas na produção causada por este inseto-praga podem variar em função da cultivar e do estágio fenológico da planta, sendo mais sensível entre os estádios de 8 a 10 folhas completamente formadas (AFONSO et al., 2013; OTA et al., 2011).

As lagartas, logo que eclodem começam a raspar as folhas e à medida que as folhas vão se desenvolvendo, passam a perfurá-las, também costumam penetrar no colmo de plantas jovens, o que prejudica o desenvolvimento da planta, causando o sintoma de coração morto. Essa espécie também ataca as espigas resultando em má formação ou até mesmo a não formação dos grãos. Ocorrem também danos indiretos causados pelo ataque deste inseto, pois através da sua penetração deixam orifícios que são porta de entrada de fungos e bactérias, agentes estes causadores de várias doenças, diminuindo o potencial de produção e a qualidade de grãos (FIGUEIREDO et al., 2009; OTA et al., 2011).

As fêmeas adultas têm hábitos noturnos e podem ovipositar de 60 a 100 ovos, formando uma massa de ovos sobrepostos entre si que podem alcançar até três camadas. O período de incubação embrionária dos ovos varia de acordo com as condições de temperatura, podendo variar de dois a três dias. O período de desenvolvimento larval dura em média de 12 a 30 dias, período em que a lagarta se alimenta basicamente das folhas mais tenras. A larva completamente desenvolvida migra da planta para o solo, penetrando de 2,5 a 7,5 centímetros de profundidade, onde se transforma em pupa para se proteger. Todas as fases da vida da lagarta são influenciadas por fatores climáticos, podendo estes, encurtar ou prolongar determinadas fases (SARMENTO et al., 2002).

2.2 Milho com eventos transgênicos para resistência a insetos

O milho Bt é uma planta geneticamente modificada contendo o gene da bactéria *B. thuringiensis*. Essa bactéria produz uma proteína que forma e acumula cristais no interior da larva de alguns insetos quando ingerida, podendo causar a morte ao inseto (LOGUERCIO; CARNEIRO; CARNEIRO, 2002).

O *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva que produz cristais durante a sua fase estacionária de crescimento. Os cristais compreendem uma ou mais proteínas (codificadas pelos genes cry e cyt) que apresentam toxicidade específica contra diversas ordens de insetos, incluindo Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Homoptera, Orthoptera, Mallophaga e, também contra ácaros, nematoides e protozoários. Algumas estirpes de *B. thuringiensis* também segregam proteínas inseticidas vegetativas (VIP's) que mostram a atividade contra larvas de insetos lepidópteros (BOBROWSKI et al., 2003; WAQUIL et al., 2004; YE et al., 2012).

O fragmento ativo da proteína liga-se aos receptores específicos, localizados na membrana das células epiteliais do intestino médio (ligação ao

receptor). Estas proteínas ligadas formam canais de íões e/ou poros, levando a uma ruptura da membrana do intestino e eventual morte do inseto (LEE et al., 2003).

Existem mais de uma dezena de eventos transgênicos com resistência a insetos, mas entre os que estão sendo comercializados no Brasil, destacam-se os eventos que expressam as toxinas Cry1A(b) e Cry1F, Vip3A com atividade sobre os lepidópteros, e, o Cry3Bb1, para o controle de coleópteros (larvas de *Diabrotica spp.*). O evento contendo os genes Cry1A.105 e Cry2Ab2, que representa uma segunda geração de milho transgênico resistente a insetos. Este produz simultaneamente duas proteínas derivadas do *B. thuringiensis*, ativas contra algumas lagartas-praga (PITTA; DAL'MASO; MENDES, 2013; WAQUIL et al., 2004). Mais recentemente eventos piramidados expressando uma combinação de proteínas supracitadas estão no mercado. A seguir, se apresenta uma tabela que resume as proteínas que se expressam em eventos liberados no Brasil desde o ano de 2007, até o ano de 2015 (tabela 1).

Tabela 1 Alguns eventos com proteínas do *Bacillus thuringiensis* expressas em milho geneticamente modificado liberado para o cultivo no Brasil entre os anos 2007 -2015

Proteínas	Eventos									
	MON 810	Bt*	TC1507*	MON89034	MON88017*	MIR604	MON89034 & MON88017*	MIR162	TC1507 & MON810*	Bt11 & MIR162 & GA21*
Cry1ab	x	x								
Cry1F			X							
Cry3Bb1					x					
mcry3A						x				
VIP3Aa20								x		
Cry1F/Cry1Ab									x	
Cry1A. 105/Cry2Ab2				x						
Cry1Ab/VIP3Aa20										x
Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry3Bb1							x			

Eventos com * significa que para além de possuir proteínas com atividade inseticida possui outras proteínas com atividade não inseticida

Fonte, CNTbio, 2016

A bactéria *B. thuringiensis* possui em seu genoma uma classe de genes denominados cry, que produz na sua célula proteínas que são tóxicas para grupos específicos de insetos (LOGUERCIO; CARNEIRO; CARNEIRO, 2002; PEREIRA et al., 2010; YE et al., 2012).

Na membrana das células epiteliais do intestino do inseto, a interação toxina-receptor leva à formação de poros na membrana celular, o que altera o balanço osmótico das células epiteliais, que incham e sofrem rupturas, levando o inseto à morte por dificuldade de alimentação e infecção generalizada (septicemia) (LOGUERCIO; CARNEIRO; CARNEIRO, 2002; MICHELOTTO et al., 2011; PEREIRA et al., 2010).

As toxinas Cry têm sido classificadas de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos, na qual a denominação “Cry” apresenta quatro ranques hierárquicos de números e letras (maiúsculas e minúsculas), como por exemplo, Cry3Aa2. As proteínas Cry com cerca de 45% de homologia em sua sequência, são colocadas no primeiro ranque e quando apresentam 78 e 95% de identidade, constituem o segundo e terceiro ranque, respectivamente. Cinco blocos de sequências são comuns à maioria das proteínas Cry (PINTO et al., 2013).

2.3 Manejo da resistência de insetos

Uma das maiores preocupações no uso do milho Bt é a seleção de insetos resistentes que possam reduzir a vida útil da tecnologia. O fenômeno de seleção de insetos resistentes já está presente na agricultura. Isto ocorre pela seleção de indivíduos resistentes que, com a eliminação dos outros indivíduos susceptíveis da população, têm maiores chances de se reproduzir e passar esta característica a seus descendentes (MENDES et al., 2011; ZANCANARO et al., 2012).

Dentre várias estratégias utilizadas para o manejo do aparecimento desta resistência é a adoção de áreas de refúgio contendo milho convencional. Na prática, toda a área com milho Bt teria, obrigatoriamente, uma área anexa com milho convencional, isto é, sem o gene bt. Existem vários modelos que estão sendo aplicados nos países onde já se utiliza esta tecnologia (LEITE et al., 2011; MENDES et al., 2011).

A alta dose pode ser definida como a expressão gênica que resulta em altas concentrações da toxina Bt, nos tecidos das plantas, capazes de matar acima de 99% da população da espécie-alvo (LEITE et al., 2011).

A prevenção para o aparecimento de populações resistentes requer as seguintes condições: que tenha uma quantidade suficiente de insetos susceptíveis próximos às lavouras de milho Bt, e, que os insetos sobreviventes, resistentes, oriundos da área com milho Bt sejam raros. Estas duas condições são importantes para que o plano de manejo de resistência tenha êxito (PITTA; DAL'MASO; MENDES, 2013).

2.4 Herança da resistência da *S. frugiperda* à proteína Cry

A resistência de insetos aos eventos transgênicos pode ser um processo evolutivo afetado por fatores ligados à própria praga, tais como: ecológicos e comportamentais (taxa de reprodução, mobilidade/dispersão), genéticos (frequência inicial de genótipos resistentes na população, intensidade de seleção – proporção da população exposta em cada geração e o padrão da herança da resistência - valor adaptativo dos heterozigotos) e, outros vinculados às características intrínsecas da planta, as operacionais (uso de plantas transgênicas e estratégias de resistência) (MARTINELLI; OMOTO, 2005).

Fatores que podem contribuir significativamente para a elevada taxa de reprodução e dispersão pode ser a oferta de muitos hospedeiros ao longo do ano,

o que sempre torna disponível hospedeiro a cada momento e associado a isso, está o plantio em áreas próximas de diferentes culturas, com fenologia diferentes, facilitando de certo modo a dispersão deste inseto (BARROS; TORRES; BUENO, 2010).

Num trabalho visando estudar o movimento da *S. frugiperda* adultos, verificaram que os machos poderiam atingir uma distância máxima de 806 metros e fêmeas 608 metros (VILARINHO et al., 2011). Isto, por um lado pode ser bom porque pode reduzir a frequência do alelo favorável para a resistência se este movimento for favorável, mas também pode não ser, porque este movimento pode favorecer para o aumento da frequência deste alelo.

Esta espécie de inseto deposita seus ovos, mesmo em plantas comumente não hospedeiras, o que aumenta a frequência de postura. Associado a isso, a alta sobrevivência inicial da espécie em seus hospedeiros pode ser alta (BARROS; TORRES; BUENO, 2010).

A seleção de insetos resistentes está presente nas lavouras, uma vez que existe uma variabilidade genética natural para resistência do inseto aos eventos transgênicos. A frequência dos indivíduos resistentes aumenta, uma vez que estes têm maiores chances de se reproduzir e passar esta característica a seus descendentes, em detrimento dos susceptíveis que são cada vez eliminados pela ação do evento transgênico (ZANCANARO et al., 2012).

O conhecimento do padrão de herança da resistência permite avaliar o potencial de risco de evolução no campo. Nas situações em que a herança de resistência é controlada por um alelo recessivo, o resultado final é a baixa sobrevivência de indivíduos heterozigotos, porque estes se comportarão fenotipicamente como homozigotos susceptíveis. Por outro lado, a dominância do alelo que controla a resistência, resultaria numa alta sobrevivência dos indivíduos heterozigotos no campo. Assim, a mortalidade dos heterozigotos é um dos pontos fundamentais do manejo da resistência, pois os heterozigotos são

os principais veículos de transporte de alelos para as gerações vindouras (MARTINELLI; OMOTO, 2005).

O desenvolvimento do manejo da resistência começou ainda na era dos produtos químicos, quando se detectou os primeiros casos de evolução da resistência, por parte dos organismos-alvos (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001).

Tan e Mccaferry (1999) e YU (1993) comentam que a herança da resistência de *S. frugiperda* à piretróides não apresenta um padrão para lepidópteros. Contudo, Diez-Rodriguez e Omoto (2001) estudando a herança de resistência desta praga ao piretróide Lambda-Cialotrina, verificaram que a resistência é monogênica com dominância incompleta recessiva.

Com o advento das plantas transgênicas que expressam genes da bactéria *B. thuringiensis*, as pesquisas e os trabalhos nessa área continuaram a reportar casos de resistência (FARIAS et al., 2014; SANTOS-AMAYA et al., 2015; STORER et al., 2010). Muitos trabalhos sobre a resistência aos eventos transgênicos têm a ver com a proteína Cry1F, caracterizando-se como autossômicos e com dominância incompleta (SANTOS-AMAYA et al., 2015).

