

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTRATÉGIA DE MISTURA DE SEMENTES EM EVENTOS DE MILHO
BT “PIRAMIDADO” A *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Luciano Nogueira

Engenheiro Agrônomo

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTRATÉGIA DE MISTURA DE SEMENTES EM EVENTOS DE MILHO
BT “PIRAMIDADO” A *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Luciano Nogueira

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola).

2018

N778e Nogueira, Luciano
Estratégia de mistura de sementes em eventos de milho Bt
"piramidado" a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae) / Luciano Nogueira. -- Jaboticabal, 2018
93 p. : il., tabs. + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Arlindo Leal Boiça Júnior

1. Lagarta-do-cartucho. 2. Manejo de resistência. 3. Refúgio na
sacaria. 4. Movimentação larval. 5. Piramidação de genes. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTRATÉGIA DE MISTURA DE SEMENTES EM EVENTOS DE MILHO BT
"PIRAMIDADO" A *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)

AUTOR: LUCIANO NOGUEIRA

ORIENTADOR: ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR

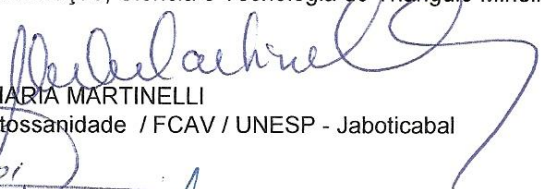
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



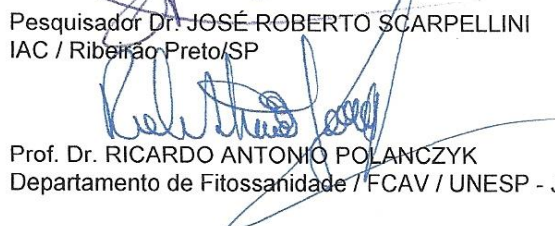
Profa. Dra. MARINA ROBLES ANGELINI
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro / Uberlândia/MG



Profa. Dra. NILZA MARIA MARTINELLI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisador Dr. JOSÉ ROBERTO SCARPELLINI
IAC / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 09 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANO NOGUEIRA – Natural de Ipameri-GO, nascido em 07 de julho de 1983, filho de Artur Nogueira e Ilma Vaz Nogueira, é Engenheiro Agrônomo graduado pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Urutaí, GO, no ano de 2013. Durante o curso de graduação desenvolveu atividades de pesquisa na área de concentração em Entomologia Agrícola, subárea Resistência de Plantas a Insetos (RPI), sendo bolsista de iniciação científica (PIBIC/IF Goiano), sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Gonçalves de Jesus. Em agosto de 2013, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal, SP, atuando na linha de pesquisa RPI, sob a orientação do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior. Durante o curso de mestrado foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Obteve o título de mestre em fevereiro de 2015. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela mesma instituição, atuação e orientação, com bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Atualmente é docente da Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Ipameri, GO, atuando nos Cursos de Agronomia e Engenharia Florestal, ministrando as disciplinas de Entomologia Básica e Aplicada.

E-mail: lucianonogueiraagro@gmail.com

*“O que quer que
você seja, seja bom
nisso. ”*

[Abraham Lincoln].

DEDICO...

*Aos meus pais **Artur Nogueira** e **Ilma Vaz Nogueira**,*

á quem devo muito do que aprendi em minha vida.

Pelo apoio incondicional e palavras de ânimo e coragem nos momentos mais difíceis.

*Àquela cuja presença sempre será lembrada e
a ausência sempre sentida:*

*Minha avó **Divina Dias Tosta**[†],*

*sua garra e seu exemplo são continuidade
na concretização do meu ideal.*

OFEREÇO...

*As minhas irmãs **Fernanda Nogueira** e **Juliana Nogueira**,*

pelo incentivo e apoio em minhas decisões.

*Aos meus sobrinhos, pelos olhares cheios de amor, que me fortalece
nos momentos mais difíceis.*

HOMENAGEIO...

*“Os que confiam no Senhor
serão como o monte de Sião, que
não se abala, mas permanece
para sempre. ”*

Salmos 125: 1.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que a vida me tem proporcionado.

Ao orientador, Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, pela valiosa orientação, ensinamentos, confiança, oportunidade e pela amizade.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal (UNESP/FCAV), por toda estrutura necessária para a condução da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado durante o desenvolvimento desta pesquisa (Processo: 1499563).

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) (PPG-EA), pela oportunidade de crescimento pessoal, profissional e realização do curso.

Aos docentes do PPG-EA, pelos ensinamentos e valiosos conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

Aos Professores, Dra. Nilza Maria Martinelli e Dr. Ricardo Antonio Polanczyk pela participação e valiosa colaboração no meu Exame Geral de Qualificação.

Ao Dr. Anderson Rodrigo da Silva do IF Goiano - Campus Urutaí-GO, pelas valiosas contribuições na análise estatística dos dados.

As empresas, Syngenta e Monsanto do Brasil Ltda. pela cessão das sementes utilizadas nos experimentos.

Ao Técnico Agrícola Marcelo Scatolin e aos funcionários da Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão (FEPE) por todo auxílio e suporte nas atividades de campo e pelo companheirismo.

Aos colegas que estão ou que fizeram parte do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos (LARPI), Bruno Henrique Sardinha de Souza, Eduardo Neves Costa, Mirella Marconato Di Bello, Wellington Ivo Eduardo, Renato Franco de Oliveira Moraes, Marcelo Mueller de Freitas, Paulo Henrique Soares Barcelos, Stéfane Carolina da Silva Quista e Carlos Alessandro de Freitas pela amizade e auxílio em diversas atividades.

Aos estagiários que passaram pelo LARPI, Maila Simogaki, Cinthia Luzia Teixeira Silva, Thaísa Manduca de Andrade, João Marcos Delfino Lopes, Tony de Lima Moura e Gabriel Galvão Lança Silvio, por todo o auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao amigo, Cirano Cruz Melville pelo convívio agradável, companheirismo e pela inestimável amizade.

Ao orientador de graduação Prof. Dr. Flávio Gonçalves de Jesus, pela amizade, oportunidade, ensinamentos e incentivo quando iniciei os trabalhos em pesquisa voltados para a área de Entomologia Agrícola.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade em especial: Lígia Dias Tostes Fiorezzi, Cibele da Silva Anton e José Altamiro de Souza, pela amizade e atenção sempre dispensada.

Aos amigos de trabalho da Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Ipameri - GO pela amizade e convívio.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução.....	2
2. Revisão de literatura.....	4
2.1. Aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	4
2.2. Milho Bt no manejo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	6
2.3. Resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt.....	8
2.4. Estratégias de manejo de resistência a <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt.....	9
3. Referências.....	14
CAPÍTULO 2 - SOBREVIVÊNCIA, DESENVOLVIMENTO E MOBILIDADE LARVAL DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM MILHO BT PIRAMIDADO E NÃO-BT.....	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1. Introdução.....	24
2. Material e métodos.....	26
2.1. Condições experimentais.....	26
2.2. População de <i>Spodoptera frugiperda</i>	26

2.3. Milho Bt e não-Bt.....	27
2.4. Sobrevivência e desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt e não-Bt.....	27
2.4.1. Semeadura e manutenção das plantas.....	27
2.4.2. Biologia de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt e não-Bt.....	28
2.5. Mobilidade e injúrias de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt e não-Bt.....	29
2.5.1. Esquemas de plantio.....	29
2.5.2. Semeadura e condução das plantas.....	30
2.5.3. Infestação artificial e avaliação da mobilidade de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	30
2.6. Análise estatística.....	31
3. Resultados.....	33
3.1. Sobrevivência e desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt piramidado e não-Bt.....	33
3.2. Mobilidade e injúrias de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt piramidado e não-Bt.....	36
4. Discussão.....	51
5. Conclusões.....	56
6. Referências.....	57
CAPÍTULO 3 – MISTURA DE SEMENTES DE MILHO BT “PIRAMIDADO” NO MANEJO DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	64
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65

