

O Milho *Bt* no Brasil: a Situação e a Evolução da Resistência de Insetos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 133

O Milho *Bt* no Brasil: a Situação e a Evolução da Resistência de Insetos

Natália Alves Leite
Simone Martins Mendes
José Magid Waquil
Eliseu José Guedes Pereira

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio Dessaune Tardin, Eliane

Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana e

Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Matheus Soares Waquil e Simone M. Mendes

1ª edição

1ª impressão (2011): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

O milho Bt no Brasil: a situação e evolução da resistência de insetos / Natália Alves Leite ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2011.

46 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 133).

1. Controle integrado. 2. Praga de planta - manejo. 3. Proteína. I. Leite, Natália Alves. II. Série.

CDD 632.7 (21. ed.)

© Embrapa 2011

Autores

Natália Alves Leite

Eng.-Agr., Doutoranda em Entomologia – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP).
alvesnat@gmail.com

Simone Martins Mendes

Eng.-Agr., Doutora em Entomologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.
simone@cnpms.embrapa.br

José Magid Waquil

Eng.-Agr., Ph.D, PhD Entomologia, RIT DA/CNPq.
jmwaquil@gmail.com

Eliseu José Guedes Pereira

Eng.-Agr., Ph.D, professor da Universidade Federal de Viçosa. eliseu.pereira@ufv.br

Apresentação

O milho Bt (*Bacillus thuringiensis*) caracteriza-se como uma tecnologia para o manejo de pragas utilizada no Brasil desde a safra 2008/09, que expressa proteínas inseticidas que atuam contra diversas pragas, destacando-se os lepidópteros, dentre eles, a lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera: Noctuidae), principal praga da cultura. Entretanto, esses insetos respondem de forma distinta às diferentes toxinas. Nesse contexto, diferentes respostas à pressão de seleção para a resistência têm sido observadas nas pragas-alvo do milho Bt, e a resistência de pragas pode levar à perda dessa tecnologia. Assim, é de extrema importância que se faça um manejo correto em campo para preservar a sua utilização no manejo integrado de pragas. Nesse documento são abordados aspectos relacionados ao milho Bt, sua utilização no Brasil e a seleção para resistência, bem como são apresentadas as estratégias para o manejo da resistência e suas implicações.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

O Milho <i>Bt</i> e sua Utilização	9
Proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
O Milho Transgênico no Brasil	13
Evolução e Manejo da Resistência à Proteína <i>Bt</i>	17
Estratégias de Manejo da Resistência	19
Monitoramento	19
Alta Dose/Refúgio	21
Plantas com Pirâmides de Genes	26
Baixa Dose/MIP (Controle Biológico)	26
Rotação de Culturas	28
Mistura de Sementes	29
Expressão Seletiva, Local e Temporal, de Proteínas <i>Bt</i>	30
Plantas Armadilha	31
Considerações Finais	32
Agradecimentos	33
Referências	33

O Milho *Bt* no Brasil: a Situação e a Evolução da Resistência de Insetos

Natália Alves Leite

Simone Martins Mendes

José Magid Waquil

Eliseu José Guedes Pereira

O Milho *Bt* e sua Utilização

Um dos principais desafios do homem para o manejo do agroecossistema, visando à sustentabilidade, é o controle de pragas na agricultura (WAQUIL, 2003). A combinação dos conhecimentos e avanços tecnológicos da engenharia genética e da moderna biotecnologia resultou nas plantas geneticamente modificadas, as quais podem ser consideradas uma tática adicional de controle em programas de Manejo Integrado de Pragas em diversos ecossistemas (MARTINELLI; OMOTO, 2005). Nesse contexto, o milho *Bt* é caracterizado pela inserção em plantas de um ou mais genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que induz a produção de uma ou mais proteínas tóxicas apenas para determinadas pragas. Assim, nas espigas, o milho *Bt* permite reduzir o ataque de insetos em até 90%, diminuindo, conseqüentemente, a probabilidade de crescimento de fungos através das perfurações provocadas pelos insetos-pragas (MARQUES, 2011). Além disso, o nível de controle obtido nas plantas *Bt* é maior do que os obtidos por métodos convencionais, reduzindo ou eliminando a demanda pelo controle químico, o qual pode apresentar falhas

frequentes, pode gerar resíduos tóxicos nos produtos obtidos e causar contaminações ambientais com riscos para agricultores e consumidores (WAQUIL, 2003). Considerando que 50% da produção seja feita com o milho *Bt*, o controle de lagartas na lavoura reduzindo as perdas na produção e a redução no gasto com defensivos, o Brasil pode economizar cerca de 500 milhões de dólares anuais (WAQUIL et al., 2002).

Entre as principais espécies de insetos que causam danos à cultura do milho, e que podem ser controladas através da utilização do milho *Bt*, destacam-se os lepidópteros, tais como a lagarta-elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lep.: Pyralidae); a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae); a lagarta-da-espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae); a lagarta-roscas, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lep.: Noctuidae) e a broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Frab.) (Lep.: Pyralidae). Estes merecem posição de destaque, seja pelo dano causado às lavouras, pela frequência de ocorrência ou pela dificuldade de controle com métodos tradicionalmente utilizados até então, como a aplicação de inseticidas químicos (MENDES; WAQUIL, 2009).

Trabalhos realizados, no Brasil, demonstram que diferentes proteínas *Bt* têm sido efetivas no controle de dois importantes lepidópteros-pragas da cultura do milho. As proteínas Cry1F, Cry1Ab, e Cry1Ac, expressas em híbridos de milho *Bt*, foram, em ordem decrescente, mais efetivas no controle de *S. frugiperda* (WAQUIL et al., 2002) e as proteínas Cry1Ab, Cry1F e Cry9C foram igualmente efetivas contra *E. lignosellus* (VILELLA et al., 2002b). No entanto, o milho expressando a proteína Cry9C mostrou-se susceptível à lagarta-do-cartucho (WAQUIL et al., 2002) e Vilella et al. (2002a) selecionaram uma população deste inseto-praga resistente a proteína Cry1Ac.

Além disso, mesmo considerando uma só proteína, expressa em diferentes híbridos, como o caso do Cry1Ab, pode-se encontrar

diferenças na sobrevivência e no desenvolvimento de *S. frugiperda*, como reportado por Waquil et al. (2002) e Mendes et al. (2011). Dessa forma, pode-se observar que diferentes insetos-pragas respondem de forma diferente às proteínas *Bt* expressas nas plantas de milho transgênico e que a resistência de pragas é algo iminente no campo, assim, estratégias de manejo são essenciais para a manutenção da tecnologia.