Resistência desenvolvida em campo pela *S. frugiperda* para o milho Bt produzindo Cry1F, ocorreu em três anos nos territórios de Puerto Rico nos Estados Unidos da América. Este é o mais rápido caso documentado de resistência desenvolvida em campo de cultura Bt reduzindo a eficácia da tecnologia. Também é o primeiro caso de resistência que levou à retirada de uma cultura Bt do mercado (STORER et al., 2012).

2.5 Teste de progênies

Em qualquer programa de melhoramento o objetivo principal é identificar os indivíduos superiores, capazes de transmitirem suas características

aos seus descendentes. Assim, avaliar a descendência torna-se numa das melhores formas de conhecer o valor genético do seu genitor.

No teste de progênies são avaliadas famílias de meios-irmãos, irmãos germanos e famílias endogâmicas. Com base no teste de progênies podem-se estimar parâmetros genéticos de importância para o melhoramento (CRUZ; CARNEIRO, 2006; VENKOVSKY; BARRIGA, 1992). No presente trabalho, tais parâmetros serão utilizados para aumentar o grau de compreensão da seleção da resistência de *S. frugiperda*.

A herdabilidade e a acurácia seletiva se destacam entre os parâmetros de importância genética no melhoramento. A herdabilidade estima a confiabilidade do valor fenotípico como indicador do valor reprodutivo. Participa das expressões relacionados com a predição de ganhos (RAMALHO et al., 2012) e a acurácia seletiva está associada à precisão da seleção e refere-se à correlação entre os valores genéticos preditos e valores genéticos verdadeiros (RESENDE, 2007; RESENDE; DUARTE, 2007). Desta forma, a estimativa de parâmetros genéticos possibilita o conhecimento do potencial evolutivo de uma população.

A predição da resposta à seleção possibilita aos melhoristas procurar alternativas para melhorar a eficiência do processo. Ou seja, a partir de progressos esperados, o melhorista possui ferramentas necessárias para julgar se o método é ou não promissor (RAMALHO et al., 2012; VENCOSVSKY; BARRIGA, 1992). No caso específico de resistência à insetos praga, à resposta à seleção poderá ser uma ferramenta bastante útil para medir a evolução da resistência das diversas pragas, à diferentes eventos transgênicos.

Esta abordagem usando progênies de irmãos germanos e meio irmãos, não é nova nas áreas de estudo de resistência de inseto- praga, pouco se encontra relatado na literatura (ALINIA; COHEN; GOULD, 2000; JANMAAT; MYERS, 2011).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe maior variabilidade nas populações avaliadas, e essa variabilidade é devida maioritariamente, à causas genéticas, o que poderá resultar na evolução da resistência dos insetos. A acurácia seletiva foi alta e muito alta, refletindo-se na qualidade de informação e procedimentos utilizados na predição dos valores genéticos. Foi observada uma relação linear, entre a sobrevivência e outros caracteres (período larval, período letal e biomassa de pupa). Assim, a seleção ocorrendo na sobrevivência influencia na resposta a seleção para os outros caracteres. A população coletada em Sinop - MT apresentou alto potencial para proporcionar descendência adaptada às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, contrário a população coletada em Sete Lagoas – MG. A metodologia proposta se mostrou adequada para o tipo de dados coletados e pode contribuir no poder de previsão dos métodos, para retardar ou superar a evolução da resistência dos insetos-praga às proteínas Bt.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. P. S. et al. **A lagarta do cartucho de milho**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/folder/a_lagarta_do_cartucho.pdf>. Acesso em: 19 set. 2013.
- ARAÚJO, L. F. et al. Flutuação populacional de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Doru luteipes* (Scudder) em milho convencional e transgênico Bt. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 10, n. 3, p. 205-214, 2011.
- ATSUMIA, S. et al. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Raleigh, v. 109, p. E1591–E1598, 2012.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.
- BOBROWSKI V. L. et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: Uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 843-850, 2003.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. v. 2, 585 p.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.
- DOWNES, S.; MAHON, R. Evolution, ecology and management of resistance in *Helicoverpa* spp. to Bt cotton in Australia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, n. 110, p. 281–286, 2012.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop protection**, Guildford, v. 64, p. 150-158, 2014.

FIGUEIREDO, M. L. C. et al. Interaction between baculovirus spodoptera and natural enemies on the suppression of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 8, n. 3, p. 207-222, 2009.

JANMAAT, A. F. et al. Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 70, n. 10, p. 5859–5867, 2004.

JANMAAT, A. F.; MYERS, J. H. Genetic variation in fitness parameters associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in male and female *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Philadelphia, v. 107, p. 27-32, 2011.

LEE, M. K. et al. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -Endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 69, n. 8, p. 4648–4657, 2003.

LEITE, N. A. et al. **O milho Bt no Brasil: a situação e a evolução da resistência de insetos**. 2011. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/60425/1/doc-133.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Milho Bt. pesquisa alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. **Biociência**, Porto Alegre, n. 24, p. 46-52, 2002.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. **Biociência**, Porto Alegre, n. 34, p. 67-77, 2005.

MENDES, S. M. et al. Respostas da lagarta do cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 239-244, 2011.

MICHELOTTO, M. D. et al. Controle de pragas em híbridos de milho geneticamente modificado. **Revista Cultivar**, Pelotas, n. 145, p. 36-38, 2011.

MORAIS, A. A.; PINHEIRO, J. B. Melhoramento para resistência aos insetos-pragas. In: FRITSCH NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses bióticos**. Viçosa, MG: UFV, 2012. p.153-185.

MUGO, S. N. et al. Testing public Bt maize events for control of stem borers in the first confined field trials in Kenya. **African Journal of Biotechnology**. Nairobi, v. 10, n. 23, p. 4713-4718, 2011.

OTA, É. et al. Desempenho de cultivares de milho em relação à lagarta-do-cartucho. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 850-859, 2011.

PEREIRA, E. J. G. et al. Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Philadelphia, v. 103, p. 1-7, 2010.

PINTO, L. M. N. et al. **Toxinas de Bacillus Thuringiensis**. 2013. Disponível em: <<http://www.biocnologia.com.br/revista/bio38/toxinas.pdf>>. Acesso em: 3 set. 2013.

PITTA, R. M.; DAL'MASO, F.; MENDES, S. M. **Contra a resistência**. 2013. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/964664/1/Contraresistencia.pdf>>. Acesso em: 3 set. 2013.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: UFLA, 2012. 522 p.

SANTOS-AMAYA, O. F. et al. **Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events**. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26675246?dopt=Abstract>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

SARMENTO, R. A. et al. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, n. 2, p. 41-48, 2002.

STORER, N. P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, p. 294-300, 2012.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 6, p. 510-521, 2013.

TABASHNIK, B. E.; WUB, K.; WU, Y. Early detection of field-evolved resistance to Bt cotton in China: Cotton bollworm and pink bollworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, p. 301–306, 2012.

TAN, J. G.; MCCAFFERY, A. R. Expression and inheritance of nerve insensitivity resistance in larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. **Pesticide Science**, London, v. 55, p. 617-625, 1999.

VENKOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486 p.

VILARINHO, E. C. et al. Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in maize in Brazil. **Florida Entomologist**, Lütz, v. 94, n. 3, p. 480-488, 2011.

WAQUIL, J. M. et al. Atividade biológica das toxinas do Bt, Cry 1A(b) e Cry 1F em *Spodoptera frugiperda* (SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 161-171, 2004.

YE, W. et al. Mining New Crystal Protein Genes from *Bacillus thuringiensis* on the Basis of Mixed Plasmid-Enriched Genome Sequencing and a Computational Pipeline. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 78, n. 14, p. 4795–4801, 2012.

YU, S. J. Inheritance of insecticide resistance and microsomal oxidases in the diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 86, p. 680-683, 1993.

ZANCANARO, P. O. et al. Avaliação de tecnologias de refúgio no cultivo de milho transgênico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 7, p. 886-891, 2012.

CAPÍTULO 2

Predição de parâmetros genéticos para caracteres associados à resistência da lagarta-do-cartucho às proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 expressas em Milho

1 INTRODUÇÃO

Um dos insetos-praga mais importantes no Brasil e na América Latina em geral é a lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Essa praga ataca as plantas de milho, causando enormes prejuízos econômicos (MONNERAT et al., 2015; PANNUTI et al., 2016; SENA; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ; FERRÉ, 2009). Esta espécie de inseto-praga é polífaga com mais de 100 espécies de plantas, consideradas hospedeiras (BOREGAS et al., 2013; POGUE, 2002).

O cultivo do milho Bt, que expressa proteínas inseticidas isoladas do *Bacillus thuringiensis* vem sendo a principal estratégia de manejo desse inseto-praga. Contudo, a evolução da resistência destes insetos às proteínas Bt tem sido observado em campo e em laboratório (BERNARDI et al., 2015; FARIAS et al., 2014; MONNERAT et al., 2015; STORER et al., 2010) o que pode encurtar a vida útil da tecnologia.

A resistência de insetos-pragas aos genes bt piramidados em plantas, está sendo conduzida por processos evolutivos, diferentes de genes bt simples. A principal vantagem desta piramidação de genes é a baixa sobrevivência de insetos heterozigotos com alelos de resistência (IVES et al., 2011; LEITE et al., 2011; VAN DEN BERG; HILBECK; BØHN, 2013). Para melhorar estratégias de manejo de *S. frugiperda* é necessário conhecer o potencial evolutivo da população de insetos e os sistemas de produção agrícola.

Ao longo de cada ciclo de desenvolvimento, os insetos têm selecionados mecanismos, para sua defesa contra as proteínas Bt. Essa seleção dos indivíduos resistentes ao milho Bt e a recombinação destes indivíduos selecionados a cada ciclo de produção de milho, contribui significativamente para aumentar a frequência dos indivíduos geneticamente adaptados para a resistência de

população de insetos (ATSUMIA et al., 2012; JANMAAT et al., 2004; PEREIRA et al., 2010; YE et al., 2012).

A atividade agrícola, caracterizada por uma sucessão de culturas hospedeiras da *S. frugiperda* e que muitas vezes essas culturas expressam proteínas Bt, aumenta deste modo, a pressão de seleção para a resistência do inseto aos eventos transgênicos. Avanço nos estudos dos mecanismos de resistência da *S. frugiperda*, aos eventos transgênicos pode proporcionar informação necessária para introspecção sobre métodos para retardar a evolução de resistência das pragas aos eventos transgênicos.

O uso de famílias de irmãos germanos pode ajudar a prever os componentes de variância (CRUZ; CARNEIRO, 2006; VENKOVSKY; BARRIGA, 1992) e destes, se estimar outros parâmetros genéticos de importância, no manejo da resistência deste inseto-praga.

A obtenção da estimativa de parâmetros genéticos pode ser avaliada como ferramentas para o manejo da resistência de inseto-praga aos eventos transgênicos. Dentre os parâmetros genéticos estimados em teste de progênies, se destacam a herdabilidade que expressa a confiança fenotípica como guia para o valor genético (FALCONER, 1987; RAMALHO et al., 2012). Desta forma, a estimativa de parâmetros genéticos, como a herdabilidade podem possibilitar o conhecimento do potencial evolutivo de uma população.