1. Introdução.....	66
2. Material e métodos.....	68
2.1. Local do experimento.....	68
2.2. Milho Bt e não-Bt.....	68
2.3. Semeadura e condução do experimento.....	69
2.4. Delineamento experimental.....	70
2.5. Amostragem de campo.....	70
2.6. Análise estatística.....	71
3. Resultados.....	72
3.1. Eficácia em campo das proteínas inseticidas em mistura de sementes.	73
3.2. Eficácia a campo dos eventos de milho Bt piramidado.....	77
3.3. Rendimento de grãos.....	78
4. Discussão.....	79
5. Conclusões.....	83
6. Referências.....	84
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
Referências.....	90
APÊNDICES.....	91

**ESTRATÉGIA DE MISTURA DE SEMENTES EM EVENTOS DE MILHO BT
“PIRAMIDADO” A *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

RESUMO – Os eventos de milho Bt que expressam as proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner são importantes ferramentas para o manejo da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Um dos problemas associados ao cultivo de plantas Bt, tem sido a ausência de não-conformidade dos refúgios e eventos que não apresentam alta dose da proteína inseticida. A estratégia de mistura de sementes tem sido utilizada como uma ferramenta para tentar reduzir a baixa adoção de áreas de refúgio. No entanto, existe uma grande preocupação com relação a sua eficácia em retardar a evolução da resistência, principalmente em relação a movimentação e sobrevivência da praga. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar: 1) em condições de laboratório, a sobrevivência e o desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* expostas ao longo da fase larval em milho Bt piramidado e não-Bt; 2) em casa de vegetação, a mobilidade das lagartas em quatro esquemas de plantio e, 3) em campo, avaliar a estratégia de mistura de sementes, em quatro proporções de mistura de sementes (2,5; 5,0; 7,5; e 10,0%) (Bt: não-Bt), nas safras (verão e inverno) em dois anos agrícolas em 2016 e 2017. Para a condução dos experimentos foram utilizadas as tecnologias de milho Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3 e suas respectivas linhas isogênicas (não-Bt). Na avaliação de sobrevivência e desenvolvimento, as lagartas de *S. frugiperda* expostas no milho Agrisure Viptera 3110 não completaram o desenvolvimento. As lagartas expostas ao longo do desenvolvimento no milho YieldGard VT Pro 3 sobreviveram, demonstrando que as proteínas Cry não controlam eficientemente as lagartas nos estágios finais de desenvolvimento. As lagartas de *S. frugiperda* foram capazes de se dispersar por até 1,20 m da planta de infestação nos esquemas de plantio com plantas não-Bt, tanto na linha de infestação, quanto nas linhas adjacentes. Quando dispostas no plantio com apenas plantas Bt, as lagartas foram eficientemente controladas pelos eventos de milho Bt. Os resultados de campo evidenciaram que a estratégia de mistura de sementes com Agrisure Viptera 3110 controla eficientemente as lagartas. No milho Yieldgard VT Pro 3 foi verificado alta incidência de plantas com injúrias causadas por *S. frugiperda*, principalmente nas safras de inverno. Os resultados de sobrevivência, movimentação e a alta incidência de injúrias nas plantas Bt em campo, com YeldGard VT Pro 3 demonstram que a estratégia de mistura de sementes pode não ser efetiva como uma estratégia de MRI para retardar a evolução da resistência a *S. frugiperda*. Os resultados observados neste estudo fornecem informações importantes em relação a estratégia de mistura de sementes para o manejo de resistência de *S. frugiperda* em áreas de milho Bt.

Palavras-chave: lagarta-do-cartucho, manejo de resistência, refúgio na sacaria, movimentação larval, piramidação de genes

SEED MIXTURE STRATEGY USING “PYRAMIDED” BT MAIZE EVENTS ON *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT - Maize events expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner proteins are important tools for the management of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (J.E. Smith). One problem associated with the cultivation of Bt plants is the difficulty in complying with refuge regulations by implementing events that do not produce high doses of insecticidal protein. The seed mixture strategy has been used as a tool to try to increase the adoption of refuge areas. However, there is great concern about their effectiveness in slowing the evolution of resistance, especially in relation to movement and pest survival. Thus, the objective of the present study was to evaluate the following: 1) the survival and development of *S. frugiperda* larvae exposed along the larval stage in “pyramided” Bt maize under laboratory conditions, 2), the mobility of larvae in four planting patterns under greenhouse conditions, and 3) the strategy of seed mixture under field conditions, in four Bt proportions (2.5, 5.0, 7.5, and 10.0%) (Bt: non-Bt), for two seasons (summer and winter crop) in 2016 and 2017. Agrisure Viptera 3110 and YieldGard VT Pro 3 maize hybrids and their respective isolines (non-Bt) were used to conduct the experiments. In the evaluation of survival and development, the *S. frugiperda* larvae exposed to Agrisure Viptera 3110 maize did not survive. Some larvae exposed to YieldGard VT Pro 3 throughout their development survived, demonstrating that Cry proteins do not efficiently control the larvae in late stages of development. *S. frugiperda* larvae were dispersed up to 1.20 m from the central plant in the planting patterns with non-Bt plants, both in the infestation line and adjacent lines. In the planting patterns with only Bt plants, fall armyworm larvae were efficiently controlled by the Bt maize hybrids. The field results showed that the seed mixture strategy with Agrisure Viptera 3110 efficiently controls larvae. There were incidences of *S. frugiperda* survival in Yeldgard VT Pro 3, with higher incidences in the winter crops under farm conditions in both years. The results of survival, movement, and high field incidence of injuries in field Bt plants with the Yeldgard VT Pro 3 hybrid demonstrate that the seed mixture strategy may not be effective as an insecticide resistance management (IRM) strategy to delay the evolution of resistance to *S. frugiperda*. The results of this study provide important information regarding the seed mixture strategy for the resistance management of *S. frugiperda*.

Keywords: fall armyworm, resistance management, larval moviment, refuge in the bag, gene pyramiding

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2 – SOBREVIVÊNCIA, DESENVOLVIMENTO E MOBILIDADE LARVAL DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM MILHO BT PIRAMIDADO E NÃO-BT

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 e não-Bt ao longo do desenvolvimento larval.....	33
Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência de <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt ao longo do desenvolvimento larval.....	34
Tabela 3. Duração ($\pm$ EPM) das fases de larva, pupa, larva-adulto, razão sexual e biomassa de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 e não-Bt em simulações de alimentação larval.....	35
Tabela 4. Duração ($\pm$ EPM) das fases de larva, pupa, larva-adulto, razão sexual e biomassa de pupas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas em milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt em simulações de alimentação larval.....	36
Tabela 5. Número médio ($\pm$ EPM) de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> nos esquemas de plantio de milho Bt piramidado com as tecnologias Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3 e suas respectivas plantas não-Bt em casa de vegetação.....	36

Tabela 6. Número médio ($\pm$ EPM) de lagartas e notas de injúrias de <i>Spodoptera frugiperda</i> aos 3, 9, e 15 dias após a infestação em quatro esquemas de plantio de milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 e não-Bt.....	38
--	----

Tabela 7. Número médio ($\pm$ EPM) de lagartas e notas de injúrias de <i>Spodoptera frugiperda</i> aos 3, 9, e 15 dias após a infestação em quatro esquemas de plantio de milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt (isolinha).....	41
--	----

CAPÍTULO 3 – MISTURA DE SEMENTES DE MILHO BT “PIRAMIDADO” NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Tabela 1. Análises de <i>Deviance</i> (ANADEV): % de plantas com injúria e % de plantas com nota de injúria ≥ 3 (escala Davis) ocasionadas por <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho Bt com as tecnologias Yeldgard VT Pro 3 e Agrisure Viptera 3110 em mistura de sementes nas safras de verão (2015/2016 e 2016/2017) e safra de inverno (2016 e 2017).....	72
---	----

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA): rendimento de grãos (kg ha^{-1}) em milho Bt com as tecnologias Yeldgard VT Pro 3 e Agrisure Viptera 3110 em mistura de sementes nas safras de verão (2015/2016 e 2016/2017) e safra de inverno (2016 e 2017).....	72
--	----

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2 - SOBREVIVÊNCIA, DESENVOLVIMENTO E MOBILIDADE LARVAL DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM MILHO BT PIRAMIDADO E NÃO-BT