Proteínas de *Bacillus thuringiensis*

A atividade inseticida de *Bt* é atribuída, principalmente, à presença de corpos de inclusões, de natureza proteinácea e cristalina, denominados delta-endotoxinas, os quais são produzidos no estágio de esporulação durante a fase estacionária de crescimento da bactéria. Essas inclusões geralmente contêm proteínas cristalinas (Cry) e citolíticas (Cyt) (HÖFTE; WHITELEY, 1989; CRICKMORE et al., 1998; MAAGD et al., 2001). Diferentemente das delta-endotoxinas, as Cyt não produzem cristais e possuem um maior espectro de ação contra insetos, tanto *in vivo* como *in vitro* (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). Algumas cepas de *Bt* também produzem proteínas inseticidas na fase vegetativa (VIPs), e proteínas binárias (bICPs), as quais diferem estruturalmente das proteínas Cry por possuírem duas subunidades (ESTRUCH et al., 1996; YU et al., 1997; ELLIS et al., 2002; HERMAN et al., 2002). As proteínas VIPs possuem elevada toxicidade para lepidópteros, incluindo *S. frugiperda* e atuam de modo semelhante às proteínas Cry (YU et al., 1997; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; CARNEIRO et al., 2009).

As proteínas Cry são altamente tóxicas e extremamente específicas para uma estreita gama de espécies de insetos, sendo essa especificidade determinada pela estrutura das proteínas e por fatores inerentes ao inseto, tais como, pH intestinal, classe predominante de proteinases digestivas e receptores proteicos na membrana das células do epitélio intestinal (GILL et al., 1992;

KNOWLES, 1994). A toxicidade de algumas endotoxinas de *Bt* é similar a de pesticidas organofosforados, mas, devido à sua especificidade, essas proteínas são relativamente seguras para insetos benéficos e outros animais (INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE, 1998). Dessa forma, seres humanos também são pouco afetados, pois segundo Glare e O'Callaghan (2000), os casos de *Bt* causando doenças neles são extremamente raros, apesar de sua utilização por mais de 60 anos.

Os genes *cry* foram classificados por Höfte e Whiteley (1989) de acordo com sua estrutura molecular, bem como seu alcance de hospedeiros. Na época, os referidos autores mencionaram a classificação de 13 genes *cry*, os quais foram distribuídos em quatro classes. Atualmente, as proteínas Cry são classificadas pela sua sequência primária de aminoácidos, e mais de 500 sequências diferentes do gene *cry* já foram classificadas em 67 grupos (*cry1-cry67*) (CRICKMORE et al., 2010). A atualização dos dados referentes aos genes *cry* de *B. thuringiensis* pode ser encontrada no site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt.

A utilidade de *Bt* no manejo de pragas tem aumentado com a descoberta e o desenvolvimento de novas cepas da bactéria e por avanços recentes na engenharia genética, os quais permitiram a transformação de plantas cultivadas com a inserção de genes e alto nível de expressão de proteínas de *Bt*, principalmente em milho, algodão e batata (GASSER; FRALEY, 1989; KOZIEL et al., 1993; SCHNEPF et al., 1998).

O fato de as proteínas *Bt* serem altamente específicas, além da expressão delas em plantas transgênicas, torna o estudo da bactéria *B. thuringiensis* de suma importância para seu melhor entendimento e utilização na agricultura, sendo considerada como um “bem público” pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2001).

O Milho Transgênico no Brasil

Em 1996, foi introduzido comercialmente, nos EUA, o primeiro milho geneticamente modificado, expressando a proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis*, o qual vem sendo utilizado, com sucesso, para o controle de populações do principal lepidóptero-praga que ataca o milho naquele país (SIEGFRIED et al., 2007). A partir dessa data, outros genes codificando novas proteínas inseticidas foram inseridos no milho, propiciando o controle de diversas pragas, além da tolerância a herbicidas.

No Brasil, em 1997, foram feitas, com o milho Bt11, as primeiras pesquisas com esse tipo de transgênico (SYNGENTA, 2010). Híbridos de milho, expressando a proteína Cry1Ab, foram cultivados comercialmente em 2008 (derivados das linhagens MON810 e Bt11) e mais recentemente, em 2009, foram introduzidos os híbridos expressando a proteína Cry1F (derivados da linhagem TC1507). Desde sua introdução no mercado brasileiro, o milho *Bt* tem sido adotado em larga escala pelos produtores rurais. Na verdade, essa nova tecnologia significou uma mudança de paradigma para o manejo integrado de pragas (MIP), no qual o usual era utilizar estratégias como a aplicação de inseticidas químicos. Assim, no cômputo total da safra de milho, em 2010/11, a área estimada semeada com materiais transgênicos, foi de 7,37 milhões de hectares ou 57,2% da área total, destacando-se um incremento do milho transgênico na safrinha (Figura 1). Outras culturas transgênicas também compõem a figura (MENEZES et al., 2011).

As cultivares transgênicas atualmente no mercado (safra 2011/2012) são resultantes de cinco eventos transgênicos para o controle de lagartas: o evento TC 1507, marca Herculex I ®; o evento MON 810, marca registrada YieldGard ®; o evento MON 89034 YieldGard VT PRO ®; o Agrisure TL ®, conhecido como Bt11; o evento MIR162, TL VIP ® e dois eventos transgênicos

que conferem resistência ao herbicida glifosato aplicado em pós-emergência: o NK603, marca registrada Roundup Ready, e o GA 21 –TG. Na Tabela 1, encontra-se um histórico dos eventos de milho *Bt*, alguns também expressando genes para tolerância a herbicidas, liberados no Brasil.

De forma geral, o uso dessa tecnologia apresenta algumas vantagens sobre o uso de inseticidas convencionais e, cada vez mais, têm se acumulado evidências de negligível impacto em organismos não alvo (SHELTON et al., 2002; NARANJO et al., 2005; WOLFENBARGER et al., 2008). Além disso, esse método de controle de pragas é de fácil utilização pelos agricultores, sendo que a área plantada com culturas *Bt* vem aumentando mundialmente desde sua primeira utilização, por agricultores americanos e australianos, em 1996 (JAMES, 2009).

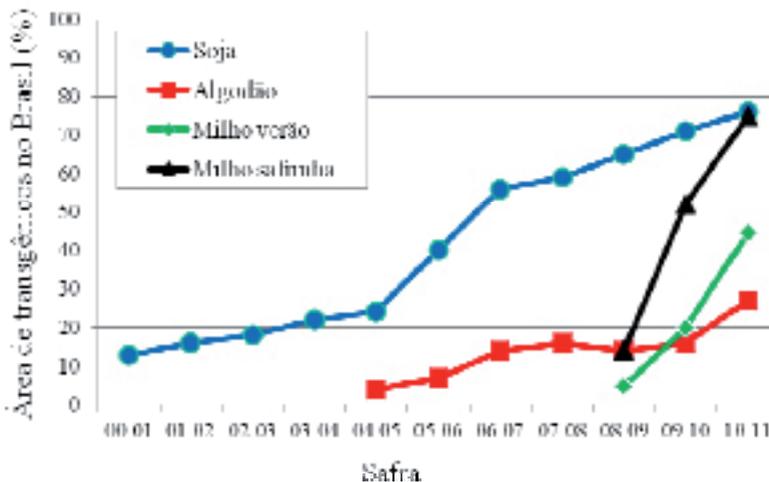


Figura 1. Evolução da área de transgênicos no Brasil (%), adaptado de Menezes et al. (2011).

Tabela 1. Eventos de milho transgênico *Bt* liberados no Brasil, suas características e respectivas datas de aprovação pela CTNBio ⁽¹⁾.