A seleção de resistência para *S. frugiperda* às proteínas expressas em milho Bt Cry1Ab, Cry1A. 105, Cry2Ab2, Cry1F, foi comprovada anteriormente (BERNARDI et al., 2015; FARIAS et al., 2014; LEITE et al., 2016; SANTOS-AMAYA et al., 2015) e a compreensão da herdabilidade dessa característica pode auxiliar a previsão para seleção de resistência com esta praga. Para, além disso, este estudo fornece previsões diretas da resposta à seleção com as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, podendo-se entender o potencial evolutivo da população do inseto-praga às duas proteínas.

Determinar a herança da resistência permite conhecer a base genética associada aos mecanismos de resistência. Assim, o objetivo do presente estudo foi estimar a herdabilidade e prever a resposta à seleção da *S. frugiperda* a partir de progênies de irmãos germanos em uma população, alimentada por milho expressando as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de insetos

Cento e cinquenta e sete lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas em plantas de milho que expressavam proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 nos campos experimentais da Embrapa Agrossilvipastoril em Sinop, Mato Grosso 11°51'51''S, 55°30'09''W . As lagartas foram acondicionadas em coletores universais de 50 ml e levadas ao laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, mantidas a uma temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

2.2 Progênes de irmãos-germanos

As lagartas de *S. frugiperda* foram mantidas em laboratório, sem pressão da proteína Bt por dois ciclos. Durante este período as lagartas foram alimentadas com uma dieta artificial a base de feijão adaptada de Kasten Júnior, Precetti e Parra (1978). Os adultos foram mantidos em um esquema de acasalamento aleatório.

No terceiro ciclo foram formados 42 pares monogâmicos para acasalamento. Foram usadas gaiolas de tubo PVC de 20 cm de diâmetro e 20 cm de altura, forradas internamente com papel tipo *sulfite*, para as fêmeas depositarem seus ovos. No interior da gaiola foi mantido algodão umedecido e dieta para os adultos (solução de açúcar, ácido ascórbico e água). Os casais foram mantidos até o quarto dia, onde foram retiradas as posturas das gaiolas. Essas posturas foram identificadas e mantidas na sala ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e 12 horas de fotofase), até a eclosão das lagartas, progênes de irmão germano.

2.3 Milho expressando proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2

O híbrido DKB 390 VT PRO® que expressa a forma ativa das proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 foi plantado, semanalmente, no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo. Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para o cultivo do milho (CRUZ, 2010), sem aplicação de inseticidas e fungicidas, sendo o controle de plantas daninhas, realizado por capina manual.

As plantas de milho de onde foram retiradas as folhas ofertadas aos insetos, foram testadas para expressão qualitativa de Cry1A. 105 e Cry2Ab2. As amostras foram submetidas à imunodeteção da proteína, usando tiras ImmunoStrip® STX 10301/0050 (Agdia Inc., Elkhart, IN, EUA) conforme instruções do fabricante.

2.4 Condução do experimento

Sobrevivência

As lagartas neonatas (< 24 horas) geradas pelos pares monogâmicos foram depositadas em um pote contendo folhas de milho Cry1A. 105 e Cry2Ab2. Três dias depois, foram contabilizadas as lagartas vivas e mortas para se conhecer o número total das lagartas que formaram a repetição. Em média 93 lagartas neonatas gerados por cada par monogâmico, constituíam uma repetição.

As lagartas que sobreviveram, depois dos três dias no pote, foram individualizadas em copos plásticos de 50 ml, para evitar canibalismo e fechadas com tampa de acrílico. A cada três dias, as folhas foram trocadas até os insetos atingirem a fase de pupa. As lagartas mortas foram descartadas e o experimento continuou com as sobreviventes. No final do ciclo, quando os adultos

emergiram, foram contabilizados para se determinar a porcentagem de sobrevivência.

Período de desenvolvimento larval

O período de desenvolvimento larval de *S. frugiperda* foi determinado a partir do dia da eclosão das larvas, até o dia em que se observou a pupa. As observações foram realizadas a cada três dias.

Período letal

O período letal de *S. frugiperda* foi determinado a partir do dia da eclosão das larvas, até o dia que se observou a morte das larvas. As observações foram realizadas a cada três dias.

Biomassa de pupa

A biomassa foi registrada em balança de precisão (0,1 mg) até 24 horas pós a observação da pupa.

2.5 Análise estatística

O experimento foi conduzido em blocos completamente casualizados. Os tratamentos consistiram de 42 progênies de irmãos germanos.

Sobrevivência

Para a sobrevivência das lagartas às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, o experimento foi conduzido em blocos completamente casualizado com três repetições, sendo que cada repetição foi constituída por 93 larvas.

Tendo os dados descritos proporções de sobrevivência em certas amostras, admitiu-se o modelo binomial para explicar os dados apresentados.

Optou-se também por usar a função de ligação *logit* como forma de transformação do valor esperado em que se deseja modelar. Para efetuar o ajuste do modelo generalizado proposto para o conjunto de dados de sobrevivência, foi utilizado o procedimento GLIMMIX do SAS. SAS (Statistical Analysis System) versão 9.3 (SAS INSTITUTE, 2013). As proporções de insetos sobreviventes obtidas a partir de contagem de insetos, foram analisadas conforme o modelo:

$$y_i = \text{Bin}(n_i, \pi_i), (i = 1, 2, \dots, 42)$$

Em que:

n_i Corresponde ao número de sobreviventes; π_i a probabilidade de sobrevivência dos insetos devido a pressão de seleção com as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 no bloco j , $j=1, 2, \dots, 18$ usando $\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = Y_{ijk} \log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = Y_{ijk}$, como função de ligação. A resposta a seleção foi obtida por:

$$Y_{ijk} = \mu + r_j + g_i + \varepsilon_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} : observação da progênie i , no bloco j dentro da repetição k ;

μ : Constante associada às estimativas

r_j : Efeito fixo de j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3$);

g_i : Efeito aleatório da i -ésima progênie ($i = 1, 2, 3, \dots, 42$);

ε_{ijk} : Erro aleatório associado à parcelas ijk .

Período letal de desenvolvimento e biomassa na fase de pupa

Para efetuar o ajuste do modelo proposto para o conjunto de dados de período letal de desenvolvimento e biomassa de pupa, foi utilizado o

procedimento MIXED do SAS. SAS (*Statistical Analysis System*) versão 9.3 (SAS INSTITUTE, 2013). Os dias de desenvolvimento e letal, assim como a biomassa na fase de pupa, foram analisados conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + r_j + \varepsilon_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} : observação da progênie i , no bloco j dentro da repetição k ;

μ : Constante associada às estimativas

g_i : efeito aleatório da i -ésima progênie ($i = 1, 2, 3, \dots, 42$);

r_j : Efeito fixo de j -ésima repetição ($j = 1, 2, 3$);

ε_{ijk} : Erro aleatório associado às parcelas ijk .

Os valores genotípicos foram estimados a partir da opção *solution* do SAS. A variância aditiva foi calculada, multiplicando duas vezes a variância genética.

$$\text{A acurácia foi obtida a partir de } \hat{r}_{gg} = \sqrt{1 - \frac{\text{PEV}}{\hat{\sigma}_g^2}} \hat{r}_{gg} = \sqrt{1 - \frac{\text{PEV}}{\hat{\sigma}_g^2}}$$

Em que $\hat{\sigma}_g^2$ é variância genotípica e PEV é a variância do erro de predição.

A média das progênies foi a unidade de avaliação/seleção. Assim, a herdabilidade de médias entre progênies (h_{mp}^2) de irmãos germanos, foi

$$\text{estimada por: } h_{mp}^2 = \frac{\hat{\sigma}_{mp}^2}{\hat{\sigma}_{mp}^2 + \hat{\sigma}_r^2}$$

Em que:

$\hat{\sigma}_{mp}^2$ é a variância genética entre média de progênies de irmãos germanos, e, $\hat{\sigma}_r^2$ é a variância do resíduo.

Foram também estimadas correlações fenotípicas para se verificar o grau de associação entre os caracteres avaliados. A média genotípica foi estimada, somando-se a média da população ao valor genotípico.

A partir da estimativa da herdabilidade e da proporção da variância genética explorada, foi estimada a resposta à seleção para a sobrevivência por meio de:

$$RS = ip \sqrt{\hat{\sigma}_{mp}^2 h_{mp}^2}$$

Em que:

RS é a resposta da seleção estimada, i é a intensidade de seleção e p é o controle parental igual a um para progênes de irmãos germanos.

Como a seleção foi truncada (a seleção ocorreu apenas na sobrevivência dos indivíduos) e existe uma dependência linear entre os caracteres (medida pelo coeficiente de correlação de Pearson) onde foi estimada uma resposta a seleção de forma indireta (resposta correlacionada) por meio de:

$$RS_{y(x)} = ip r_{xy} \sqrt{\hat{\sigma}_{mpy}^2 h_{mx}^2}$$

Em que:

RS é a resposta da seleção estimada, i é a intensidade de seleção, p é o controle parental igual a um para progênes de irmãos germanos, r_{xy} é a correlação entre a sobrevivência e os caracteres y (período larval, período letal e biomassa de pupa), $\hat{\sigma}_{mpy}^2$ variância genética entre médias de progênes de irmãos germanos de y e h_{mx}^2 é a herdabilidade entre médias progênes de irmãos germanos para a sobrevivência. Porque o número de progênes foi

inferior a 50, a intensidade de seleção foi calculada usando a expressão de Wricke e Weber (1986):

$$i_N = i - \frac{1 - f}{2i(N + 1)}$$

Em que:

i valor da intensidade de seleção padronizado; f proporção de indivíduos selecionados e N número de progênies sob seleção. Como 11, das 42 progênies apresentaram valores genéticos positivos, foi considerada uma intensidade de seleção de 1,2215, corresponde a uma proporção de seleção de 11/42.

3 RESULTADOS

As estimativas de componentes de variância para a sobrevivência da *S. frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, período de desenvolvimento, período letal e biomassa de pupa, apresentam-se na tabela 1. Variâncias (genotípica e residual) significativas para as quatro variáveis foram observadas. Foi, também observada uma variância residual de pequena magnitude para a porcentagem de sobrevivência e período de desenvolvimento larval e grande magnitude da variância genética para os mesmos caracteres.

Tabela 1 Estimativa de componentes de variâncias para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa da população de *Spodoptera frugiperda* coletada em Sinop MT, sob seleção em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, expressas em milho. Sete Lagoas-MG, 2015

	Sobrevivência (%)		Desenvolvimento Larval (dias)		Período letal (dias)		Biomassa pupa (mg)	
	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p
Variância genética	3,9868	0,0011	29,5980	0,0002	7,8700	0,0224	848,29	0,0040
Variância residual	1,0679	<0,0001	1,5871	<0,0001	6,0824	0,0002	1071,59	<0,0001

Foram estimados valores genotípicos para os quatro caracteres. Com 95% de probabilidade, 11 das 42 progênies avaliadas, apresentaram valores genotípicos positivos para a sobrevivência da *S. frugiperda* em seleção com as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, 21 diferentes de zero para o período larval, dos quais nove foram positivos, três para período letal, dos quais dois são positivos, e nove para biomassa de pupa, sendo cinco positivos (Tabela 2).