- Figura 1.** Constituição das parcelas e distribuição das distâncias de movimento das lagartas de *Spodoptera frugiperda* nos esquemas de plantio com milho Bt piramidado e não-Bt..... 29
- Figura 2.** Médias e Intervalos de 95% de confiança para a proporção de sobrevivência de pupas (A) e emergência de adultos (B) de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt (isolinha) ao longo do desenvolvimento..... 34
- Figura 3.** Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho simulando RIB (planta central não-Bt, circundada com plantas Bt) com a tecnologia Agrisure Viptera 3110. A, B e C, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; D, E e F, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente..... 45
- Figura 4.** Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho (planta central Bt, circundada com plantas não-Bt) com tecnologia Agrisure Viptera 3110. A, B e C, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; D, E e F, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação..... 46

Figura 5. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho simulando refúgio estruturado (plantas não-Bt) isolinha da tecnologia Agrisure Viptera 3110. A, B e C, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; D, E e F, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente..... 47

Figura 6. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho simulando RIB (planta central não-Bt, circundada com plantas Bt) com tecnologia YieldGard VT Pro 3. A, B e C, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; D, E e F, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente..... 48

Figura 7. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho (planta central Bt, circundada com plantas não-Bt) com tecnologia YieldGard VT Pro 3. A, B e C, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; D, E e F, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente..... 49

Figura 8. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho, simulando refúgio estruturado (plantas não-Bt) isolinha da tecnologia YieldGard VT Pro 3. A, B e C, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; D, E e F, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente..... 50

CAPÍTULO 3 – MISTURA DE SEMENTES DE MILHO BT “PIRAMIDADO” NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Figura 1. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas de milho com injúrias nas safras de verão: 2015/2016 (A) e 2016/2017 (B); safras de inverno: 2016 (C) e 2017 (D) em milho Bt piramidado com a tecnologia YeldGard VT Pro 3..... 73

Figura 2. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas de milho com injúrias nas safras de verão: 2015/2016 (A) e 2016/2017 (B); safras de inverno: 2016 (C) e 2017 (D) em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110..... 74

Figura 3. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 nas safras de verão: 2015/2016 (A) e 2016/2017 (B) e safras de inverno: 2016 (C) e 2017 (D) em milho Bt piramidado com a tecnologia YeldGard VT Pro 3..... 76

Figura 4. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 nas safras de verão: 2015/2016 (A) e 2016/2017 (B) e safras de inverno: 2016 (C) e 2017 (D) em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110..... 77

Figura 5. Médias e Intervalos de 95% de confiança para o rendimento de grãos em milho Bt piramidado com as tecnologias YieldGard VT Pro 3 e Agrisure Viptera 3110..... 78

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

O uso de plantas geneticamente modificadas (GM) expressando proteínas inseticidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner que controlam insetos específicos representa um avanço significativo no manejo de pragas em todo o mundo (Erasmus et al., 2016). Dentre os benefícios da adoção das culturas Bt, estão a redução na utilização de inseticidas químicos, o manejo das principais pragas agrícolas e a redução dos riscos para organismos não-alvo (Hutchison et al., 2011; Tabashnik et al., 2013; Klümper e Qaim, 2014; Téllez-Rodriguez et al., 2014). Em todo o mundo, a maior área de cultivo é com Milho (*Zea mays* L.) Bt e no Brasil, é a segunda maior área, com uma taxa de adoção de mais de 95% da área cultivada no país (James, 2017), o que corresponde a mais de 14, 5 milhões de hectares.

A aprovação comercial do milho Bt no Brasil ocorreu em 2007 com eventos que expressavam apenas uma proteína inseticida (CTNbio, 2007). A partir de 2009 foram aprovados eventos em “pirâmide de genes” (expressando duas ou mais proteínas inseticidas) (CTNBio, 2009), como tática para aumentar a eficácia do milho Bt no controle da principal praga do milho, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). A lagarta-do-cartucho é uma praga altamente polífaga e com ocorrência em todo o hemisfério ocidental (Cruz et al., 2012; Nagoshi et al. 2015) e com populações resistente as proteínas Cry1F em Porto rico (Storer et al, 2010), Estados Unidos (Huang e al., 2014) e no Brasil (Farias et al., 2014; Huang et al., 2014; Monnerat et al., 2015), além de Cry1Ab (Omoto et al., 2016).

A evolução da resistência de pragas-alvo tanto a tecnologias Bt, como inseticidas é uma preocupação. As estratégias de manejo de resistência a insetos (MRI) são fundamentais para retardar a evolução da resistência e assegurar a sustentabilidade dos cultivos Bt (Huang et al., 2011). A estratégia de alta dose/refúgio e, eventos piramidados tem sido a mais recomendada.

A estratégia baseia-se em uma planta que expressa uma alta dose de proteínas Bt para matar o maior número possível de indivíduos da praga-alvo, incluindo os heterozigotos (RS) (Onstad et al., 2011). Em uma área próximo ao milho

Bt, deve ser cultivada uma área com milho não-Bt de tamanho predeterminado (10% da área Bt) (IRAC, 2018). A área não-Bt serve como uma fonte de adultos suscetíveis (SS) da praga-alvo que irão se acasalar com os poucos adultos resistentes (RR) que poderão sobreviver na área Bt. A geração suscetível (SS) descendente será controlada pela alta dose da proteína Bt expressa na planta (Onstad et al., 2011; Tabashnik et al., 2013).

Adicionalmente as plantas Bt piramidadas, contêm dois ou mais genes que codificam diferentes proteínas Bt, sendo que cada proteína inseticida da pirâmide apresenta modos de ação únicos e independentes, resultando na elevada mortalidade da praga-alvo (Tabashnik et al., 2013; Tabashnik et al., 2014). No MRI a piramidação de genes pode ser classificada como estratégia de ataque múltiplo pois os insetos resistentes a uma das proteínas da pirâmide serão mortos por outras proteínas (Bates et al., 2005).

A não-conformidade das áreas de refúgio, associados ao uso de eventos que não expressam “alta dose”, foram apontados como os fatores determinantes para o aumento da evolução de resistência de *S. frugiperda* no Brasil (Omoto et al., 2016).

Para tentar reduzir o risco associado a baixa adoção de áreas de refúgio, tem sido sugerida uma estratégia alternativa, comumente referida como mistura de sementes (“*Refuge in the bag*” (RIB) ou “refúgio na sacaria”) (Gould, 1996; 1998; Carroll et al., 2012). Neste caso, um único saco de sementes contém uma proporção predeterminada de sementes de milho não-Bt junto as sementes Bt, eliminando assim, o problema de baixa ou não conformidade aos requisitos de refúgio. Assim, os produtores não precisam assumir a responsabilidade pelo plantio de refúgio estruturado (Gould, 1996; Onstad et al., 2011). Embora os produtos de mistura de sementes sejam muito práticos de um ponto de vista do monitoramento de plantio e conformidade, existe a preocupação com relação a sua eficácia em retardar a evolução da resistência, principalmente em relação a movimentação das lagartas (Mallet e Porter, 1992).

O comportamento alimentar e o movimento das lagartas de pragas-alvo que apresentam alta mobilidade pode desempenhar um papel importante na avaliação da estratégia de mistura de sementes para retardar a evolução da resistência (Davis e Onstad, 2000, Yang, 2017). Nos casos em que uma maior quantidade de lagartas

se movimentarem de plantas não-Bt para plantas Bt, estas podem ser expostas a subdoses das proteínas Bt, levando à sobrevivência de heterozigotos (RS) e um aumento na taxa de evolução da resistência (Murphy et al., 2010). Espécies que não exibem movimentação larval ou pouco móveis, como a broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) provavelmente não seria afetada pela mistura de sementes quando utilizado eventos de milho com pirâmide genes (Wangila et al., 2013). O contrário foi observado para a broca-européia do milho, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Onstad e Gould, 1998). Além da preocupação da mistura de sementes em retardar a evolução de resistência, alguns estudos sugerem que implantar essa estratégia ainda é melhor do que a não adoção de áreas de refúgio (Carroll et al., 2012).

No entanto, dados científicos que suportem a estratégia de mistura de sementes em milho Bt ainda são limitados e tem sido um tema discutido por mais de duas décadas (Mallet e Porter, 1992; Onstad et al., 2011; Carroll et al., 2012; Carrière et al., 2016). Estudos dos efeitos de misturas de sementes em milho Bt piramidado na sobrevivência e na movimentação de lagartas de *S. frugiperda* são ausentes. Estratégias adequadas de MRI são necessárias para *S. frugiperda*, pois a espécie é a única no mundo a desenvolver a resistência a proteína Cry1F, em três países, além de Cry1Ab no Brasil.