Evento	Características	Proteína(s)	Aprovação
MON 810	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Cry1Ab	Agosto-07
BT11	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ab) e Tolerância ao glufosinato de amônio	Cry1Ab PAT	Setembro-07
TC 1507	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e Tolerância ao glufosinato de amônio	Cry1F PAT	Dezembro-08
MIR162	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Vip3Aa20	Setembro-09
MON810xNK603	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera Tolerância ao herbicida glifosato	Cry1Ab CP4 EPSPS	Setembro-09
BT11xGA21	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e Tolerância ao glufosinato de amônio e glifosato	Cry1Ab mEPSPS	Setembro-09
MON89034	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Cry1A.105 Cry2Ab2	Outubro-09
TC 1507x NK 603	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e Tolerância ao glufosinato de amônio e glifosato	Cry1F CP4 EPSPS PAT	Outubro-09

Tabela 1. Eventos de milho transgênico *Bt* liberados no Brasil, suas características e respectivas datas de aprovação pela CTNBio ⁽¹⁾.

Cont.

Evento	Características	Proteína(s)	Aprovação
MON89034xNK603	Resistência a insetos e tolerância ao glifosato	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4 EPSPS	Novembro-10
BT11xMIR162xGA21	Resistência a insetos e tolerância ao glifosato e glufosinato	Cry1Ab Vip3Aa20 PAT mEPSPS	Novembro-10
MON 88017	Resistência a insetos da ordem Coleoptera Tolerância ao glifosato	Cry3Bb1 CP4 EPSPS	Dezembro-10
MON89034xTC1507xNK603	Resistência a insetos Tolerância ao glifosato e glufosinato de amônio	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4 EPSPS	Dezembro-10
TC1507xMON8010xNK603	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera Tolerância ao glifosato e glufosinato de amônio	Cry1F Cry1Ab PAT CP4 EPSPS	Junho-11
TC1507xMON810	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera Tolerância ao glufosinato de amônio	Cry1Ab Cry1F PAT	Agosto-11
MON89034xMON88017	Resistência a insetos da ordem Coleoptera Tolerância ao glifosato	Cry1A.105 Cry1Ab2 Cry3Bb1 CP4 EPSPS	Setembro-11

⁽¹⁾Adaptada de CTNBio (2011).

Evolução e Manejo da Resistência à Proteína *Bt*

O primeiro caso de resistência de insetos à proteína *Bt* foi relatado em 1985 (MACGAUGHEY, 1985) e, desde então, muito mais casos têm sido documentados (TABASHNIK, 1994b; BAUER, 1995; FERRÉ et al., 1995; SCHNEPF et al., 1998; FRUTOS et al., 1999; VAN RIE; FERRÉ, 2000; VILELLA et al., 2002a). Fora do laboratório, resistência à proteína *Bt* foi documentada em populações de *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lep.: Phycitidae) (MACGAUGHEY, 1985), *Plutella xylostela* (L.) (Lep.: Plutellidae) (TABASHNIK et al., 1990) e *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lep.: Noctuidae) (JANMAAT et al., 2004) em resposta a repetidas aplicações de formulações de *Bt*. Mais recentemente, resistência a culturas *Bt*, em campo, resultando em falhas de controle, foi relatada em *Brusseola fusca* (Fuller) (Lep.: Noctuidae), ao milho expressando Cry1Ab na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007), e em *S. frugiperda* ao milho expressando Cry1F, em Porto Rico (MATTEN et al., 2008). Além disso, Tabashnik et al. (2008) relataram resistência de *H. zea* ao algodão, expressando Cry1Ac, com base na análise de mais de uma década de dados de monitoramento de resistência, embora falhas de controle ainda não tenham sido detectadas.

Na maioria dos relatos de resistência à proteína *Bt*, as populações resistentes foram selecionadas para resistência sob condições de laboratório. Embora populações de laboratório possam não conter todos os genes de resistência presentes nas populações de campo e experimentos de seleção em laboratório não possam prever se a resistência irá se desenvolver em campo ou, ainda, qual mecanismo de resistência será selecionado, elas são importantes para determinar o(s) mecanismo(s) de resistência presente(s) em determinada população e se este(s) confere(m) resistência cruzada

ou resistência múltipla (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Experimentos de seleção com insetos provenientes de populações de laboratório ou coletados em campo têm sido realizados usando uma variedade de produtos de *Bt*, entre eles, misturas formuladas de cristais e esporos, células encapsuladas de *Pseudomonas fluorescens*, expressando proteínas ou protoxinas Cry e materiais derivados de plantas transgênicas expressando proteínas *Bt* (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Esses experimentos têm sido conduzidos em populações de Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, obtendo-se variadas respostas à seleção (MACGAUGHEY, 1985; TABASHNIK et al., 1990; WHALON et al., 1993; GOULD et al., 1995; WIRTH et al., 1997; TABASHNIK et al., 2000; CHAUF AUX et al., 2001; VILELLA et al., 2002a; SIQUEIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2008).

Toda essa informação é essencial para o desenvolvimento de um plano racional de manejo de resistência (GOULD, 1998). Além disso, populações resistentes podem, ainda, ser úteis como ferramenta para validação experimental de táticas propostas de manejo de resistência (LIU; TABASHNIK, 1997; PEREZ et al., 1997; SHELTON et al., 2000; TANG et al., 2001). Assim, o manejo da resistência refere-se a um conjunto de procedimentos aplicados em áreas agrícolas com a finalidade de evitar ou/e retardar a evolução da resistência das pragas aos agentes empregados no seu controle (MACHADO; FIUZA, 2011).

Um componente crítico no manejo de resistência a qualquer inseto-praga é a determinação da herança da resistência, que permite conhecer a base genética associada a um dado mecanismo de resistência, isto é, se a resistência é dominante ou recessiva, autossômica ou ligada ao sexo, monogênica ou poligênica (ROUSH; MACKENZIE, 1987). Essas informações são essenciais para se distinguir entre resistência cruzada (a ocorrência de um mecanismo que confere resistência a diversas proteínas diferentes) e resistência múltipla (diversos mecanismos coexistindo, cada um

conferindo resistência a uma ou mais toxinas diferentes). Além disso, para a estratégia mais utilizada no manejo de resistência a pragas-alvo de culturas *Bt*, alta-dose/refúgio, pressupõe-se herança recessiva da resistência.

Estratégias de Manejo da Resistência

O desenvolvimento do manejo da resistência já começou ainda na era dos produtos químicos, quando se detectou os primeiros casos de evolução da resistência, por parte dos organismos-alvos. Estudos realizados nessa época indicaram que a evolução da resistência era uma questão de tempo e que pode ser retardada pela aplicação de técnicas adequadas de manejo das culturas, ou seja, de estratégias de manejo da resistência. Assim, pode-se dizer que a espécie humana está envolvida numa corrida ao armamento contra a diversidade de organismos considerados pragas (MACHADO; FIUZA, 2011). Com o advento das plantas transgênicas que expressam genes da bactéria *B. thuringiensis*, as pesquisas e os trabalhos nessa área se tornaram cada vez mais importantes e são essenciais para a manutenção da produtividade destas culturas (LEMESLE et al., 2010).