Tabela 2 Valores genotípicos para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa da população de *Spodoptera frugiperda* coletada em Sinop – MT sob seleção em proteínas Cr1A. 105 e Cry2Ab2 expressas em milho. Sete Lagoas-MG, 2015

Progênie	Sobrevivência (%)		Desenvolvimento Larval (dias)		Período letal (dias)		Biomassa pupa (mg)	
	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p
1	0,3194	0,1633	.	.	-3,7107	0,0157	.	.
2	0,3194	0,1633	.	.	4,7709	0,0026	.	.
3	0,3194	0,1633	.	.	2,3855	0,1084	.	.
4	0,3194	0,1633	.	.	-2,1204	0,1515	.	.
5	0,3194	0,1633	.	.	-2,9153	0,0525	.	.
6	0,3194	0,1633	.	.	-2,1204	0,1515	.	.
7	0,3194	0,1633	.	.	0,2651	0,8549	.	.
8	0,3194	0,1633	.	.	1,0602	0,4666	.	.
9	1,0106	0,9852	-1,5377	0,2240	.	.	-27,8500	0,0470
10	3,3545	0,0011	-2,1926	0,0853	.	.	-31,6007	<0,0001
11	0,3194	0,1633	.	.	1,0602	0,4666	.	.
12	0,3194	0,1633	.	.	1,0602	0,4666	.	.
13	4,6604	<0,0001	-0,2277	0,8560	.	.	-12,1731	0,1354
14	0,6609	0,5284	11,5000	<,0001	.	.	10,4437	0,1740
15	0,4470	0,2795	11,5000	<,0001	.	.	104,9100	<0,0001
16	1,7505	0,2262	5,6669	<0,0001	.	.	26,9771	0,0014
17	1,7640	0,2185	5,9944	<0,0001	.	.	-0,3041	0,9731
18	2,3523	0,0400	7,6318	<,0001	.	.	15,3304	0,0239
19	0,5213	0,3588	4,7606	0,0009	.	.	2,9537	0,7904
20	1,7936	0,2026	5,6669	<0,0001	.	.	-5,7893	0,4280
21	3,9658	<0,0001	6,9768	<,0001	.	.	23,2737	0,0028
22	1,2839	0,6297	1,7371	0,1704	.	.	17,8674	0,0585
23	0,3194	0,1633	.	.	3,4457	0,0238	.	.
24	0,6605	0,5279	-0,5552	0,6585	.	.	-1,2917	0,8551

Tabela 2, conclusão

Progênie	Sobrevivência (%)		Desenvolvimento Larval (dias)		Período letal (dias)		Biomassa pupa (mg)	
	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p	Estimativa	Valor-p
25	2,4317	0,0309	-5,1399	0,0001	.	.	-22,8891	0,0019
26	0,4774	0,3110	-0,5552	0,6585	.	.	12,4886	0,5027
27	4,9224	<0,0001	-0,7863	0,5609	.	.	7,800	0,5537
28	1,4469	0,4564	-2,8476	0,0269	.	.	-12,6495	0,1155
29	2,0901	0,0894	-2,8476	0,0269	.	.	10,9759	0,1111
30	0,6792	0,5522	-3,1751	0,0142	.	.	-9,451	-0,2882
31	2,5191	0,0231	-2,5201	0,0490	.	.	-6,0869	0,6265
32	0,3194	0,1633	.	.	0,2651	0,8549	.	.
33	0,8927	0,8478	-4,4913	0,0016	.	.	-2,7569	0,7925
34	2,8988	0,0061	-7,1048	<,0001	.	.	-27,5377	0,0959
35	6,4250	<0,0001	-2,5201	0,0049	.	.	-11,5693	0,2284
36	2,8812	0,0065	-2,5201	0,0049	.	.	3,2089	0,8314
37	2,1058	0,0853	-7,1166	<,0001	.	.	-39,4371	<0,0001
38	2,2883	0,2694	-8,0873	<,0001	.	.	-41,9292	<0,0001
39	0,3194	0,1633	.	.	-2,1204	0,1515	.	.
40	1,3106	0,5991	.	.	-1,3253	0,3642	.	.
41	4,0621	<0,0001	-3,5025	0,0072	.	.	16,4076	0,0939
42	3,7547	0,0002	-3,5025	0,0072	.	.	0,6714	0,9207

Foram estimadas médias genotípicas para os quatro caracteres (tabela 3). Os desvios em relação à média foram variáveis, em função da magnitude do valor genotípico. Para a sobrevivência variou de 9,16 a 13,50%, para o período de desenvolvimento larval de 18,24 a 37,84 dias, para o período letal foi até 12,44 dias e biomassa de pupa variou de 165,63 a 312,47 dias.

A avaliação das 42 progênies resultou numa acurácia muito alta para o período de desenvolvimento larval (0,9786) e biomassa de pupa (0,9890) e alta para a sobrevivência (0,8925) e período letal (0,8022).

A estimativa de herdabilidade foi de grande magnitude para todos os caracteres avaliados. Sendo para sobrevivência 0,7887, período de desenvolvimento larval 0,9491, período letal 0,5641 e biomassa de pupa 0,4418.

Com vista a verificar se houve uma resposta indireta com a seleção para a sobrevivência, foram obtidas estimativas dos coeficientes de correlação entre a sobrevivência e os outros caracteres. Com o período de desenvolvimento larval foi moderada ($r=0,6827$; $p<0,0001$), com período letal foi alta ($0,7219$; $p<0,0001$) e com a biomassa muito fraca ($0,2932$; $p<0,0001$).

Foi verificada a existência de variabilidade genética entre as progênies de irmãos germanos em relação ao caráter sobrevivência e, admitindo um esquema seletivo em que apenas 11/42 das progênies foram selecionadas e um controle parental igual a um, obteve-se uma resposta à seleção para a sobrevivência da população coletada em Sinop MT de 2,17%.

A associação entre a sobrevivência e outros caracteres (período larval, período letal e biomassa de pupa) foi observada diretamente por meio da correlação fenotípica. Assim, a resposta à seleção para os três caracteres foi estimada indiretamente (respostas correlacionadas). Sendo, 4,03 dias para o período de desenvolvimento larval, 2,20 dias para o período letal e 9,26 miligramas para biomassa de pupa.

Tabela 3 Médias genotípicas para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa da população de *Spodoptera frugiperda* coletada em Sinop – MT, sob seleção em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 expressas em milho. Sete Lagoas-MG, 2015

Progênes	Sobrevivência (%)	Período de desenvolvimento larval (dia)	Período letal (dias)	Biomassa pupa (mg)
1	9,16	.	3,96	.
2	9,16	.	12,44	.
3	9,16	.	10,05	.
4	9,16	.	5,55	.
5	9,16	.	4,75	.
6	9,16	.	5,55	.
7	9,16	.	7,93	.
8	9,16	.	8,73	.
9	9,85	24,79	.	179,72
10	12,20	24,13	.	175,96
11	9,16	.	8,73	.
12	9,16	.	8,73	.
13	13,50	26,10	.	195,39
14	9,50	37,89	.	218,01
15	9,29	37,56	.	312,47
16	10,59	31,99	.	234,54
17	10,61	32,32	.	207,26
18	11,19	33,96	.	222,89
19	9,36	31,09	.	210,52
20	10,64	31,99	.	201,77
21	12,81	33,30	.	230,84
22	10,13	28,06	.	225,43
23	9,16	.	11,11	.
24	9,50	25,77	.	206,27
25	11,27	21,19	.	184,67
26	9,32	25,77	.	220,05
27	13,76	25,54	.	215,36
28	10,29	23,48	.	194,91
29	10,93	23,48	.	218,54
30	9,52	23,15	.	198,11
31	11,36	23,80	.	201,48
32	9,16	.	7,93	.
33	9,73	21,83	.	204,81
34	11,74	19,22	.	180,03
35	15,27	23,80	.	195,99
36	11,72	23,80	.	210,77
37	10,95	19,21	.	168,13
38	11,13	18,24	.	165,63
39	9,16	.	5,55	.
40	10,15	.	6,34	.
41	12,90	22,82	.	223,97
42	12,60	22,82	.	208,24

Também foram estimadas diferentes respostas de seleção para todos caracteres, em função da proporção dos indivíduos selecionados (figura 1). Observa-se que da proporção dos indivíduos selecionados a frequência da resposta à seleção, diminui.

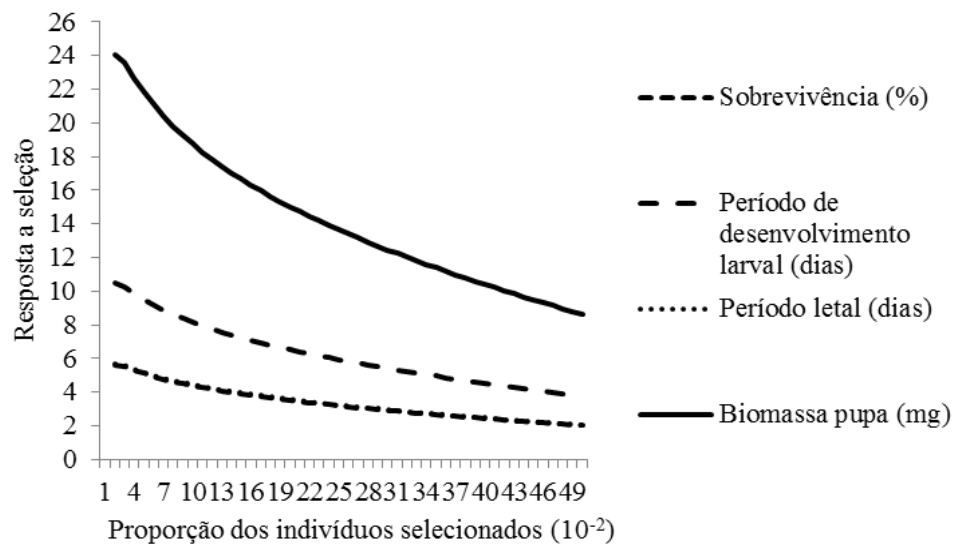


Figura 1 Resposta à seleção para porcentagem de sobrevivência, período de desenvolvimento larval, período letal e biomassa de pupa em função da proporção dos indivíduos selecionados. Sete Lagoas – MG, 2015

4 DISCUSSÃO

A existência da variabilidade genética na população é de fundamental importância para a evolução da espécie e, pode ser definida como sendo todas as diferenças entre os indivíduos relacionados pela descendência.

Significativa variância genética foi detectada para todas as variáveis em estudo, sugerindo que a variação fenotípica observada entre os insetos pode ter origem genética. Estudos anteriores, reportando resultados com outras espécies lepidópteras, afirmam ter observado variação genética para a resistência aos eventos transgênicos, sugerindo a existência de mais de um loco afetando este caráter (JANMAAT; MYERS, 2011).