Neste contexto, visando otimizar estratégias para o manejo de resistência a *S. frugiperda* este trabalho objetivou, avaliar: 1) a sobrevivência e o desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* expostas ao longo da fase larval em milho Bt piramidado e não-Bt; 2) a mobilidade larval de *S. frugiperda* em quatro esquemas de plantio com milho Bt piramidado e não-Bt e, 3) a estratégia de mistura de sementes, em quatro proporções de mistura de sementes, nas safras de verão e inverno, em dois anos agrícolas (2016 e 2017) com milho Bt piramidado e não-Bt. Em todos os experimentos foram utilizados os eventos de milho Bt, MON 89034 × MON 88017 e Bt11 × MIR 162, referidos como Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3, respectivamente, e suas linhas isogênicas (não-Bt).

2. Revisão de Literatura

2.1. Aspectos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é uma praga migratória e cosmopolita nas regiões tropicais e subtropicais do Hemisfério Ocidental, (Luginbill, 1928; Adamczyk et al., 1999). O sucesso de colonização da espécie em grandes áreas está relacionado com a capacidade de dispersão dos adultos, permitindo sua rápida disseminação ao longo da faixa de distribuição de seus hospedeiros (Sparks, 1979).

No Brasil, *S. frugiperda* é a principal praga da cultura do milho, além de causar danos nas culturas do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merrill), hortaliças (Moscardi e Kastelic, 1985; Ali et al., 1990; Cruz, 1995; Casmuz et al., 2010), dentre outras culturas. Como é uma praga polífaga, em países de clima tropical como o Brasil, por causa da alimentação diversificada e disponível o ano todo, a sua distribuição geográfica e estacional é generalizada, ocorrendo em todas as regiões e em todas as estações do ano (Cruz et al., 2008). *S. frugiperda* é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta desenvolvimento completo, durante a sua fase de desenvolvimento passa por quatro fases distintas: ovo, lagarta, pupa e adulta (Luginbill, 1928; Pitre e Hogg, 1983).

Os adultos possuem hábito noturno e não são ativos durante o dia, sua atividade inicia próxima ao pôr-do-sol, atingindo o pico de atividade duas a quatro horas depois, ocasião em que ocorre o acasalamento, dispersão e migração (Sparks, 1979; Cruz, 1995). A mariposa fêmea inicia o período de oviposição entre o terceiro e quarto dia após a emergência sendo os ovos colocados agrupados. As posturas são colocadas em camadas, que pode variar de uma a quatro. Cada mariposa pode colocar em torno de 2.000 ovos durante o seu ciclo, agrupados em massas com 50 a 300 ovos (Cruz, 1995).

As lagartas passam por até seis instares larvais durante o seu desenvolvimento e a duração de cada ínstar depende da temperatura e do substrato alimentar. Quando neonatas (< 12 horas após a eclosão) estas alimentam do córion

(casca do ovo). Após esse primeiro alimento, estas permanecem em repouso por duas a dez horas, antes de sair em busca de outros alimentos. Completado esse período, caminham para a região do cartucho da planta de milho e iniciam a sua alimentação, passando para uma coloração esverdeada (Cruz, 1995; Busato et al., 2004). No segundo ínstar as lagartas apresentam o corpo com coloração esbranquiçada, com um sombreamento marrom no dorso e quando atingem o terceiro ínstar é possível visualizar três linhas dorsais de cor branco-amarelada longitudinalmente na região dorsal, e de cada lado das lagartas, uma na região dorso lateral (supraespiracular) de cor marrom escuro e uma subespiracular de cor amarela irregular (Villarreal, 1985; Pogue, 2002).

No quarto ínstar, as lagartas apresentam cabeça marrom-avermelhada e o dorso do corpo marrom-escuro, quando atingem o quinto ínstar, as lagartas são semelhantes às do quarto ínstar, apresentando coloração mais escura. Ao atingir o último ínstar as lagartas têm o corpo cilíndrico, com textura granular quando observada de perto (Cruz, 1995; Capinera, 2001).

As lagartas de *S. frugiperda* possuem duas características morfológicas principais que as diferenciam de outras lagartas do gênero, que são a presença de tubérculos e de um “Y” invertido na frente. Os tubérculos estão presentes em cada segmento abdominal em forma de trapézio, composto por quatro pináculos (pontos), de cor preta, as quais possuem uma área esclerotizada com um pelo curto engrossado na base (Villarreal, 1985; Pogue, 2002). A duração do período larval pode variar de 12 a 30 dias e as lagartas podem atingir 50 mm de comprimento (Cruz, 1995; Murúa e Virla, 2004; Murúa et al., 2008).

Quando completamente desenvolvida, a lagarta dirige-se para o solo passando pelo período de pré-pupa, podendo variar de um a dois dias, formando uma câmara pupal. O período pupal pode variar de 5 a 25 dias, no verão e inverno, respectivamente (Cruz, 1995).

A duração do ciclo é de aproximadamente 30 até 50 dias dependendo da temperatura e umidade (Cruz, 1995; Murúa e Virla, 2004). O número de gerações que podem ocorrer durante o ano depende da latitude e do habitat, sendo que em regiões tropicais como o Brasil, podem ocorrer até treze gerações ao ano (Afonso et al., 2009).

A lagarta-do-cartucho é a praga que mais causa preocupação ao produtor de milho. O comportamento larval da espécie em se alojar no interior do cartucho das plantas de milho dificulta a adoção de estratégias de controle (Cruz, 1995). Os sinais de presença da lagarta no interior do cartucho podem ser indicados pela presença de excrementos, ou pela abertura das folhas da região do cartucho das plantas.

As injúrias ocasionadas as plantas de milho podem ser observadas desde o início do desenvolvimento das lagartas. Nos instares iniciais estas raspam o tecido de uma das faces da folha, deixando intacta a epiderme membranosa da face foliar oposta, provocando o sintoma de folhas raspadas (Cruz, 1995). Quando atinge o segundo ínstar, perfuram as folhas, indo em direção ao cartucho da planta, local onde permanece até próximo ao estágio de pupa. Nos instares finais a lagarta consome grande quantidade de área foliar, destruindo completamente a parte basal das folhas em desenvolvimento. O ataque da lagarta em plantas de milho na fase de intenso desenvolvimento vegetativo pode ocasionar a destruição do cartucho da planta (Cruz, 1995). Em plantas novas a lagarta pode também penetrar no colmo, através do cartucho, fazendo galerias descendentes, até danificar o ponto de crescimento, ocasionando o sintoma denominado coração morto (Cruz et al., 1995; Casmuz et al., 2010).

Os danos de *S. frugiperda* na cultura do milho podem variar no decorrer do ciclo da cultura. No geral, as lagartas podem danificar as plantas de milho em todos os seus estágios de desenvolvimento, mas quando as plantas são atacadas nos estágios iniciais de desenvolvimento fenológico, a produção pode ser reduzida em até 60% (Andrews, 1988; Cruz, 1999).

2.2. Milho Bt no manejo de *Spodoptera frugiperda*

A descoberta de fontes de genes com resistência a insetos-praga em organismos além do reino vegetal, e posteriormente sua inserção em plantas de importância econômica, como o milho foi uma das mais sucedidas inovações biotecnológicas na agricultura mundial. As plantas transgênicas mais cultivadas

atualmente expressam proteínas inseticidas que quando ingeridas irão atuar no controle de espécies-alvo suscetíveis.

Estas proteínas são codificadas por genes oriundos da bactéria *B. thuringiensis*, um entomopatógeno de ocorrência ubíqua (solo, matéria orgânica, grãos armazenados, insetos mortos, água e superfícies de plantas) (Bravo et al., 1998). Durante o seu ciclo de vida essa bactéria é capaz de sintetizar diversas proteínas inseticidas (De Maagd et al., 2003). As proteínas mais difundidas na obtenção de plantas Bt tem sido as proteínas Cry (Cristal) e Vip (Proteínas Inseticidas Vegetativas) (Bravo et al., 2007; Chakroun et al., 2016).