As estratégias de manejo podem ser utilizadas separadamente ou combinadas entre si. São elas: (i) monitoramento, (ii) alta dose/refúgio, (iii) plantas com pirâmides de genes, (iv) baixa dose/MIP (controle biológico), (v) rotação de culturas, (vi) mistura de sementes, (vii) expressão seletiva, local e temporal, de proteínas *Bt* e (viii) plantas armadilhas.

Monitoramento

Quando se fala de manejo em campo, independentemente de qual organismo ou das estratégias a serem adotadas, ele requer

um monitoramento efetivo. No caso das plantas transgênicas, o monitoramento deve atentar para a quebra da resistência e se possível da frequência dos alelos de resistência nas populações de insetos-praga. As mudanças nas frequências de resistência de pragas às proteínas *Bt* devem ser acompanhadas por meio de estudos em laboratório. Assim, com o trabalho de monitoramento da susceptibilidade de pragas, é possível avaliar se o programa implementado está sendo efetivo ou não (WAQUIL, 2003). Acredita-se que o monitoramento da susceptibilidade pode ser capaz de detectar pequenas mudanças na frequência dos genes de resistência antes da ocorrência de falhas no controle devido à evolução da resistência (BERNARDI et al., 2011). O passo inicial para implementar o manejo em campo, inclui o desenvolvimento de técnicas de bioensaios e o estabelecimento da linha básica de susceptibilidade entre populações do inseto-praga nos locais onde estas se localizam. Com essa informação, podem ser identificadas mudanças na susceptibilidade de populações em resposta seleção com proteínas *Bt* (FISCHHOFF, 1996).

Existem vários métodos de monitoramento da susceptibilidade de insetos a proteínas *Bt* e estes estão inseridos em duas classes: fenotípicos ou genotípicos. Os métodos fenotípicos mensuram a susceptibilidade dos insetos pela exposição às proteínas inseticidas, em bioensaios com dieta artificial ou diretamente sobre o tecido vegetal da planta (BERNARDI et al., 2011). Esses métodos são mais eficientes para o monitoramento da resistência de alelos que são aditivos ou dominantes e são recomendados para eventos de baixa dose (ANDOW, 2008).

Os métodos genotípicos têm como objetivo detectar a frequência inicial de alelos resistentes em populações de campo. São eles: “F₁ Screen” e o “F₂ Screen”. Ambos os métodos podem ser utilizados, entretanto, o tempo e a praticidade devem ser considerados na escolha do método. O “F₁ Screen” requer o uso de linhagem

resistente de laboratório e também grande número de famílias (> 1000) e lagartas (5000), tornando-se um método demorado e de alto custo (BERNARDI et al., 2011). Em contrapartida, o método “F₂ Screen”, desenvolvido por Andow e Alstad (1998), dispensa o uso de linhagem resistente e reduz o número de insetos amostrados e o tempo de detecção de alelos raros em populações de campo. Esse método constitui-se das seguintes etapas: (i) fêmeas acasaladas são amostradas de populações naturais; (ii) a progênie de cada fêmea (F₁) é criada em laboratórios e os indivíduos acasalados entre irmãos; (iii) as larvas da geração F₂ são submetidas a um procedimento discriminante adequado para detecção de resistência; e (iv) utilizando métodos de estatística bayesiana, a frequência dos alelos de resistência na população fundadora é estimada com um intervalo de confiança. Esses métodos genotípicos são mais eficientes para o monitoramento da resistência de alelos recessivos, sendo recomendados para eventos de alta dose (ANDOW, 2008).

Independentemente do método utilizado, uma das chaves do sucesso na utilização das plantas transgênicas, com atividade inseticida, é o monitoramento. Sem ele, as demais estratégias de MRI ficam sem a devida complementaridade. Além disso, é importante que o produtor saiba da possibilidade da ocorrência da resistência de insetos e vistorie suas lavouras *Bt*, quanto à eficácia da tecnologia, identificando a ocorrência de insetos sobreviventes de maneira superior ao que seria considerada adequada.

Alta Dose/Refúgio

A combinação de alta dose e área de refúgio tem sido a estratégia recomendada para o manejo da resistência de insetos (MRI) das culturas *Bt* (GOULD, 1998). No Brasil, é a principal estratégia de MRI em milho *Bt*. Na estratégia da alta dose/refúgio, acredita-se que a expressão de elevadas doses de proteína na planta transgênica permita retardar a evolução da resistência por torná-

la funcionalmente recessiva. A alta dose pode ser definida como aquela equivalente a 25 vezes maior que a concentração da proteína necessária para matar todas as larvas susceptíveis (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998) ou, ainda, como a expressão gênica que resulta em altas concentrações da toxina, nos tecidos das plantas, capazes de matar acima de 99% da população da espécie-alvo (WAQUIL, 2003). Acredita-se, ainda, que a expressão de altas doses de proteína nas plantas, se combinada com o plantio e a manutenção de áreas de refúgio, aumenta a eficiência em postergar a resistência.

Para retardar, eficientemente, a evolução da resistência, a cultura transgênica deve matar, essencialmente, todos os insetos homocigotos suscetíveis (SS) e os heterocigotos (RS). Neste caso, sobreviveriam apenas os raros homocigotos resistentes (RR) (OSTLIE et al., 1997; ANDOW; HUTCHISON, 1998; INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE, 1998). Como essas características estão geralmente associadas a um custo adaptativo, a população as conserva na forma de genes recessivos. Desta forma, o homocigoto resistente (RR) só evoluirá quando dois heterocigotos cruzarem entre si para haver a recombinação. Para tornar esse cruzamento menos provável, propõe-se o uso da área de refúgio. O refúgio funciona como um grande criatório de insetos susceptíveis homocigotos para se acasalarem com os raros insetos heterocigotos ou com algum ainda mais raro resistente homocigoto que eventualmente esteja presente na população. Assim, toda progênie gerada consistirá de insetos heterocigotos, os quais serão mortos pela alta dose de proteína expressa nas plantas transgênicas, na mesma safra, ou nas subsequentes. Uma pressuposição importante nesta estratégia é que a resistência é uma característica recessiva, sendo os insetos heterocigotos susceptíveis às elevadas doses de proteína produzida pelas plantas transgênicas (MARTINELLI; OMOTO, 2005). A Figura 2, a seguir, ilustra como funciona a estratégia de alta dose/refúgio.