A partir das estimativas de componentes de variância foi estimado outro parâmetro de grande importância para a evolução da resistência da *S. frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, a herdabilidade que expressa a porcentagem da variância fenotípica que é devida às variações proporcionadas por fatores de natureza genética.

A estimativa da herdabilidade foi alta para a porcentagem de sobrevivência, sugerindo que mais de 78% de variação fenotípica observada, podem ter causas genéticas aditivas. Isto por outro lado pode ser indicativo de que a herança para a sobrevivência é condicionada por poucos genes. Estimativas da herdabilidade de parâmetros relacionados com resistência foram feitas anteriormente em diferentes culturas, expressando diferentes proteínas Bt. Tabashnik (1992) elaborou um estudo de avaliação do risco de resistência usando a herdabilidade da mortalidade e observou que as estimativas da herdabilidade da resistência do *B. thuringiensis* em duas espécies lepidópteras, não foi consistente entre as avaliações do campo e de laboratório, sugerindo que a baixa variação ambiental no laboratório, poderia superestimar a herdabilidade. Outros trabalhos afirmam ainda que plantas com alta dose de proteína podem

reduzir a herdabilidade, causando maior mortalidade das larvas heterozigotas (ALINIA; COHEN; GOULD, 2000; GOULD, 1998; TABASHNIK, 1992).

Com alta acurácia seletiva verificada neste estudo para este caráter (0,8925), pode se inferir que existe grande confiança no valor genético predito e que os desvios absolutos entre os valores genotípicos verdadeiros e os estimados são muito menores e que a chance de reprodução das médias fenotípicas deste experimento nos próximos ciclos, aumenta.

A herdabilidade para as outras variáveis foi de 0,9491 para o período de desenvolvimento larval, de 0,5641 para o período letal e 0,4418 para biomassa de pupa. Mostrando que 4,91% de variação observada no período de desenvolvimento larval, 56,41% no período letal e 44,18% na biomassa foram devido as causas genéticas. Este resultado evidencia bom controle genético na expressão dos caracteres avaliados e, mostra grande potencial para seleção entre os indivíduos, com perspectivas de altas respostas à seleção.

Onze progênies que apresentaram valor genotípico maior que zero, correspondem a 11/42 das progênies testadas. Com a seleção destas progênies espera-se que a média fenotípica, aumente nos ciclos seguintes. Esta predição condiz com literatura sobre a evolução da resistência de populações de *S. frugiperda*, às proteínas Bt em condições de campo, assim como de laboratório (BERNARDI et al., 2015, LEITE et al., 2016; MONNERAT et al., 2015; SANTOS-AMAYA et al., 2015; ZHU et al., 2015).

A maioria dos casos documentados da resistência desenvolvida em lavouras Bt para *S. frugiperda* e outros insectos praga, pouco tempo depois da liberação são as proteínas Cry1F e Cry1Ab (FARIAS et al., 2014, 2015; HUANG et al., 2014; STORER et al., 2012). Hernandez-Rodriguez et al. (2013), comentam que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac competem completamente com Cry1Fa em sítio de ligação. Assim, essas proteínas podem reconhecer e se ligarem ao mesmo receptor a competição pelo mesmo sítio de ligação, pode ser

uma evidência de que a alteração do sítio de ligação pode conferir resistência da *S. frugiperda*, tanto para a proteína Cry1A, como para a proteína Cry1Fa. Com isto podemos concluir que existe muita chance de esta população que apresenta alta taxa de sobrevivência na seleção com as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 apresente também alta taxa de sobrevivência para a proteína Cry1F.

Dada a dependência linear entre a sobrevivência dos insetos desta população em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, à resposta a seleção, foi influenciada para período larval e biomassa de pupa pois estas características estão correlacionadas. Portanto, as larvas alimentadas com proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab aumentavam em 5,89 dias o período de crescimento larval, e 10,146 miligramas de biomassa de pupa. Um aumento médio de 3,17% para a sobrevivência pode ser observado. Os indivíduos com resposta positiva para sobrevivência deixam mais alelos para gerações seguintes, contribuindo desta forma para a evolução da resistência da população coletada em Sinop, as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2.

Em um estudo trabalhando com outra população de *S. frugiperda*, Santos-Amaya et al. (2015) reportam que as larvas alimentadas com proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab diminuíam em três dias o ciclo de crescimento, sem afetar a biomassa da pupa e a sobrevivência do adulto. Estes autores afirmam que esse efeito tem consequências negativas para a aptidão do adulto, evidenciando-se na taxa de reprodução e em todos os parâmetros que descrevem o potencial de crescimento da população. Esta resposta com sentido não coincidente entre este trabalho, e, o comentado anteriormente, pode ter origem fenotípica (pleiotropia, ligação, desvios genéticos não aditivos e desvios de ambiente). Embora exista necessidade de distinguir a correlação genética da ambiental, somente a correlação fenotípica foi observada.

Resultados similares (aumento do período larval) foi obtido por Bernardi et al. (2015), comentam que larvas alimentadas com folhas, expressando a

proteína Vip3A, aumentaram em 1,5 dias o período de desenvolvimento. Por outro lado, Leite et al. (2016) não encontraram custo adaptativos, associados à resistência, quer para a sobrevivência ou ao crescimento larval em folhas de milho, para a proteína Cry1F.

Com a predição dos valores e das médias fenotípicas promoveu-se *shrinkage* (efeito encolhimento) das médias fenotípicas. Nestas médias foram eliminados os efeitos residuais do ambiente, embutidos nos dados fenotípicos e garantia de inferências mais precisas e mais realistas. As progênies 10, 13, 27, 35, 41 e 42 (tabela 3), que mostram um grande deslocamento em relação a média, apresentam maior frequência de alelos para a sobrevivência e se a recombinação acontecer entre indivíduos destas progênies, pode rapidamente aumentar a média da população. Com isto pode-se entender que existe na população, indivíduos geneticamente adaptados capazes de gerar resistência para as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2.

Por outro lado, o aumento da proporção dos indivíduos selecionados, promove uma redução da frequência alélica e, por conseguinte uma redução na resposta a seleção. Com isto, pode-se reforçar a informação de que, quanto mais indivíduos pouco adaptados, mais chances de a quebra de resistência precisar de mais tempo para acontecer e vice-versa.

Nos trabalhos supracitados foi necessário realizar vários ciclos de seleção para se obter a resposta de seleção. Com este método utilizado no presente estudo, foi possível alcançar resultados compatíveis, usando apenas um ciclo de seleção indicando ser metodologia adequada para se fazer predições de evolução de resistência dos insetos pragas aos eventos transgênicos.

Assim, os resultados do estudo aqui exposto, com a metodologia proposta são compatíveis para aumentar o poder de previsão dos métodos para retardar ou superar a evolução da resistência dos insetos-praga às proteínas Bt.

5 CONCLUSÕES

A maior proporção da variabilidade observada nestas progênes, avaliadas para a sobrevivência na pressão da seleção com as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, expressas em milho, foram ocasionadas por causas genéticas. Observou-se também herdabilidade de grande magnitude para todas as características avaliadas.

A acurácia seletiva obtida em todas as características avaliadas, indica boa confiabilidade na avaliação e na predição dos parâmetros genéticos.

Existe uma relação linear entre a sobrevivência e outros caracteres (período larval, período letal e biomassa de pupa) e com isso a resposta a seleção foi influenciada para estes caracteres, tendo sido de cerca de quatro dias para o período de desenvolvimento larval e cerca de nove miligramas para biomassa de pupa. A resposta à seleção para sobrevivência foi de 2,17%.

REFERÊNCIAS

- ALINIA, F.; COHEN, M.; GOULD, F. Heritability of tolerance to the Cr1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economy Entomology**, Lanham, v. 93, n. 1, p. 14-17, 2000.
- ATSUMIA, S. et al. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Raleigh, v. 109, p. E1591–E1598, 2012.
- BERNARDI, O. et al. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015.
- BOREGAS, K. G. B. et al. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 61-70, 2013.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. v. 2, 585 p.
- CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de produção, 1). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm>. Acesso em: 19 mar. 2015.
- FALCONER, D. S. **Introdução a genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 1987. 279 p.
- FARIAS, J. R. et al. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.4077/abstract?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop protection**, Guildford, v. 64, p. 150-158, 2014.

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

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S. et al. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, Berkeley, v. 8, p. e68164, 2013.

HUANG, F. et al. Cry1F resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus Pyramided Bt Maize. **PLoS ONE**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e112958, 2014.

IVES, A. R. et al. The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. **Ecological Applications**, Tempe, v. 21, n. 2, p. 503 -515, 2011.

JANMAAT, A. F. et al. Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 70, n. 10, p. 5859–5867, 2004.

JANMAAT, A. F.; MYERS, J. H. Genetic variation in fitness parameters associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in male and female *Trichoplusia ni*. **Journal of invertebrate Pathology**, Philadelphia, v. 107, p. 27-32, 2011.

KASTEN JÚNIOR, P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53 p. 69-78, 1978.

LEITE, N. A. et al. **O milho Bt no Brasil: a situação e a evolução da resistência de insetos**. Sete Lagoas: Embrapa-Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 46 p. (Documentos, 133).

LEITE, N. A. et al. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in a Brazilian strain of fall armyworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 158, p. 236–247, 2016.

MONNERAT, R. et al. 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**, Berkeley, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2015.

PANNUTI, L. E. R. et al. On-Plant larval movement and feeding behavior of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on reproductive corn stages.

Environmental entomology, College Park, v. 45, n. 1, p. 192-200, 2016.

PEREIRA, E. J. G. et al. Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae

(Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. Philadelphia, v. 103, p. 1-7, 2010.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomology Society**, Philadelphia, v. 43, p. 1-202, 2002.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas**. Lavras: UFLA, 2012. 522 p.

RESENDE, M. D. V.; DUARTE, J. B. precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 182-194, 2007.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

SANTOS-AMAYA, O. F. et al. **Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda***: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26675246?dopt=Abstract>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

SENA, J. D.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, C. S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip 3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and environmental microbiology**, Boston, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. Version 9.3. Cary, 2013. Disponível em: <<http://hostname: port/SASLogon/sasenvironment.xml>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

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

STORER, N. P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, p. 294–300, 2012.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, p. 47-79, 1992.

VAN DEN BERG, J.; HILBECK, A.; BØHN, T. Pest resistance to Cry1Ab Bt maize: Field resistance, contributing factors and lessons from South Africa. **Crop Protection**, Guildford, v. 54, p. 154-160, 2013.

VENCOSVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. 2. ed. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

WRICKE, G.; WEBER, W. E. **Quantitative genetics and selection in plant breeding**. Berlin: W. Gruyler, 1986. 406 p.

YE, W. et al. Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* on the basis of mixed Plasmid-Enriched Genome sequencing and a computational pipeline. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 78, n. 14, p. 4795–4801, 2012.

ZHU, Y. C. et al. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 122, p. 15-21, 2015.