Nas plantas de milho Bt proteínas tanto Cry como Vip são sintetizadas continuamente e a praga-alvo, é exposta diretamente à fração ativa da toxina. Em plantas que expressam proteínas Cry ao se alimentar do tecido da planta, o inseto suscetível ingere as toxinas. No intestino médio (IM) as toxinas atravessam a membrana peritrófica e se ligam a receptores específicos localizados na membrana apical de suas células colunares. As toxinas agem interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico da membrana apical, ocorrendo a formação de poros. Estes eventos provocam a lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do IM, levando o inseto à morte (Bravo et al., 2007).

O modo de ação das proteínas Vip3 é semelhante ao das proteínas Cry. Estas proteínas se ligam a receptores específicos do IM de insetos-alvo, no entanto, os receptores são distintos das proteínas Cry, na sequência ocorre a formação de poros específicos de cátions que interrompem o fluxo de íons no IM, causando paralisia e morte do inseto (Lee et al., 2006; Chakroun et al., 2016).

No Brasil a primeira aprovação do milho resistente a insetos-praga ocorreu em 2007 com a liberação do evento MON 810, que expressava a proteína Cry1Ab (CTNBio, 2007). Em 2008 foram aprovados os eventos Bt 11 e TC 1507, expressando as proteínas Cry1Ab e Cry1F, respectivamente. Em 2009 o evento MIR 162 (VIP3Aa20) (CTNBio, 2018). A primeira geração de milho Bt aprovada pela CTNBio foi composta por plantas que expressavam apenas uma proteína de *B. thuringiensis*, no entanto a partir de 2009 teve início a aprovação da segunda geração de plantas de milho Bt.

A segunda geração consistiu em plantas que expressam duas ou mais proteínas com ação inseticida (CTNBio, 2009). A principal contribuição da segunda geração de plantas Bt foi a possibilidade de inserção de genes com toxicidade independente para uma mesma praga-alvo, sendo denominadas nesse caso de plantas Bt piramidadas. O evento MON 89034 foi o primeiro evento piramidado, expressando as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2. Nos anos seguintes foram aprovados: em 2010, os eventos Bt 11 × MIR 162 (Cry1Ab/VIP3Aa20) e MON89034 × TC1507 (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F); em 2015, o evento TC1507 × MIR162 × NK603 (Cry1F/VIP3Aa20); em 2015 o evento TC1507 × MON810 × MIR162 (Cry1F/Cry1Ab/VIP3Aa20); em 2017, os eventos Bt11 × MIR162 × MON89034 (Cry1Ab/VIP3Aa20/Cry1A.105/Cry2Ab2); Bt11 × MIR162 × MON89034 (Cry1Ab/VIP3Aa20/Cry2Ab2) e MON89034 × TC1507 × NK603 × MIR162 (Cry1A105/Cry2Ab2/Cry1F/VIP3Aa20) (CTNBio, 2018).

Desde a liberação comercial do milho Bt no Brasil, este, tem se constituído em uma ferramenta eficaz no controle de *S. frugiperda*. Na safra de 2017 a adoção de milho Bt atingiu mais de 95% da área cultivada (James, 2017). A expressão contínua das proteínas inseticidas e a alta adoção de culturas Bt em campo pode colocar em risco a sustentabilidade da tecnologia (Tabashnik et al., 2008; Huang et al., 2011). Para que a tecnologia continue exercendo o seu papel no controle de *S. frugiperda* é de fundamental importância o uso de estratégias seguras que permitam o sucesso e a longevidade da tecnologia, principalmente aquelas direcionadas ao MRI a *S. frugiperda*.

2.3. Resistência de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt

A possibilidade da evolução da resistência em populações de pragas-alvo nas culturas Bt tem sido um grande desafio para o uso sustentável dessa tecnologia (Alstad e Andow, 1995; Tabashnik et al., 2008; Onstad, 2014). A evolução da resistência é o resultado da pressão de seleção que, conseqüentemente pode ocasionar mudanças na composição genética das populações aumentando a frequência relativa de indivíduos portadores de alelos de resistência (Crow, 1957). Para que o indivíduo seja considerado resistente, este deve ser capaz de sobreviver

alimentando-se de uma planta Bt, completar o seu ciclo de desenvolvimento e gerar descendentes férteis (Andow, 2008).

A evolução da resistência em populações de *S. frugiperda* já foi verificada em áreas com milho Bt que expressavam a proteína Cry1F em Porto Rico (Storer et al., 2010), Estados Unidos (Huang et al., 2014) e no Brasil (Farias et al., 2014; Huang et al., 2014; Monnerat et al., 2015), além da proteína Cry1Ab (Omoto et al., 2016) neste último.

A evolução da resistência em uma população de insetos-praga, é um processo governado por diversos fatores como: número de genes, dose e quantidade de modos de ação das proteínas expressas na planta Bt; aspectos genéticos da resistência dos insetos às proteínas Bt, incluindo a frequência inicial do alelo de resistência, grau de dominância, custo adaptativo associado e número de genes envolvidos e os aspectos bioecológicos da praga, como mortalidade, dispersão, número de gerações e acasalamento (Bates et al., 2005; Onstad, 2008; Head e Greenplate, 2012). Assim, para retardar a evolução da resistência é imprescindível a adoção de estratégias que garantam a baixa frequência inicial dos portadores de alelos de resistência na população de determinado da praga-alvo.

2.4. Estratégias de manejo da resistência a *S. frugiperda* em milho Bt

O manejo de resistência de insetos (MRI) pode ser definido como um conjunto de estratégias que tem a finalidade de impedir ou retardar a seleção de indivíduos resistentes em determinada população de uma praga-alvo, visando mantê-los em baixa frequência na população (Head e Greenplate, 2012). As principais estratégias de MRI utilizadas para eventos de milho Bt no Brasil e nos países que plantam culturas Bt tem sido a alta dose/refúgio e a piramidação de genes (Romeis et al., 2008; Tabashnik et al., 2013). A alta dose da proteína inseticida expressa na planta Bt torna ineficaz qualquer mecanismo que confere a praga-alvo níveis de resistência baixos ou moderados e assume-se que nessa condição, além dos indivíduos homozigotos suscetíveis (SS), a maioria dos heterozigotos (RS) serão mortos. O refúgio compreende uma determinada área, composta por plantas não-Bt, em que uma determinada parcela de indivíduos não expostos à pressão de seleção, possa

sobreviver e acasalar-se com os poucos indivíduos resistentes (RR) da área Bt e gerar descendentes heterozigotos (RS) (Matten et al., 2008; Onstad, 2014; Sappington, 2014).

Em campo, planta de “alta dose” é aquela que expressa a toxina em concentração pelo menos 25 vezes a que seria necessária para matar 99% de uma população suscetível de referência (Gould e Tabashnik, 1998; Burkness et al., 2011). Para avaliar se uma planta Bt é um evento de alta dose é necessário a obtenção de indivíduos da praga-alvo resistentes à proteína inseticida, os quais poderiam ser cruzados com os insetos homozigotos suscetíveis para obtenção dos heterozigotos que poderiam ser testados diretamente sobre a planta Bt. Nessa situação se a sobrevivência dos heterozigotos for $< 5\%$ o evento atende ao conceito de alta dose (Ghimire et al., 2011). Assim, assumindo a expressão de alta dose da toxina em determinada planta Bt, a evolução da resistência pode ser retardada.

No Brasil, a recomendação da proporção da área de refúgio em milho é de 10% de milho não-Bt (IRAC, 2018). O refúgio deve ser implementado de forma estruturada, podendo ser disposto de várias formas (por exemplo em blocos, faixas ou em perímetro, nas margens das áreas Bt). A área de refúgio deve ser cultivada com um híbrido não-Bt, com características agronômicas similares ao milho Bt, sendo necessário observar ainda, que o refúgio deve estar a menos de 800 metros de distância da área de milho Bt (IRAC, 2018).

No entanto, os reduzidos índices de adoção de áreas de refúgio (em torno de 20%) verificado no Brasil, associados ao uso de eventos que não expressam “alta dose”, têm sido apontados como os fatores determinantes para o aumento do risco de eficiência e sustentabilidade das tecnologias Bt (Omoto et al., 2016). Gould (1998) cita que regiões com baixa adoção ou inexistência de áreas de refúgio, podem contribuir para a elevação do risco de resistência de insetos em culturas Bt. Para tentar reduzir o risco associado a baixa adoção de áreas de refúgio, tem sido sugerida uma estratégia alternativa, comumente referida como mistura de sementes (“*Refuge in the bag*” (RIB) ou “refúgio na sacaria”) (Gould, 1996; 1998; Carroll; Head; Caprio, 2012).