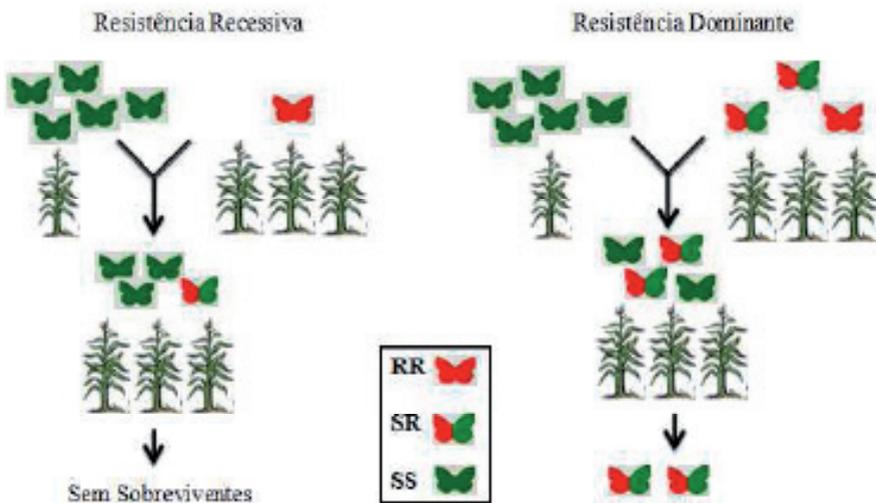


Figura 2. Representação esquemática da estratégia que combina alta dose e refúgio sob dois pressupostos: resistência recessiva e resistência dominante (mariposas representam os sobreviventes adultos de diferentes genótipos: RR, homocigoto resistente; RS, heterocigoto; e SS, homocigoto susceptível). Adaptado de Ferré et al. (2008).

Estudos da interação entre os insetos-praga, suas plantas hospedeiras e a comunidade de artrópode que disputam o mesmo nicho ecológico, bem como o monitoramento da evolução da resistência e de outras de pragas secundárias, que podem se tornar pragas-chave, são de suma importância para a determinação exata do tamanho da área de refúgio. Além disso, o estudo de hospedeiros alternativos das principais espécies de insetos-praga é necessário para definir o desenho e o tamanho da área de refúgio (WAQUIL, 2003). O desenho refere-se à distribuição das plantas não Bt no espaço físico e pode ser no centro, nas margens ou em linhas alternadas às plantas transgênicas (ABRASEM, 2009).

No Brasil, para a cultura do milho Bt, a recomendação técnica da área de refúgio depende do evento, variando de 5 a 20% da

área total. Essa recomendação é influenciada, especialmente, pela eficácia da proteína utilizada, sobretudo se o evento possui proteínas piramidadas.

Além disso, a área de refúgio não deve estar a mais de 800 m de distância das plantas transgênicas. Esta é a distância máxima verificada pela dispersão dos adultos de *S. frugiperda* no campo (VILARINHO, 2007). Todas as recomendações são no sentido de sincronizar os cruzamentos dos possíveis adultos sobreviventes na área de milho *Bt* com susceptíveis emergidos na área de refúgio. Existe também a regra da coexistência, exigida por lei, a qual determina o uso de uma bordadura de 100 m isolando as lavouras de milho transgênico das de milho que se deseja manter sem contaminação de transgênico. Assim, a coexistência refere-se à existência, em uma mesma área, de plantas transgênicas e não transgênicas, as quais se inter cruzam. Respeitando-se as normas de isolamento, evita-se contaminação da cultura não transgênica pela transgênica. Alternativamente, pode-se usar uma bordadura de 20 m, desde que sejam semeadas 10 fileiras de milho não transgênico (igual porte e ciclo do milho transgênico), isolando a área de milho transgênico (MENDES; WAQUIL, 2009; MENDES et al., 2009) (Figura 3).

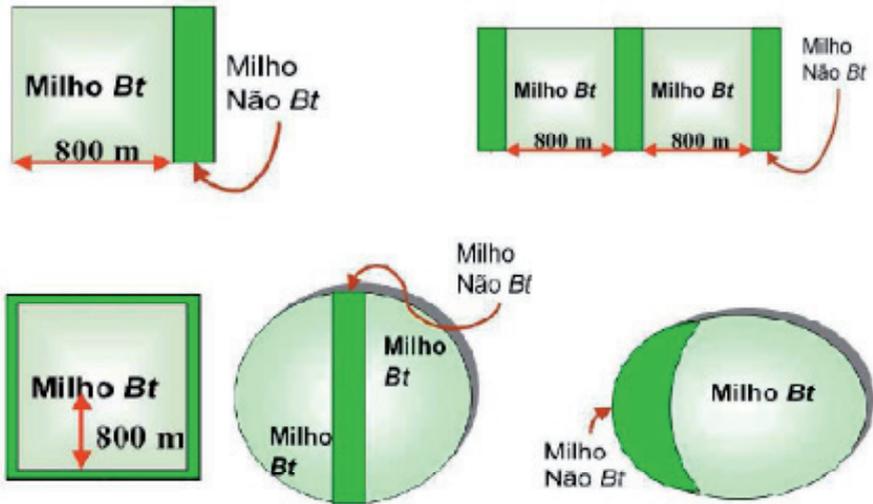


Figura 3. Representação esquemática das opções de desenhos das áreas de refúgio, da esquerda para direita e de cima para baixo: refúgio externo, refúgio central (interno) e em linhas alternadas, refúgio no perímetro da lavoura e refúgio central e externo para áreas de pivô central. Adaptado de Mendes et al. (2009).

Plantas com Pirâmides de Genes

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

No Brasil, a primeira planta de milho expressando mais de uma proteína, o evento MON89034, que expressa as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, foi liberada em outubro de 2009 (Tabela 1). A partir deste momento, observa-se uma tendência da indústria produtora de sementes em produzir variedades que expressem mais de uma proteína *Bt*, adotando essa estratégia como uma das principais para o MRI no Brasil.

Baixa Dose/MIP (Controle Biológico)

Outra estratégia potencial é a utilização da baixa dose da proteína *Bt* com o manejo integrado de pragas (MIP), dando ênfase não só no controle biológico natural como também nos demais métodos de controle biológico, clássico ou inoculativo, inundativo e conservativo. Essa estratégia é necessária quando a proteína não é expressa

em dose suficientemente alta, como é o caso dos híbridos de milho expressando a proteína Cry1Ab para o controle de *S. frugiperda*. Nesse caso, a recomendação, pode ser de uma área de refúgio muito maior que aquelas recomendadas para híbridos que expressem a proteína em alta dose para a praga-alvo (MAIA, 2003). Além disso, estratégias complementares podem ser necessárias para manter a população da praga-alvo em níveis abaixo daqueles que causam danos econômicos, como a utilização de inseticidas. Neste caso, deve-se priorizar aqueles que sejam seletivos aos inimigos naturais, predadores e parasitoides. Qualquer inimigo natural utilizado deve, com certeza, não ser afetado pela exposição direta ou indireta à planta Bt. Além disso, pode-se lançar mão da liberação de agentes de controle biológico, quando pertinente.

Teoricamente, espera-se que o custo adaptativo associado à resistência deixe os indivíduos resistentes mais susceptíveis ao ataque dos inimigos naturais (FRUTOS et al., 1999). No entanto, não há garantia de que um inimigo natural prefira atacar pragas resistentes à proteína Bt. Se os inimigos naturais atacarem indivíduos susceptíveis e resistentes, ou, pelo contrário, houver preferência por pragas susceptíveis, eles podem acelerar o processo de evolução da resistência (FRUTOS et al., 1999). Mendes et al. (informação pessoal) e Leite et al. (informação pessoal) observaram que a preferência de inimigos naturais, sobretudo predadores, por presas que tenham ou não se alimentado de milho Bt é variável. No caso de *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), constatou-se que a espécie prefere ficar em cartuchos de milho Bt, em função da menor capacidade de defesa que as larvas de *S. frugiperda* apresentam ao ataque desse predador. Já para o predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), existe preferência por presas (larvas) de maior tamanho, independentemente se essa tenha se alimentado ou não de plantas expressando proteínas Bt.