CAPÍTULO 3

**Evolução da resistência de populações de lagarta-do-cartucho em seleção
com proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2**

1 INTRODUÇÃO

Na evolução natural, bem como no melhoramento genético, as populações estão sendo, constantemente, submetidas a crivos pelos quais só passam os indivíduos superiores. Nesse caso continuado de peneiramento, a força primordial é a seleção, de tal modo que são favorecidos na reprodução, apenas os indivíduos que se apresentam superiores em determinadas características (FERREIRA, 2006).

A seleção natural dos insetos-praga e/ou progênies resistentes aos eventos transgênicos e a recombinação destes indivíduos selecionados a cada ciclo de produção de milho, pode aumentar a frequência dos indivíduos resistentes na população de insetos (ATSUMIA et al., 2012; JANMAAT et al., 2004; PEREIRA et al., 2010; YE et al., 2012).

Desde que a tecnologia de plantas geneticamente modificada para o controle de pragas foi liberada para a comercialização no Brasil, o controle de lepidópteros-pragas usando a tecnologia Bt foi a melhor alternativa até que começaram a surgir populações de *Spodopera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistente às proteínas expressas em milho (BERNARDI et al 2015; FARIAS et al 2014; STORER et al., 2010). Assim, o potencial de evolução da resistência de populações de insetos às proteínas Bt está se tornando cada vez menos sustentável, com aumento do número de relatos de populações significativamente menos susceptíveis às proteínas Bt expressas em milho (BERNARDI et al., 2015, MONNERAT et al., 2015; ZHU et al., 2015).

A evolução da resistência da população de insetos-praga é um aspecto de fundamental importância a ser observado em programas de manejo de pragas (IVES et al., 2011). A estimativa possibilita a integração de ferramentas que aumentem a eficiência de métodos de manejo de resistência.

Existe algumas metodologias que podem ser empregadas para estimar o progresso genético de qualquer espécie. A maioria das análises é baseada em dados que, em virtude de elevado grau de desbalanceamento e da dinâmica dos programas pela constante inserção ou retirada de um dos efeitos, torna a análise muito trabalhosa e necessitando de softwares estatísticos robustos. Portanto, métodos que permitam estimar o progresso genético de forma mais eficiente e acurada, são importantes (BORGES et al., 2009; BRESEGHELLO; MORAIS; RANGEL, 1998; DIEZ RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; RESENDE, 2007).

A estimativa periódica do progresso genético na seleção dos insetos resistentes às proteínas Bt é fundamental para orientar os entomologistas a respeito da evolução de resistência dos insetos-praga e possíveis alternativas que poderiam ser adotadas para ampliar eficiência no controle da mesma. . Do exposto, foi realizado o presente trabalho, com o objetivo de estimar o progresso genético após três ciclos de seleção de *Spodoptera frugiperda* oriunda de duas regiões geográficas distintas do país, às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de insetos

Foram utilizadas duas populações coletados *S. frugiperda* em duas regiões distintas do país expostas à proteína Cry1A. 105 e Cry2Ab2: (1) SIMAGRO e (2) PRUMO, proveniente de uma coleta de campo com milho expressando as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 nos campos da Embrapa em Sinop-MT: 11°51'51''S, 55°30'09''W e Sete Lagoas: 19°28'79''S, 44°10'55''W. As lagartas foram acondicionadas em coletores universais de 50 ml e levadas ao laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, mantidas a uma temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

O sistema de produção agrícola em SINOP-MT é caracterizado por um aumento de milho safrinha e de culturas de verão (milho e soja), expressando proteínas Bt (Celeres, 2016) e muitas vezes esta sucessão pode não estar acompanhada de rotação da proteína, aumentando assim a pressão de seleção, e, em Sete Lagoas o sistema de produção é diferente, com culturas principais de verão e a área de colheita caracterizada por existência de várias cultivares entre Bt e não-Bt (área experimental da Embrapa Milho e Sorgo). Isto faz com que as duas populações sejam diferentes quanto a exposição as proteínas.

As lagartas de *S. frugiperda* coletadas em campos de produção com milho expressando as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, foram mantidas em laboratório sem pressão da proteína Bt por dois ciclos até completarem o ciclo de desenvolvimento com uma dieta artificial a base do feijão adaptada de Kasten Júnior, Precetti e Parra (1978), sem exposição das proteínas Bt. Quando completaram o ciclo, as mariposas foram deixadas em um esquema de acasalamento aleatório.

Para o acasalamento foram usadas gaiolas de tubo PVC de 30 cm de diâmetro e 50 cm de altura, pregada internamente com papel, tipo sulfite, para as fêmeas depositarem seus ovos, onde foi mantido algodão umedecido e dieta para os adultos (solução de açúcar, ácido ascórbico e água). Cada população de mariposas foi mantida até o quarto dia, onde foram retiradas as posturas das gaiolas. Essas posturas foram identificadas e mantidas na sala ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e 12 horas de fotofase) até a eclosão das lagartas.

2.2 Dinâmica dos ciclos seletivos

O processo foi cíclico que envolveu a obtenção das progênes, avaliação e recombinação das sobreviventes para constituir o ciclo seletivo subsequente.

No final de cada ciclo, os adultos foram mantidos em um esquema de acasalamento aleatório ao longo de todos os ciclos (quatro ciclos com a população SIMAGRO e três ciclos para a população PRUMO). Foram usadas gaiolas de tubo PVC de 30 cm de diâmetro e 50 cm de altura. Internamente foi acondicionado papel tipo sulfite, para que as fêmeas depositassem seus ovos. Também foi mantido no interior da gaiola, algodão umedecido e dieta para os adultos (solução de açúcar, ácido ascórbico e água). A população de mariposas foi mantida por quatro dias, onde foram retiradas as posturas das gaiolas. Essas posturas foram identificadas e mantidas na sala ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 10\%$ UR e 12 horas de fotofase) até a eclosão das lagartas.

2.3 Milho expressando proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2

O milho DKB 390 VT PRO® que expressa à forma ativa das proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 foi semeado, semanalmente, no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo. Os tratos culturais foram realizados de acordo com as

recomendações para o cultivo do milho (CRUZ, 2010), sem aplicação de inseticidas e fungicidas.

As plantas de milho de onde foram retiradas as folhas ofertadas aos insetos, foram testadas para expressão qualitativa de Cry1A. 105 e Cry2Ab2. As amostras foram submetidas à imunodeteção da proteína, usando tiras ImmunoStrip STX 10301/0050 (Agdia Inc., Elkhart, IN, EUA), conforme instruções do fabricante.

2.4 Condução do experimento

Sobrevivência

Vinte e quatro lagartas neonatas (<24 horas), gerados por cada população, constituíram uma repetição. Essas lagartas foram depositadas em um pote contendo folhas de milho que expressavam as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2. Três dias depois, foram contabilizadas as lagartas vivas e mortas para se conhecer o número total das lagartas que formaram a repetição.

As lagartas que sobreviveram depois dos três dias no pote foram individualizadas em copos plásticos de 50 ml, tampados com uma tampa de acrílico para evitar morte por canibalismo. A cada três dias, as folhas foram trocadas até atingir a fase de pupa. As lagartas mortas foram descartadas e o experimento continuou com as sobreviventes. No final do ciclo, quando os adultos emergiram, foram contabilizados para se determinar a porcentagem de sobrevivência.

Período de desenvolvimento larval

O período de desenvolvimento larval de *S. frugiperda* foi determinado a partir do dia da eclosão das larvas, até o primeiro dia em que se observou a pupa. As observações foram realizadas a cada três dias.

Biomassa de pupa

A biomassa foi registrada em balança de precisão (0,1 mg) no primeiro dia que a pupa foi observada.

2.5 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (População SIMAGRO e População PRUMO).

Sobrevivência

Para a sobrevivência das lagartas às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. A parcela foi constituída por 24 larvas, ou seja, 24 larvas por repetição.

Tendo os dados descritos proporções de sucessos em certas amostras, admitiu-se o modelo binomial para explicar os dados apresentados. Optou-se também por usar a função de ligação *logit* como forma de transformação do valor esperado que se deseja modelar. Um desbalanceamento foi observado em relação ao número de repetições, para efetuar o ajuste do modelo generalizado proposto, para o conjunto de dados de sobrevivência foi utilizado o procedimento GLIMMIX do SAS. SAS (Statistical Analysis System) versão 9.3 (SAS INSTITUTE, 2013). As proporções de insetos sobreviventes obtidas a partir de contagem de insetos foram analisadas conforme o modelo:

$$y_i = Bin(n_i, \pi_i), (i = 1, 2)$$

Em que:

n_i Corresponde ao número de sobreviventes; π_i a probabilidade de sobrevivência dos insetos devido a pressão de seleção com as proteínas Cry1A.

105 e Cry2Ab2 na parcela usando $\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = Y_{ijk} \log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = Y_{ijk}$ como função de ligação. A resposta a seleção foi obtida por:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + c_j + (gc)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} : observação da progênie i , na parcela k dentro da repetição j ;

μ : Constante associada às estimativas

g_i : Efeito fixo da i -ésima população ($i = 1, 2$);

c_j : Efeito fixo do j -ésimo ciclo ($j=1,2,3$);

$(gc)_{ij}$: Efeito da interação entre as populações e os ciclos;

ε_{ijk} : Erro aleatório associado às parcelas ijk .

Período de desenvolvimento e biomassa na fase de pupa

Um desbalanceamento foi observado em relação ao número de repetições e de ciclos, e, para efetuar o ajuste do modelo proposto para o conjunto de dados de período desenvolvimento e biomassa de pupa, foi utilizado o procedimento MIXED do SAS. SAS (Statistical Analysis System) versão 9.3 (SAS INSTITUTE, 2013). Os dias de desenvolvimento e letal assim como a biomassa na fase de pupa foram analisados conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + c_j + (cg)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que:

Y_{ijk} : observação da progênie i , no bloco j dentro da repetição k ;

μ : Constante associada às estimativas

g_i : efeito fixo da i -ésima população ($i = 1, 2$);

c_j : Efeito fixo de j -ésimo ciclo ($j=1, 2, 3$);

$(cg)_{ij}$: Efeito da interação entre as populações e os ciclos;

ϵ_{ijk} : Erro aleatório associado às parcelas ijk .

A resposta à seleção foi calculada de forma independente para cada população e como regressão linear, usando as médias nas três variáveis e os ciclos.

Para estimar o estágio de adaptação das duas populações de *S. frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 expressas em milho, foi utilizado índice de adaptação (IA) proposto por Waquil et al. (2016):

$$IA = SBL * BP / PDL$$

Em que: SBL = Taxa de sobrevivência, BP= biomassa de pupa e PDL= período de desenvolvimento larval. Como foi verificada muita variação no IA, foi estimado o índice relativo de adaptação (IRA) tomando como referência a dieta artificial.

$$IRA = \frac{IA \text{ folhas milho}}{IA \text{ dieta artificial}}$$

Em que IA folhas = índice de adaptação das larvas alimentadas com folhas de milho expressando as duas proteínas, e, IA dieta artificial = índice de adaptação das larvas alimentadas com dieta artificial.