A mistura de sementes de milho Bt e não-Bt, tem sido reconhecida como uma estratégia de MRI relevante (Burkness et al., 2015) devido a possibilidade de se criar

uma prática de manejo que possa ser diretamente influenciada pelas empresas de sementes e poderia desta forma fornecer refúgios efetivos (Kennedy et al., 1987; Gould, 1996). Na mistura de sementes uma porcentagem definida de sementes de milho não-Bt são misturadas com sementes de milho Bt diretamente pelas empresas, antes de serem comercializadas. Assim, os agricultores simplesmente adquirem as sementes já misturadas e realizam a semeadura. Desta forma, a estratégia eliminaria as incertezas sobre os níveis de adoção de refúgio em cada um dos campos cultivados com milho Bt e eliminaria o problema dos agricultores, pelo não cumprimento dos requisitos do refúgio estruturado (Onstad et al., 2011).

O uso da mistura de sementes garante que uma porcentagem apropriada de sementes não-Bt seja cultivada na mesma área da cultura Bt, além disso, a distribuição das sementes será relativamente uniforme na área Bt, e desta forma pode reduzir a probabilidade de acasalamento entre adultos resistentes as proteínas Bt, comparado com o refúgio estruturado (Bates et al., 2005).

No entanto, dados científicos que apoiem a estratégia de mistura de sementes em milho Bt ainda são limitados e tem sido um tema discutido por mais de duas décadas (Mallet e Porter, 1992; Carroll et al., 2012; Carrière et al., 2016). Embora a estratégia de mistura de sementes possa fornecer benefícios ao MRI em comparação com refúgio estruturado, uma grande preocupação é a movimentação das lagartas (por exemplo, resultar na sobrevivência e desenvolvimento) o que poderia afetar negativamente o refúgio e influenciar diretamente a evolução de resistência, principalmente em insetos com alta movimentação larval (Mallet e Porter, 1992; Onstad, 2017; Yang et al., 2017). O movimento larval de determinado inseto-praga pode fornecer informações importantes para o MRI. Por exemplo, (qual seria a probabilidade de um inseto-praga deixar uma planta Bt e se movimentar para uma não-Bt?) e/ou vice-versa (Onstad et al., 2017).

Em termos práticos as lagartas que se movem de plantas Bt para plantas não-Bt não receberia uma dose letal da proteína inseticida, e uma maior mobilidade de lagartas menos suscetíveis de plantas não-Bt para as Bt, poderia aumentar a sobrevivência dos heterozigotos e nesse caso aumentaria a seleção para a resistência (Mallet e Porter, 1992; Tabashnik et al., 2013). Além disso, o movimento de lagartas suscetíveis de plantas não-Bt para plantas Bt poderia reduzir a

sobrevivência dos indivíduos homozigotos suscetíveis e assim, resultar em uma população menor no refúgio (Davis e Onstad, 2000).

Em experimentos avaliando a ocorrência e a movimentação larval da broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) em mistura de sementes de milho Bt piramidado Wangila et al. (2013) verificaram que o movimento larval entre plantas foi alto e que as lagartas dispersaram por até 0,8 metros na linha infestada e nas linhas adjacentes, tanto nos tratamentos constituídos somente com plantas não-Bt, como naqueles com plantas Bt circundada por plantas não-Bt. O número de lagartas em plantas não-Bt, não diferiu significativamente entre refúgios em mistura e estruturado, indicando que as plantas de refúgio em mistura de sementes são capazes de fornecer uma população de *D. saccharalis* comparável com a do refúgio estruturado.

Adicionalmente, a mistura de sementes utilizando eventos Bt em pirâmide de genes (que combinam duas ou mais toxinas Bt) poderia reduzir a probabilidade de sobrevivência de larvas que se movimentam entre plantas Bt e não-Bt, principalmente as heterizogóticas (Carroll et al., 2012).

A piramidação de genes consiste na inserção de dois ou mais genes que codificam diferentes proteínas em uma planta Bt, e que cada proteína inseticida da pirâmide apresente modos de ação únicos e independentes, resultando na elevada mortalidade da praga-alvo (Tabashnik et al., 2013; Tabashnik et al., 2014). Com a piramidação de genes a evolução da resistência é retardada, uma vez que espécies pouco suscetíveis a uma toxina, podem ser mais suscetíveis a outra toxina expressa na planta Bt e vice-versa (Onstad e Meinke, 2010; Brévault et al., 2013). Assim, dentro do MRI a piramidação de genes pode ser classificada como estratégia de ataque múltiplo pois os insetos resistentes a uma das proteínas da pirâmide serão mortos por outras proteínas (Bates et al., 2005).

No entanto, para que uma planta Bt seja considerada piramidada é necessário que a mesma atenda aos critérios de baixa frequência inicial de alelos de resistência na população da praga-alvo para as proteínas da pirâmide, a resistência seja funcionalmente recessiva para os indivíduos-alvo, expressão das proteínas inseticidas com modos de ação distintos e ausência de resistência cruzada (Gould, 1998; Carrière et al., 2010). Desta forma, a frequência de alelos de resistência em

populações de campo deve permanecer baixa por um maior período de tempo (Carrière et al., 2010).

Para tanto, a estratégia de mistura de sementes deve ser avaliada e é certo que não seria uma estratégia adequada para todas as pragas (Carroll et al., 2012). Fatores como o conhecimento da composição da cultura, do complexo de pragas e a ecologia de pragas, associada a pressão de seleção e compatibilidade com o MIP são necessários para determinar se a estratégia de mistura de sementes ou o refúgio estruturado é o mais indicado.

3. Referências

Adamczyk JJ, Leonard BR, Graves JB (1999) Toxicity of selected insecticides to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in laboratory bioassay studies. **Florida Entomologist** 82: 230-236.

Afonso APS, Wrege M, Martins JFS, Nava DE (2009) Simulação do zoneamento ecológico da lagarta-do-cartucho no Rio Grande do Sul com o aumento de temperatura. **Arquivos do Instituto Biológico** 76:607-612.

Ali A, Luttrell RG, Pitre HN (1990) Feeding sites and distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton. **Environmental Entomology** 19:1060-1067.

Alstad DN, Andow DA (1995) Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science** 268:1894-1896.

Andow DA (2008) The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews** 4:142-199.

Andrews KL (1988) Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist** 71:630-653.

Bates SL, Zhao JZ, Roush RT, Shelton AM (2005) Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology** 23:57-62.

Bravo A, Gill S, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49:423-435.

Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M (1998) Quintero R. Characterization of cry genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology** 64:4965-4972.

Brévault T, Heuberger S, Zhang M, Ellers-Kirk C, Ni X, Massond L, Lib X, Tabashnik BE, Carrière Y (2013) Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110:5806-5811.

Burkness EC, O'Rourke PK, Hutchison WD (2011) Cross-pollination of nontransgenic corn ears with transgenic Bt corn: efficacy against lepidopteran pests and implications for resistance management. **Journal of Economic Entomology** 104:1476-1479.

Burkness EC, Cira TM, Moser SE, Hutchison WD (2015) Bt Maize Seed Mixtures for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): Larval Movement, Development, and Survival on Non-transgenic Maize. **Journal of Economic Entomology** 108:2761-2769.

Busato GR, Grützmacher AD, Oliveira AC, Vieira EA, Zimmer PD, Kopp MM, Bandeira JM, Magalhães TR (2004) Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology** 31:525-529.

Capinera, JL (2001) **Handbook of vegetable pests**. San Diego: Academic Press. 2700 p.

Carrière Y, Crowder DW, Tabashnik BE (2010) Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications** 3:561-573.

Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik BE (2016) Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? **Trends in biotechnology** 34:291-302.

Carroll MW, Head G, Caprio M (2012) When and where a seed mix refuge makes sense for managing insect resistance to Bt plants. **Crop Protection** 38:74-79.

Casmuz A, Juárez ML, Socías MG, Murúa MG, Prieto S, Medina S, Willink E, Gastaminza G (2010) Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina** 69:209-231.