Também, larvas de *S. frugiperda* que se alimentam de milho *Bt*, em baixa dose, apresentam seu desenvolvimento reduzido, em relação àquelas que se alimentam do milho não *Bt*, estando mais susceptíveis ao ataque de predadores, expondo-se com maior vulnerabilidade aos fatores bióticos e abióticos de mortalidade.

Rotação de Culturas

A rotação de culturas pode ser feita com plantas *Bt* expressando diferentes proteínas e plantas não *Bt* (WU; GUO, 2003), podendo ser da mesma espécie ou de espécies diferentes, ou seja, com espécies hospedeiras ou não hospedeiras da praga-alvo. A rotação de milho *Bt* com outra cultura não hospedeira da praga-alvo pode fazer com que indivíduos resistentes migrem para outra área, com disponibilidade de hospedeiro, para que estes possam se reproduzir. Se o acasalamento ocorrer na área de origem, antes da dispersão, não haverá efeito na evolução da resistência, porém, se ocorrer após a dispersão, com indivíduos susceptíveis, o efeito será benéfico (MAIA, 2003).

Além disso, a rotação de culturas com plantas não *Bt* pode aumentar a produção de indivíduos susceptíveis na área, tendo ação também para retardar a evolução da resistência. Contudo, as pesquisas nesse sentido ainda são deficientes e ainda não está definida qual a contribuição dessa prática sobre a evolução da resistência. A rotação no tempo e no espaço de variedades transgênicas *Bt* tem um valor potencial quando algum custo adaptativo está associado à resistência (BATES et al., 2005; BIRD; AKHURST, 2005). É importante salientar que as proteínas *Bt* expressas nas plantas a serem rotacionadas não podem apresentar resistência cruzada entre si. Supõe-se que essa prática mantenha os genes da resistência estáveis na população (WU; GUO, 2003).

Mistura de Sementes

Essa estratégia consiste de uma mistura de sementes de plantas *Bt* e não *Bt* (Figura 4) antes ou durante a semeadura, gerando uma lavoura constituída de plantas resistentes e susceptíveis distribuídas ao acaso. A mistura de sementes, assim como o refúgio, age atrasando a evolução da resistência por manter uma população susceptível para acasalamento espalhada dentro do campo.

Dois importantes estudos investigaram a eficiência da mistura de sementes, em comparação com o refúgio estruturado. Mallet e Porter (1992) usaram um modelo computacional para mostrar que a mistura de sementes, na realidade, acelerou o desenvolvimento da resistência em comparação com campos onde só havia plantas *Bt*. Dois anos depois, um estudo contrário demonstrou que a mistura de sementes é preferível aos campos com somente cultura *Bt* (TABASHNIK, 1994a). Ambos os estudos concordam que o refúgio estruturado é melhor que a mistura de sementes e, em muitos casos, torna-se melhor quando combinado à mistura de sementes num único programa.

A grande vantagem dessa estratégia seria que os insetos susceptíveis poderiam migrar mais facilmente para se acasalarem com indivíduos resistentes expostos às plantas *Bt*, além disso, o refúgio estaria sendo inevitavelmente feito se as sementes viessem misturas na embalagem. No entanto, a desvantagem da mistura de sementes como uma estratégia de resistência, está intimamente relacionada com a vantagem teórica desta, ou seja, essa facilidade da mobilidade da praga entre as plantas coloca os insetos susceptíveis em risco de exposição às plantas *Bt*, os quais poderão ser mortos e, portanto, ficar em número reduzido.

Outro aspecto positivo é quando essa estratégia é utilizada para o controle de insetos que possuem um comportamento de escolha de plantas livres da proteína *Bt*, como é o caso da lagarta-do-

cartucho, Mendes et al. (2011), que, em condições de laboratório, prefere se alimentar de milho não *Bt*. Este comportamento também foi observado em populações de laboratório de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lep.: Noctuidae). No entanto, não é conhecida a extensão desse comportamento no campo, nem a propensão de insetos de outras espécies a terem este comportamento (MALLET; PORTER, 1992).

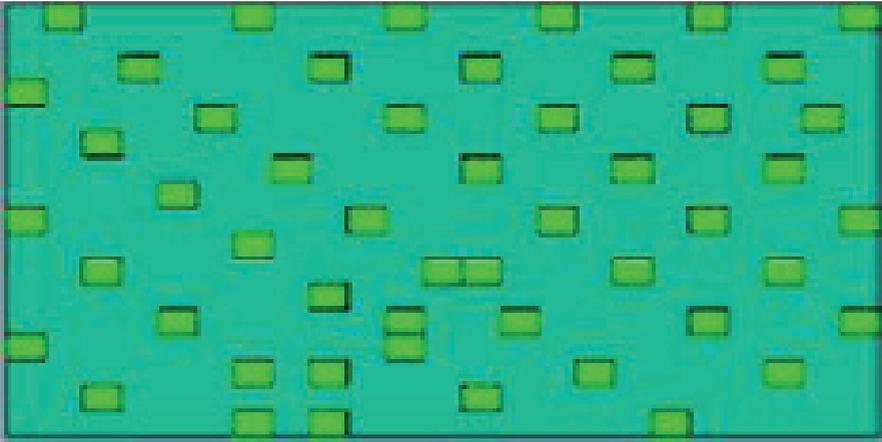


Figura 4. Representação esquemática da estratégia de mistura de sementes, onde os pequenos quadrados verdes representam plantas não *Bt* distribuídas aleatoriamente dentro de uma lavoura de uma cultura *Bt*.

Expressão Seletiva, Local e Temporal, de Proteínas *Bt*

A produção de proteínas em apenas alguns tecidos da planta, ou em algum tempo específico da fenologia da planta, é uma estratégia de manejo, a qual procura minimizar a superexposição à proteína *Bt*. A engenharia de plantas transgênicas tenderá a trabalhar no sentido de expressar os genes apenas em períodos necessários, ou apenas nos tecidos da planta que são, economicamente, mais importantes ou vulneráveis (FRUTOS et al., 1999). No entanto, essa estratégia ainda é teórica, pois os eventos ou híbridos

disponíveis no mercado, hoje, expressam a proteína de forma constitutiva (ODELL et al., 1985). As plantas também poderiam ser desenvolvidas para produzir a proteína somente após certo limiar de dano ou no caso de expressão em um tecido específico da planta. Estudos da interação entre algumas pragas-alvo e seus hospedeiros poderiam sugerir novas estratégias para o melhoramento de plantas.