3 RESULTADOS

A população SIMAGRO apresentou em média maior porcentagem de sobrevivência do que a população PRUMO. A sobrevivência das larvas da população SIMAGRO variou de $5,75 \pm 0,38$ a $17,56 \pm 2,21\%$, tendo alcançado a maior sobrevivência no segundo ciclo seletivo, enquanto que a PRUMO variou de $0,5345 \pm 1,9896$ a $11,11 \pm 6,1346 \%$.

O desempenho das duas populações em cada ciclo foi diferente no segundo e terceiro ciclo. E o segundo ciclo apresentou em média maior porcentagem de sobrevivência atingindo com a população SIMAGRO $17,56 \pm 2,21\%$ de sobrevivência.

A população PRUMO no primeiro ciclo apresentou um intervalo de confiança com maior magnitude e no terceiro ciclo atingiu média zero ($0,5345 \pm 1,9896$). No entanto a população SIMAGRO no terceiro ciclo apresenta ainda uma porcentagem de sobrevivência de $17,56 \pm 2,21 \%$.

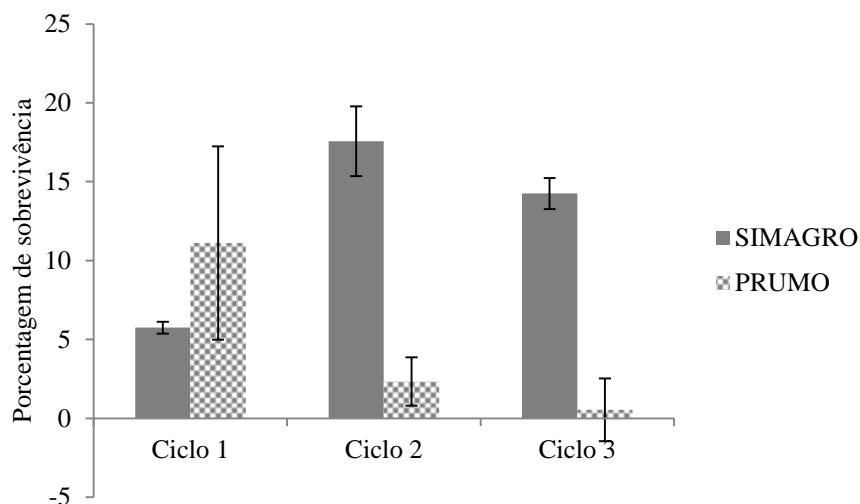


Figura 1 Porcentagem de Sobrevivência (\pm intervalo de confiança) de *Spodoptera frugiperda* por população em função dos ciclos seletivos em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 2015

Para cada ciclo, não foi observada diferença significativa entre as duas populações, contudo foi observada diferença significativa quando comparada de forma independente as populações do primeiro ao último ciclo seletivo. Ou seja, o período de desenvolvimento larval não deferiu entre as populações no mesmo ciclo. Mas, o período de desenvolvimento larval de cada população deferiu de um ciclo para o outro tendo variado de $20,33 \pm 2,52$ a $27,67 \pm 2,52$ dias (figura 2).

A alimentação das larvas das duas populações de *S. frugiperda* com folhas de milho expressando proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 resultou em um aumento significativo do período de desenvolvimento larval ao longo dos ciclos seletivos.

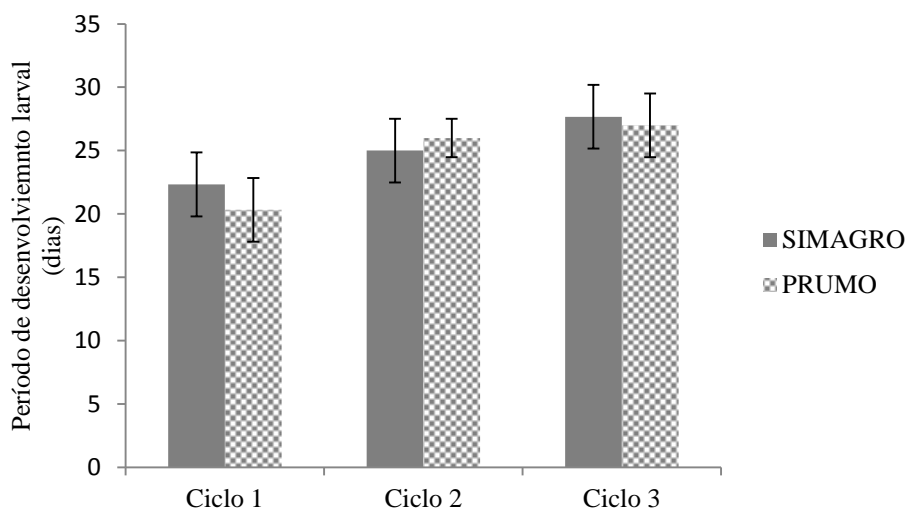


Figura 2 Período de desenvolvimento larval (\pm intervalo de confiança) da *Spodoptera frugiperda* por população em função dos ciclos seletivos com proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 2015

A alimentação das larvas com folhas de milho expressando proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 teve efeito na biomassa de pupa.

Analisando separadamente as duas populações, pode-se observar que a biomassa do segundo e terceiro ciclos na população SIMAGRO, não diferiram significativamente (sobreposição dos intervalos de confiança), no entanto foi inferior em relação ao primeiro ciclo.

Para a população PRUMO, o primeiro e o segundo ciclo não apresentaram diferença significativa de massa de pupa e foi superior quando comparada com a de terceiro ciclo (figura 3).

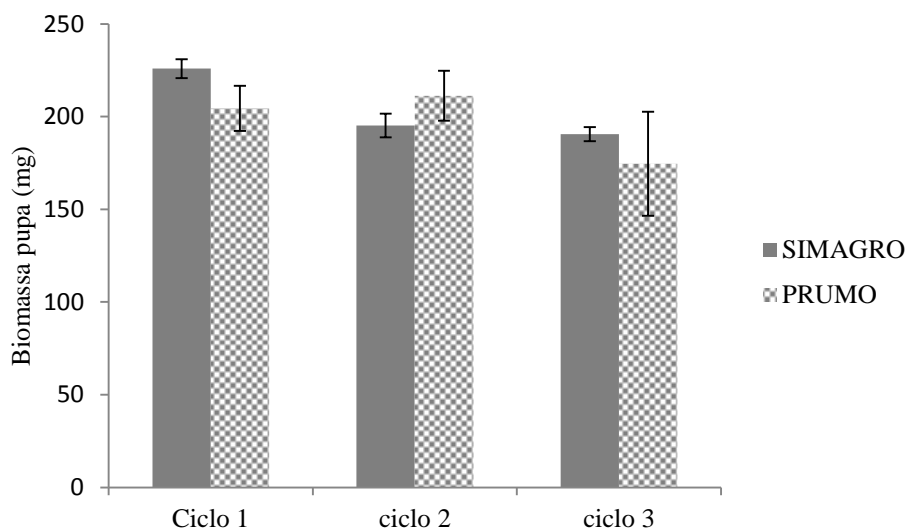


Figura 3 Biomassa de pupa (\pm Intervalo de confiança) da *Spodoptera frugiperda* por população em função dos ciclos seletivos em proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 2015

A resposta à seleção obtida a partir de coeficiente da regressão linear foi diferente para as duas populações. O coeficiente de determinação, que mede o ajustamento da reta aos dados foi bom para a população PRUMO ($R^2=0,8733$) e moderado para a população SIMAGRO ($R^2=0,4871$). Ou seja, 87,33% da variação na população PRUMO é explicada pelo modelo, enquanto que para a população SMAGRO 48,71% é explicado pelo modelo.

Em média a redução de 5,29% por ciclo, enquanto que a população SIMAGRO, a resposta à seleção foi em média de 2,25% por ciclo seletivo.

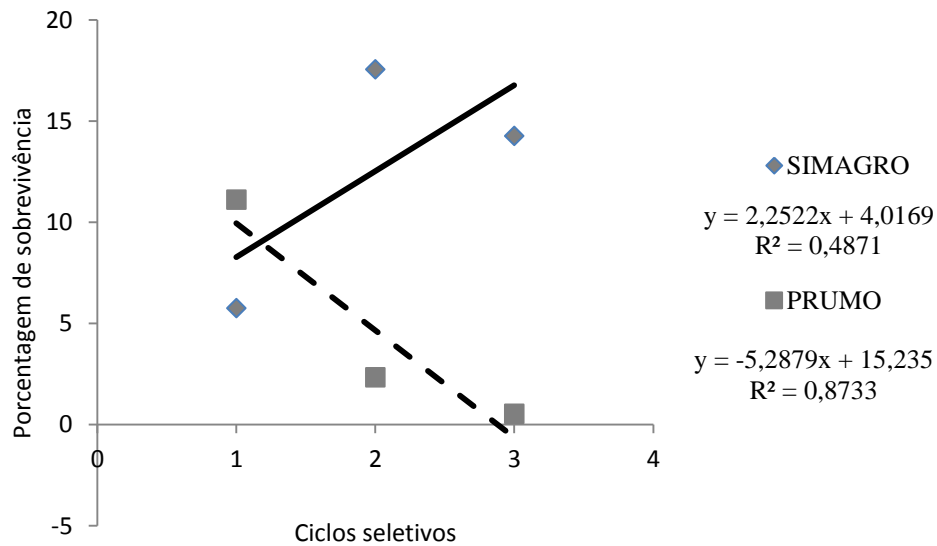


Figura 4 Resposta a seleção para porcentagem de sobrevivência de populações de *Spodoptera frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 2015

As diferenças observadas de um ciclo para outro em cada população resultaram em ganho médio de 2,67 (cerca de três dias) dias para população SIMAGRO e 3,33 dias (cerca de três dias) para a população PRUMO (figura 5).

O coeficiente de determinação foi ótimo, para as duas populações. Na população SIMAGRO 99,48% da variação foi explicado pelo modelo e 85,96 na população PRUMO, foi explicado pelo modelo.

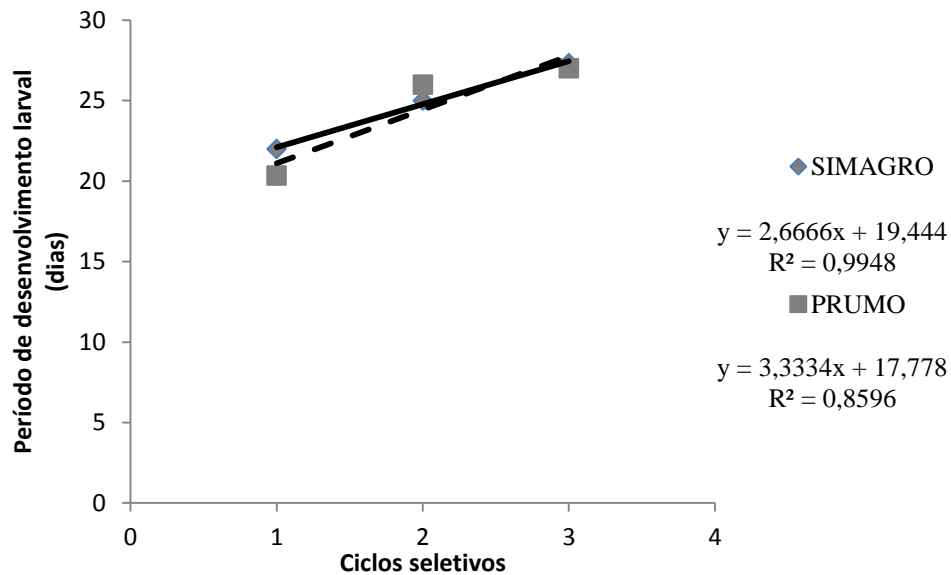


Figura 5 Resposta a seleção para o período de desenvolvimento larval em populações *Spodoptera frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas – MG, 2015

Estas diferenças resultaram em uma perda média da massa de pupa de 17,64 miligramas por ciclo para cada pupa da população SIMAGRO e 14,93 miligramas por pupa para a população PRUMO (figura 6).