Chakroun M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B, Ferré J (2016) Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 80:329-350.

Crow JF (1957) Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology** 2:227-246.

Cruz I (1995) **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 45 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 21).

Cruz I (2008) Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ JC, MONTEIRO DKMAR, MAGALHÃES PC (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 303-362.

Cruz I, Figueiredo M, Oliveira AC, Vasconcelos CA (1999) Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management** 45:293-296.

Cruz I, Figueiredo M, Silva RB, Silva IF, Paula CS, Foster JE (2012) Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize. **International Journal of Pest Management** 58:83-90.

CTNBio. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2007) **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos evento MON810**. Parecer Técnico N° 1.100/2007. Brasília, 19p.

CTNBio. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2009) **Liberação comercial do milho geneticamente modificado resistente a insetos evento MON89034**. Parecer Técnico N° 2052/2009. Brasília, 26 p.

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2018) **Plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização**. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>. Acesso em: 06 de jun. de 2018.

Davis PM, Onstad, DW (2000) Seed mixtures as a resistance management strategy for European corn borers (Lepidoptera: Crambidae) infesting transgenic corn expressing Cry1Ab protein. **Journal of Economic Entomology** 93:937-948.

De Maagd, RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf E (2003) Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics** 37:409-433.

Erasmus A, Marais J, Van den Berg J (2016) Movement and survival of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae within maize plantings with different ratios of non-Bt and Bt seed. **Pest Management Science** 72:2287-2294.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection** 64:150-158.

Ghimire MN, Huang F, Leonard R, Head GP, Yang Y (2011) Susceptibility of Cry1Ab-susceptible and-resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. **Crop Protection** 30:74-81.

Gould F (1996) Deploying pesticidal engineered crops in developing countries. In: Persley GJ (Ed.) **Biotechnology and Integrated Pest Management**. CABI: Wallingford, p.264-293.

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

Gould F, Tabashnik B (1998) Bt-Cotton Resistance Management. In: Mellon M, Rissler J. (Eds.). **Now or never: serious new plans to save a natural pest control**. Cambridge: Union of Concerned Scientists, p.65-105.

Head GP, Greenplate J (2012) The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. **GM Crops & Food** 3:144-153.

Huang F, Qureshi JA, Meagher Jr RL, Reisig DD, Head GP, Andow DA, Ni X, Kerns D, Buntin GD, Niu Y, Yang F, Dungal V (2014) Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS one** 9: e112958.

Hutchison WD, Burkness EC, Mitchell PD, Moon RD, Leslie TW, Fleischer SJ, Abrahamson M, Hamilton KL, Steffey KF, Gray ME, Hellmich RL, Kaster LV, Hunt TE, Wright RJ, Pecinovsky K, Rabaey TL, Flood BR, Raun ES (2010) Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science** 330:222–225.

IRAC- Insect Resistance Action Committee (2018) Recomendações de manejo da resistência a inseticidas e manejo de pragas para soja, algodão e milho no Brasil. [Online]. Insect **Resistance Action Committee**. Disponível em: [http://media.wix.com/ ugd/2bed6c_52f993a9b3ed4c548138d3fbf81c283c.pdf](http://media.wix.com/ugd/2bed6c_52f993a9b3ed4c548138d3fbf81c283c.pdf). Acesso em 28 de jun. 2018.

James C (2017) **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017** Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. Ithaca: ISAAAA, 2017. (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA Brief, 53).

Kennedy GG, Gould F, Deponti OMB, Stinner RE (1987) Ecological, agricultural, genetic and commercial considerations in the deployment of insect-resistant germplasm. **Environmental Entomology** 16:327-338.

Klümper W, Qaim M (2014) A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. **PLoS one**. 9:e111629.

Lee MK, Miles P, Chen J (2006) Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 339:1043-1047.

Luginbill P (1928) **The Fall Armyworm**. Washington: USDA: United States Department of Agriculture, 91 p. (USDA. Technical Bulletin, 34).

Mallet J, Porter P (1992) Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? **Proceedings of the royal society** 250:165-169.

Matten SR, Head GP, Quemada HD (2008) How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops within IPM programs. In: ROMEIS J, SHELTON AM, KENNEDY GG. **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. New York: Springer, p.27-39.

Monnerat R, Martins E, Macedo C, Queiroz P, Praça L, Soares CM, Moreira H, Grisi I, Silva J, Soberon M, (2015) Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins **PLoS one** 10:e0119544.

Moscardi F, Kastelic JG (1985) **Ocorrência de vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região de Sertaneja/PR.** In: EMBRAPA-CNPSO. Resultados de pesquisa de soja 1984/85. Londrina: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 128 p. (Embrapa/CNPSO. Documentos, 15).

Murphy AF, Ginzel MD, Krupke CH (2010) Evaluating western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) emergence and root damage in a seed mix refuge. **Journal of Economic Entomology** 103:147-157.

Murúa G, Virla E (2004) Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucuman (Argentina). **Acta Zoológica Mexicana** 20:199-210.

Murúa MG, Vera MT, Abraham S, Juárez ML, Prieto S, Head GP, Willink E (2008) Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. **Annals of the Entomological Society of America** 101:639-649.

Nagoshi RN, Rosas-García NM, Meagher RL, Fleischer SJ, Westbrook JK, Sappington TW, Hay-Roe M, Thomas JGM, Murúa GM (2015) Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology** 108:135-144.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72:1727-1736.

Onstad DW (2014) **Insect resistance management: biology, economics and prediction**, 2nd. London: Academic Press. 538 p.

Onstad DW, Crespo ALB, Pan Z, Crain PR, Thompson SD, Pilcher CD, Sethi, A (2017) Blended refuge and insect resistance management for insecticidal corn. **Environmental entomology** 47:210-219.

Onstad DW, Meinke LJ (2010) Modeling evolution of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) to transgenic corn with two insecticidal traits. **Journal of Economic Entomology** 103:849-860.

Onstad DW, Mitchell PD, Hurley TM, Lundgren JG, Porter RP, Krupke CM, Spencer JL, DiFonzo CD, Baute TS, Hellmich RL, Buschman LL, Hutchison WD, Tooker JF (2011) Seeds of change: corn seed mixtures for resistance management and integrated pest management. **Journal of Economic Entomology** 104:343-352.

Pitre HN, Hogg DB (1983) Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. **Journal of the Georgia Entomological Society** 18:187-194.

Pogue GM (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society** 43, 202 p.

Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG (2008) **Integration of insect-resistant genetically modified crops with IPM programs**. New York: Springer. 441 p.

Sappington TW (2014) Emerging issues in integrated pest management implementation and adoption in the North Central USA. In: Peshin R, Pimentel D. **Integrated Pest Management**. New York: Springer. p. 65-97.

Sparks AN (1979) A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist** 62:82-87.

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM (2010) Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology** 103:1031-1038.

Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology** 31:510-521.

Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carrière Y (2008) Insect resistance to bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology** 26:199-202.

Tabashnik BE, Mota-Sanchez D, Whalon ME, Hollingworth RM, Carrière Y (2014) Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology** 107:496-507.

Téllez-Rodríguez P, Raymond B, Morán-Berto I, Rodríguez-Cabrera L, Wright DJ, Borroto CG, Ayra-Prado C (2014) Strong oviposition preference for Bt over non-Bt maize in *Spodoptera frugiperda* and its implications for the evolution of resistance. **BMC Biology** 12:48.

Villarreal PJ (1985) **Manual de los principales insectos plagas del arroz en Piura**. CIPCA: Piura 55p.

Wangila DS, Leonard BR, Ghimire MN, Bai Y, Zhang L, Yang Y, Emfinger KD, Head GP, Yang F, Niu Y, Huang F (2013) Occurrence and larval movement of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in seed mixes of non-Bt and Bt pyramid corn. **Pest Management Science** 69:1163-1172.

Yang F, Kerns DL, Brown S, Head GP, Huang F (2017) Pollen contamination in seed mixture increases the dominance of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest management science** 73:2379-2385.