Essa estratégia só funciona quando parte da população da praga não é exposta à proteína, ou seja, os tecidos que não expressam a proteína funcionam como refúgio, como citado anteriormente. Em milho, é interessante observar que a principal praga da cultura no Brasil, *S. frugiperda*, na fase de larva se alimenta de diferentes tecidos da planta, tais como: folhas, pendão, espiga, e sob determinadas condições podem também se alimentar das pontas das raízes adventícias antes de penetrar no solo e na região do coleto das plantas novas (WAQUIL et al., 2003), e a estratégia estaria disponível apenas em uma parte do ciclo vegetativo. Para a maioria das espécies, não se sabe o suficiente sobre o comportamento no campo, e, portanto, métodos eficazes de expressão em tecidos específicos ou expressão temporal de proteínas *Bt* não são ainda conhecidos.

Plantas Armadilha

A estratégia de plantas-armadilha é similar ao refúgio, mas difere na teoria e, portanto, em uma categoria própria. Alstad e Andow (1995) desenvolveram essa teoria em 1995, usando simulações de computador do comportamento de *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae). Essa estratégia utiliza plantas *Bt* e plantas não *Bt*. As plantas *Bt* são usadas como uma armadilha e a cultura não *Bt* é cultivada nas proximidades. As culturas *Bt* são semeadas mais cedo e amadurecem mais cedo que a cultura principal, atraindo os insetos, os quais são mortos pela proteína.

Posteriormente, a cultura não *Bt* amadurece, mas os insetos já foram controlados pela armadilha *Bt* (ALSTAD; ANDOW, 1995). Infelizmente, simulações computadorizadas com outras espécies de insetos-praga falharam no uso dessa estratégia. Esta também poderia não ser bem sucedida para espécies como *H. virescens* ou *S. frugiperda* as quais, como mencionado anteriormente, demonstraram evitar plantas *Bt* quando tiveram chance de escolha entre plantas *Bt* e não *Bt* (FRUTOS et al., 1999).

Considerações Finais

Muitos são os benefícios atribuídos ao cultivo do milho *Bt*; dentre esses, podemos citar a redução expressiva das perdas e contaminação dos grãos com micotoxinas, devido aos danos causados pelos lepidópteros-praga, a redução da aplicação de inseticidas e, conseqüentemente, uma menor exposição do trabalhador e do ambiente a esses produtos, assim como uma maior facilidade de logística nos tratos culturais. Entretanto, o maior risco dessa tecnologia está na sua utilização de forma inadequada, pois a não observação das regras de refúgio pode levar à evolução de indivíduos resistentes, que não são mais sensíveis à tecnologia *Bt*.

Desse modo, os programas de manejo da resistência de insetos são de suma importância para a preservação dos benefícios da tecnologia *Bt* e são mais efetivos quando implementados de modo preventivo, ou seja, no início da evolução da resistência. Muitas vezes, o processo de conscientização e educação dos produtores não tem sido tão bem sucedido em algumas regiões do país. Alguns produtores resistem em plantar o refúgio, ou o fazem de maneira inadequada, indicando uma necessidade de melhoria na forma de comunicação. Os produtores também devem ser orientados a monitorar periodicamente suas lavouras para detectar possíveis falhas de controle, bem como a evolução de infestações por pragas

secundárias. O primeiro a ser prejudicado pelo uso inadequado da tecnologia é o próprio produtor, pois a falha de controle ocorrerá primeiro na sua própria lavoura, com perdas da produção e até com controle extra das pragas-alvo. Quando o manejo da resistência é realizado preventivamente, evita-se a adoção de medidas drásticas como, por exemplo, a necessidade de controle químico emergencial e até a retirada do referido evento do mercado. Assim, com a utilização da tecnologia responsavelmente, ela será prolongada e mais lucrativa para toda a cadeia produtiva e para o consumidor.

Agradecimentos

Ao Global Environment Facility (GEF) através do projeto LAC Biosafety - Latin American & Caribbean Biosafety – Construção de Capacidade Multipaíses para Atendimento ao Protocolo de Cartagena em Biossegurança, pela concessão de recursos para o desenvolvimento do trabalho.

Referências

ABRASEM. **Milho transgênico (geneticamente modificado):** distâncias mínimas de

isolamento: normas para o plantio. Brasília, 2009. Cartilha.

ALSTAD, D. N.; ANDOW, D. A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic

plants. **Science**, Washington, v. 268, p. 1894-1896, 1995.

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

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F₂ Screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 572-578, 1998.

ANDOW, D. A.; HUTCHISON, W. D. Bt-corn resistance management. In: MELLON, M.; RISSLER, J. (Ed.). **Now or never: serious new plans to save a natural pest control**. Cambridge: Union of Concerned Scientists, 1998. p. 19-66.

BATES, S. L.; ZHAO, J.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 57-62, 2005.

BAUER, L. S. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, p. 633-633, 1995.

BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de

insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; DIAS, G. (Ed.). **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. cap. 9, p. 179-204.

BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. Fitness of cry 1A-resistant and susceptible *Helicoverpa*

armigera (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton with reduced levels of Cry 1Ac.

Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 98, p. 1311-1319, 2005.

CAPRIO, M. A. Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 1021-1031, 1998.

CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.;

VASCONCELOS, C. A.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. **Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes**

a insetos-praga. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 25 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 135).

CHAUFAUX, J.; SEGUIN, M.; SWANSON, J. J.; BOURGUET, D.; SIEGFRIED, B. D.

Chronic exposure of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to CryIAb *Bacillus*

thuringiensis toxin. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, p. 1564-1570, 2001.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.;

LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus*

thuringiensis pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html>. Acesso em: 10 dez. 2010.

CTNBio. **Aprovações comerciais**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>>. Acesso em: 27 set. 2011.

ELLIS, R. T.; STOCKHOFF, B. A.; STAMP, L.; SHNEPF, H. E.; SCHWAB, G. E.; KNUTH, M.; RUSSELL, J.; CARDINEAU, G. A.; NARVA, K. E. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1137-1145, 2002.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.;

CRAIG, J. A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; BEL, Y.; VANRIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 132, p. 1-7, 1995.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 501-533, 2002.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). In: ROMEIS, J.; SHELTON, A. M.; KENNEDY, G. G. (Ed.). **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. New York: Springer, 2008. p. 40-84.

FISCHHOFF, D. A. Insect-resistant crop plants. In: PERSLEY, G. J. (Ed.). **Biotechnology and integrated pest management**. Wallingford: CAB International, 1996. p. 214-227.

FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, F. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 19, p. 227-276, 1999.

GASSER, C. S.; FRALEY, R. T. Genetically engineering plants for crop improvement.

Science, Washington, v. 244, p. 1293-1299, 1989.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus*

thuringiensis endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 615-636, 1992.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis***: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 350 p.

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

GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNALDS, A.; BUMGARNER, L.; MOAR, W. Selection

and genetic analyses of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 88, p. 1545-1559, 1995.

HERMAN, R. A.; WOLT, J. D.; HALLIDAY, W. R. Rapid degradation of the Cry1F

insecticidal crystal protein in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 7076-7078, 2002.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*.

Microbiological Reviews, Washington, v. 53, p. 242-255, 1989.

INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE. **An evaluation of the insect resistance management in Bt field corn**: a science based framework for risk assessment and risk management: report of an expert panel. Washington, 1998. 78 p.

JAMES, C. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**: 2008. Ithaca: International Service for the Acquisition of Ag-biotech Applications, 2009. (ISAAA. Briefs, 39).

JANMAAT, A. F.; WANG, P.; KAIN, W.; ZHAO, J. Z.; MYERS, J. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5859-5867, 2004.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, London, v. 24, p. 275-308, 1994.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M. R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G. W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S. V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 11, p. 194-200, 1993.

LEMESLE, V.; MAILLERET, L.; VAISSAYRE, M. Role of spatial and temporal refuges in the evolution of pest resistance to toxic crops. **Acta Biotheoretica**, Leiden, v. 58, p. 89-102, 2010.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2218-2223, 1997.

MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved

specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, p. 193-199, 2001.

MACGAUGHEY, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 229, p. 193-195, 1985.

MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Manejo da resistência: na era das plantas transgênicas.

Oecologia Australis, v. 15, p. 291-302, 2011.

MAIA, A. H. N. **Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas bt expressas em culturas transgênicas:**

quantificação de risco utilizando análise de incertezas. 2003. 108 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

MALLET, J.; PORTER, P. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? **Proceedings Of The Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 250, p. 165-169, 1992.

MARQUES, D. **O que você precisa saber sobre transgênicos**. Disponível em:

<http://www.cib.org.br/pdf/transgenicos_2.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2011.

MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas: relevância da implantação de estratégias proativas de manejo da resistência. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 34, p. 67-77, 2005.

MATTEN, S. R.; HEAD, G. P.; QUEMADA, H. D. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs. In: ROMEIS, J.; SHELTON, A. M.; KENNEDY, G. G. (Ed.). **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM program**. New York: Springer, 2008. p. 27-39.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M. S.; WAQUIL, J. M.

Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1 A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 239-244, 2011.

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M. **Uso do milho Bt no manejo integrado de lepidópteros-praga**: recomendações de uso. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 170).

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. Pragas: manejo integrado de pragas em lavouras plantadas com milho geneticamente modificado com gene bt (Milho Bt). In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 1). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/milhoBT.htm>. Acesso em: 17 out. 2011.

MENEZES, L.; CUNHA, J.; BISINOTTO, F.; ATTIE, J. Relatório biotecnologia. **Céleres**, p. 1-7, 2011.

NARANJO, S. E.; HEAD, G.; DIVELEY, G. P. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: introduction. **Environmental Entomology**, College Park, v. 34, p. 1178-1180, 2005.

ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. H.; LESSARD, P. A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, London, v. 313, p. 810-812, 1985.

OSTLIE, K. R.; HUTCHISON, W. D.; HELLMICH, R. L. **Bt corn and European corn borer**: long-term success through resistance management. St. Paul: University of Minnesota Extension Service, 1997.

PEREIRA, E. J. G.; STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. Inheritance of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 98, p. 621-629, 2008.

PEREZ, C. J.; SHELTON, A. M.; ROUSH, R. T. Managing diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to foliar applications of *Bacillus thuringiensis*: Testing strategies in field cages. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p.

1462-1470, 1997.

ROUSH, R. T.; MACKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 32, p. 361-380, 1987.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p. 775-806, 1998.

SHELTON, A. M.; TANG, J. D.; ROUSH, R. T.; METZ, T. D.; EARLE, E. D. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 339-342, 2000.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 845-881, 2002.

SIEGFRIED, B. D.; SPENCER, T.; CRESPO, A. L.; STORER, N. P.; HEAD, G. P.; OWENS, E. D.; GUYER, D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. **American Entomologist**, Baltimore, v. 53, p. 208-214, 2007.

SIQUEIRA, H. A. A.; MOELLENBECK, D.; SPENCER, T.; SIEGFRIED, B. D. Cross-

resistance of Cyr1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus*

thuringiensis delta-endotoxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 97, p. 1049-1057, 2004.

SYNGENTA Biotecnologia: a Syngenta sempre fez primeiro. 2010.
Disponível em:

<<http://www.syngenta.com/country/br/pt/sobreasyngenta/biotecnologia/Pages/biotecnologianobrasil.aspx>>. Acesso em: 15 mar. 2011.

TABASHNIK, B. E. Delaying insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. **Proceedings Of The Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 255, p. 7-12, 1994a.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 47-79, 1994b.

TABASHNIK, B. E.; CUSHING, N. L.; FINSON, N.; JONHSON, M. W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Colege Park, v. 83, p. 1671-1676, 1990.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIERE, Y. Insect

resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 199-202, 2008.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; MAAGD, A.; DENNEHY, T. J. Cross-resistance of pink

bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and**

Environmental Microbiology, Washington, v. 66, p. 4582-4584, 2000.

TANG, J. D.; COLLINS, H. L.; METZ, T. D.; EARLE, E. D.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T.;

SHELTON, A. M. Greenhouse tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 94, p. 240-247, 2001.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Biopesticides registration action**

document: *Bacillus thuringiensis* plant-incorporated protectants. Washington, 2001. Disponível em: <http://www.epa.gov/opppppd1/biopesticides/pips/bt_brad.htm>. Acesso em: 26 set. 2011.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **FIFRA scientific advisory panel.**

subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-pesticides and resistance management. Washington, 1998.

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

VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application.** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 219-236.

VILARINHO, E. C. **Marcação de *diatraea saccharalis* (fabr.) (lepidoptera:crambidae) e dispersão de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)(Lepidoptera: noctuidae).** 2007. 59 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VILELLA, F. M. F.; WAQUIL, J. M.; VILELA, E. F.; SIEGFRIED, B. D.; FOSTER, J. E. Selection of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (smith) (Lepidoptera: noctuidae) for survival on cry 1a(b) bt toxin francys. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, p. 12-17, 2002a.

VILELLA, F. M. F.; WAQUIL, J. M.; VILELA, E. F.; VIANA, P. A.; LYNCH, R. E.; FOSTER, J. E. Resistance of bt transgenic maize to lesser cornstalk borer (Lepidoptera: pyralidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 652-653, 2002b.

WAQUIL, J. M. Manejo da resistência em insetos-praga. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. (Ed.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas**: o algodão resistente a insetos como estudo de caso. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p. 238.

WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A.; CRUZ, I. **Manejo de pragas na cultura do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 27).

WAQUIL, J. M.; VILLELLA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete lagoas, v. 1, p. 1-11, 2002.

WHALON, M. E.; MILLER, D. L.; HOLLINGWORTH, R. M.; GRAFIUS, E. J.; MILLER, J. R. Selection of a colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 86, p. 226-233, 1993.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P.; FEDERICI, B. A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 10536, 1997.

WOLFENBARGER, L. L.; NARANJO, S. E.; LUNDGREN, J. G.; BITZER, R. J.; WATRUD, L. S. Bt Crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. **Plos One**, São Francisco, v. 3, p. 11, 2008.

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

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 532-536, 1997.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; COLLINS, H. L.; BATES, S. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 102, p. 8426-8430, 2005.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