O coeficiente de determinação explica 84,61 % da variação, enquanto que para a população PRUMO 58,68% da variação é explicada por modelo.

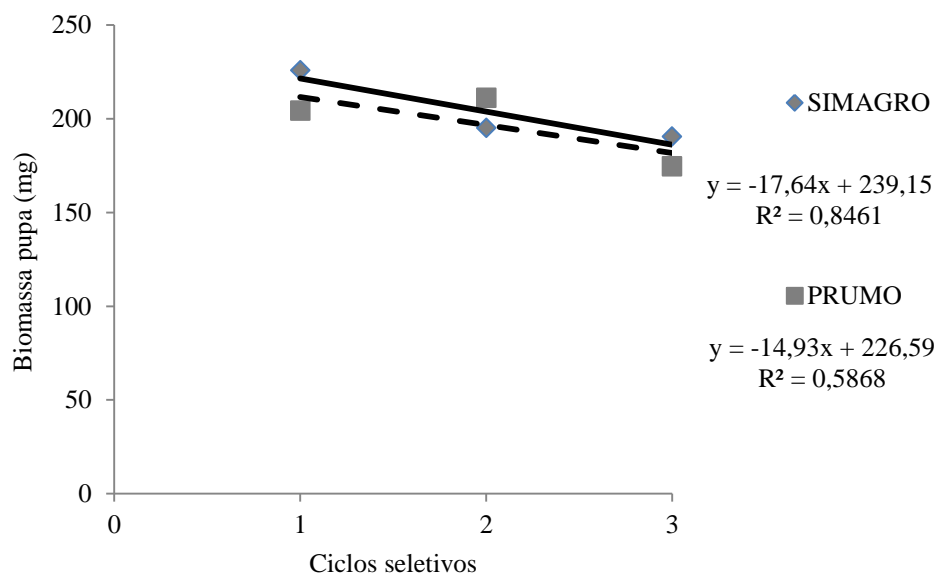


Figura 6 Resposta a seleção para biomassa de pupa nas duas populações de *Spodoptera frugiperda* às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, Sete Lagoas-MG, 2015

Também foi determinado o índice de adaptação (IA), que resume as variáveis sobrevivência, período de desenvolvimento larval e biomassa na fase de pupa, revelando o nível de toxicidade das proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 para as populações de *S. frugiperda* avaliadas. Assim, na população SIMAGRO foi maior no segundo ciclo (IA=1,37), seguido do terceiro ciclo (IA=0,98) e finalmente primeiro ciclo (IA=0,58). Para a população PRUMO houve redução do primeiro ao terceiro ciclo tendo sido respectivamente 1,12; 0,19 e 0,03.

Como foi verificada muita variação, estimou-se o índice relativo de adaptação (IRA) que consistiu na razão do IA do inseto alimentado com folhas de milho expressando as proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 e a dieta artificial. Para a população SIMAGRO o IRA foi para ciclo 1, ciclo 2 e ciclo 3 respectivamente

0,0453; 0,1171 e 0,0948 e população PRUMO 0,0856; 0,0174 e 0,004 para os ciclos um, dois e três respectivamente.

4 DISCUSSÃO

Uma resposta variável da sobrevivência por ciclo foi observado para cada população. Esta variação caracterizada por aumento e redução pode ser causada pela variação de níveis de proteína na planta em diferentes épocas da produção e em diferentes estágios de desenvolvimento da mesma, levando a diferentes respostas biológicas dos insetos, permitindo a sobrevivência diferencial dos insetos.

Foi detectado progresso com a seleção da população SIMARGO, sugerindo que esta população apresenta uma frequência alélica favorável para sobrevivência às duas proteínas, Cry1A. 105 e Cry2Ab2.

Bernardi et al. (2015) comentam que para as estratégias mais usadas, para retardar a resistência dos insetos pragas a eventos transgênicos (alta dose e refúgio) tenham sucesso é preciso que, entre vários fatores, a frequência inicial do alelo que confere a resistência, seja baixa. Contudo, resultado deste estudo é indicativo de alta frequência alélica para a sobrevivência a estas proteínas.

Por outro lado Tabashnik, Brévault e Carrière (2013) comentam que estudos publicados a partir de 2012, relatam análises estatísticas que associam padrões observados de resistência desenvolvida em campo e efeitos previstos de dois principais parâmetros biológicos, a dominância da resistência e a frequência inicial do alelo que confere a resistência. Fazendo uma associação entre os estudos comentados por Tabashnik Brévault e Carrière (2013) e com os resultados aqui discutidos, pode-se entender que para a população SIMARGO, existem muitas chances para o progresso da proporção de indivíduos sobreviventes em seleção às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2 (quebrando resistência) se as estratégias de manejo para retardar a evolução da resistência, não forem tomadas a tempo.

Tabashnik (1992) comenta que quatro a seis gerações de seleção são suficientes para se detectar resposta com a seleção, desde que a frequência de alelos para a sobrevivência dos insetos esteja presente. A população SIMAGRO não precisou de muitas gerações para se detectar uma evolução significativa da proporção de indivíduos sobreviventes, sugerindo que a frequência alélica para este caráter é alta nesta população e que a metodologia aqui aplicada foi eficiente para ter resposta em muitos poucos ciclos.

A resposta à seleção para o período de desenvolvimento aumentou em cerca de três dias para cada uma das populações. Este resultado corrobora com as previsões apresentadas no capítulo 2 desta tese. Contudo, resultado contrário (redução de três dias) foi reportado por Santos-Amaya et al. (2015). Esta diferença pode ser resultado das diferenças nas condições climáticas, adaptado nos dois estudos. Santos-Amaya et al. (2015) consideraram $27\pm 3^{\circ}\text{C}$, $70\pm 15\%$ de umidade relativa e 14 horas de fotofase. A associação entre duas características pode ser observada diretamente como um conjunto dos desvios de ambiente, assim como dos desvios genéticos não aditivos.

Os índices relativos de adaptação calculados para as larvas das duas populações alimentadas com folhas de milho expressando as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, foram maiores no segundo ciclo. Isto sugere que as populações já apresentam resistência para as duas proteínas em estudo. Contudo, a redução verificada posteriormente, pode ser indicativa da existência de um fator não genético (variação de nível de proteína na planta, condições climáticas do laboratório, entre outros) influenciando estes caracteres.

Um intervalo de confiança para população PRUMO no primeiro ciclo foi de grande magnitude, sugerindo baixa variabilidade dos indivíduos deste ciclo. Uma das premissas para a evolução da resistência é a existência da variabilidade genética na população. Assim, esta população apresentou uma regressão significativamente alta (redução significativa da taxa de

sobrevivência). Isto pode significar que a tecnologia é ainda bastante sustentável para esta população. A frequência de alelos não favoráveis para a sobrevivência é ainda alta. Contudo, técnicas de manejo devem continuar a ser o grande segredo para que a tecnologia continue alcançando êxito.

A resposta negativa foi observada na biomassa das pupas para as duas populações, sugerindo que a frequência de alelos responsáveis pelo ganho de peso foi alta no início e foi decrescendo assim que a seleção ia prosseguindo. Contudo, Janmaat e Myers (2011) estudando variação genética nos parâmetros adaptativos (peso da pupa, período até a fase de pupa e mortalidade) associada à resistência do *B. trurugiensis* em machos e fêmeas de *Trichoplusia ni*, observaram que uma correlação positiva entre amassa de pupa macho e a susceptibilidade ao *B. trurugiensis*. Vários fatores não genéticos podem estar associados a estas diferenças de resultados.

5 CONCLUSÕES

A população SIMAGRO apresentou alto potencial para proporcionar descendência adaptada às proteínas Cry1A. 105 e Cry2Ab2, enquanto que a população PRUMO apresenta baixo potencial. As respostas alcançadas com a seleção na população SIMAGRO foram positivas (maior adaptação) para a taxa de sobrevivência e período de desenvolvimento, enquanto que para a população PRUMO só foram positivos para o período de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ATSUMIA, S. et al. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Raleigh, v. 109, p. E1591–E1598, 2012.
- BERNARDI, O. et al. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015.
- BORGES, V. et al. Progresso genético do programa de melhoramento de arroz de terras altas de minas gerais utilizando modelos mistos. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 478-490, 2009.
- BRESEGHELLO, F.; MORAIS, O. P.; RANGEL, P. H. N. A new method to estimate genetic gain in annual crops. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 4, p. 1-9, 1998.
- DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop protection**, Guildford, v. 64, p. 150-158, 2014.
- FERREIRA, P. V. **Melhoramento de plantas**: bases genéticas da seleção e da hibridação. Maceió: UFAL, 2006. 190 p.
- IVES, A. R. et al. The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. **Ecological Applications**, Tempe, v. 21, n. 2, p. 503 -515, 2011.
- JANMAAT, A. F. et al. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 70, n. 10, p. 5859–5867, 2004.
- JANMAAT, A. F.; MYERS, J. H. Genetic variation in fitness parameters associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in male and female *Trichoplusia ni*. **Journal of invertebrate Pathology**, Philadelphia, v. 107, p. 27-32, 2011.

MONNERAT, R. et al. 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**, Berkeley, v. 10, n. 4, p. e0119544, 2015.

PEREIRA, E. J. G. et al. Measurements of Cry1F binding and activity of luminal gut proteases in susceptible and Cry1F resistant *Ostrinia nubilalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Philadelphia, v. 103, p. 1–7, 2010.

RESENDE, M. D. V. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

SANTOS-AMAYA, O. F. et al. **Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda***: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26675246?dopt=Abstract>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. Version 9.3. Cary, 2013. Disponível em: <<http://hostname:port/SASLogon/sasenvironment.xml>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

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

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **nature biotechnology**, New York, v. 31, n. 6, p. 510-521, 2013.

TABASHNIK, B. E. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae), Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae), and Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of economic entomology**, Lanham, v. 85, n. 5, p. 1551-1559, 1992.

WAQUIL, M. S. et al. **Índice de adaptação e tempo letal da lagarta-do-cartucho em milho Bt**: [S. l.: s. n.], 2016.

YE, W. et al. Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* on the basis of mixed Plasmid-Enriched Genome sequencing and a computational pipeline. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 78, n. 14, p. 4795–4801, 2012.

ZHU, Y. C. et al. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 122, p. 15-21, 2015.