CAPÍTULO 2 – SOBREVIVÊNCIA, DESENVOLVIMENTO E MOBILIDADE LARVAL DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM MILHO BT PIRAMIDADO E NÃO-BT

RESUMO – Os eventos de milho (*Zea mays* L.) que expressam as proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner são ferramentas importantes e eficientes para o manejo da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), considerada a principal praga de milho nas regiões tropicais e subtropicais. O objetivo deste estudo foi avaliar: 1) em laboratório, a sobrevivência e o desenvolvimento de *S. frugiperda* exposta ao longo do desenvolvimento larval em milho Bt piramidado e não-Bt e 2) em casa de vegetação, avaliar a mobilidade larval em quatro esquemas de plantio com estas plantas de milho. Em todos os experimentos foram utilizados os eventos de milho Bt MON 89034 × MON 88017 e Bt11 × MIR 162, referidos como Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3, respectivamente, e suas linhas isogênicas (não-Bt). Para avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento de *S. frugiperda* em laboratório, as lagartas foram inicialmente alimentadas com seções de folhas de plantas não-Bt e após diferentes dias (D) de exposição (D-1, D-2, D-3, D-6, D-9, D-12 e D-15) foram transferidas para seções de folhas de plantas Bt. Como controle, as lagartas foram alimentadas durante todo o período larval apenas com as seções foliares Bt ou não-Bt. A avaliação da mobilidade larval constituiu-se de quatro esquemas de plantio em casa de vegetação, simulando diferentes cenários de campo: Trt 1- 27 plantas Bt; Trt 2- uma planta não-Bt no centro, circundada por 26 plantas Bt (refúgio na sacaria, RIB); Trt 3 - 27 plantas não-Bt (refúgio estruturado) e Trt 4 - uma planta Bt no centro, circundada por 26 plantas não-Bt (controle). Lagartas neonatas de *S. frugiperda* foram infestadas na planta central das parcelas dos tratamentos e avaliada a movimentação e injúrias ocasionadas pelas lagartas ao longo do desenvolvimento larval. Na avaliação de sobrevivência e desenvolvimento observou-se que as lagartas expostas no milho Agrisure Viptera 3110 não sobreviveram, o contrário foi observado em YieldGard VT Pro 3. Quanto a mobilidade, as lagartas de *S. frugiperda* foram capazes de se dispersarem por até 1,20 m da planta central nos esquemas de plantio com plantas não-Bt, tanto na linha de infestação, quanto nas linhas adjacentes. As lagartas foram capazes de se dispersar por até 1,2 m da planta infestação nos esquemas de plantio com plantas não-Bt. Além disso, as lagartas se movimentaram ao longo da linha de plantio e nas linhas adjacentes, evidenciando um elevado movimento larval entre as plantas. Nos esquemas de plantio com mistura de sementes, havia lagartas sobreviventes apenas em plantas não-Bt. Os resultados deste estudo podem contribuir para a implementação de estratégias de manejo de resistência de *S. frugiperda* em áreas de milho Bt.

Palavras-chave: lagarta-do-cartucho, mistura de sementes, movimentação larval, piramidação de genes, refúgio

CHAPTER 2 – SURVIVAL, DEVELOPMENT, AND LARVAL MOVEMENT OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN “PIRAMIDED” BT AND NON-BT MAIZE

ABSTRACT – Transgenic maize (*Zea mays* L.) events that express insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner are important tools for the control of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), considered to be the major maize pest in tropical and subtropical countries. Here we evaluated in the laboratory survival and development of FAW differentially exposed throughout larval development to pyramided Bt and non-Bt maize, and in the greenhouse we assessed FAW larval movement in four planting designs with those maize plants. In all experiments were used the Bt transgenic maize events MON 89034 × MON 88017 and Bt11 × MIR 162, hereafter referred to as Agrisure Viptera 3110 and YieldGard VT Pro 3, respectively, and their isogenic non-Bt lines. To evaluate FAW survival and development in the laboratory, larvae were initially fed on leaf sections of non-Bt plants and after different days (D) of exposure (D-1, D-2, D-3, D-6, D-9, D-12, and D-15) they were switched to leaf sections of Bt plants. As controls, larvae were fed the entire larval stage with Bt or non-Bt leaf sections only. Evaluation of larval movement consisted of four planting designs in the greenhouse simulating different field scenarios: Trt1- 27 Bt plants (Bt main field); Trt2- one central non-Bt plant surround by 26 Bt plants (refuge-in-the-bag, RIB); Trt3- 27 non-Bt plants (structured refuge); and Trt4- one central Bt plant surrounded by 26 non-Bt plants (control). *S. frugiperda* larvae exposed to Agrisure Viptera 3110 did not complete development; the opposite was observed for larvae fed YieldGard VT Pro 3. Larvae were able to disperse up to 1.2 m away from the central plant of larvae release in the planting designs with non-Bt plants; also, the larvae dispersed both along the planting row and to adjacent rows, evidencing high between-plant larval movement. In the planting designs with seed mixture, there were survivor larvae only in non-Bt plants. The results of this study can contribute to deployment of strategies of FAW resistance management in areas with Bt maize.

Keywords: fall armyworm, seed mixture, movement larval, gene pyramiding, refuge

1. Introdução

Plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam toxinas inseticidas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner foram cultivadas em mais de 83 milhões de hectares em todo o mundo em 2017 (James, 2017). Em todo o mundo o milho, *Zea mays* L. é o mais cultivado do que qualquer outra cultura Bt (James, 2017) e no Brasil, a área plantada com milho Bt, ocupa o segundo lugar, com mais de 14, 5 milhões de hectares (James, 2017). Dentre os benefícios das culturas Bt estão a redução do uso de inseticidas químicos (Tabashnik et al., 2013; Téllez-Rodriguez et al., 2014) e a supressão de algumas das principais pragas agrícolas, como a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

A praga está entre as mais severas da cultura no Brasil e em outros países da América do Sul (Butin et al., 2004; Cruz et al., 2012; Nagoshi et al., 2015). As lagartas acarretam desfolha nas plantas e podem causar perdas no rendimento em mais de 50% (Andrews, 1988; Cruz et al., 1999).

A primeira geração de milho Bt no Brasil foi comercializada a partir de 2007 (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança [CTNBio], 2007) para controle das principais pragas do milho. A segunda geração foi constituída por plantas de milho que expressam duas proteínas de Bt (CTNBio, 2010). O milho Bt foi rapidamente adotado pelos agricultores, constituindo mais de 80 % das áreas de cultivo de milho no Brasil (Céleres, 2017). No entanto, a expressão continua de proteínas inseticidas em plantas Bt expõe as pragas-alvo à elevada pressão de seleção, favorecendo a evolução de resistência como por exemplo em populações da lagarta-do-cartucho.

Em campo, já foi verificado populações da lagarta-do-cartucho com resistência em milho Cry1F, em Porto Rico (Storer et al., 2010), Estados Unidos (Huang et al., 2014) e Brasil (Farias et al., 2014; Huang et al., 2014), além de Cry1Ab (Omoto et al., 2016) podendo reduzir os benefícios da tecnologia. As estratégias de manejo de resistência a insetos – MRI para milho Bt têm sido largamente baseadas na expressão da proteína inseticida em alta dose e refúgio (Bates et al., 2005; Romeis et al., 2008; Tabashnik et al., 2013). Nesta estratégia assume que a resistência às toxinas Bt é funcionalmente recessiva na população da

praga, sendo que cada toxina Bt atua de forma isolada ou combinada (pirâmide de genes) e são altamente eficazes contra a mesma população da praga, e que uma fonte suscetível de indivíduos estará disponível para acasalar com quaisquer sobreviventes da cultura Bt (refúgio) (Gould, 1998; Andow, 2008). O refúgio pode ser disposto na forma de um refúgio estruturado, ou seja, bloco, perímetro ou faixas da cultura não-Bt, a no máximo 800 metros da área Bt (Gould, 1998; Tabashnik et al., 2009).

A alta adoção de culturas Bt tem evidenciado a preocupação de que os produtores não têm adotado as áreas de refúgio devido ao esforço adicional associado com o plantio de refúgio e menores retornos das culturas nessas áreas em comparação com o plantio Bt (Mallet e Porter, 1992; Murphy et al., 2010). Para tentar reduzir o problema da baixa adoção de áreas de refúgio pelos produtores, tem sido sugerida uma estratégia alternativa comumente referida como mistura de sementes ou “refúgio na sacaria” (*“Refuge in the bag”* ou RIB), transferindo assim, a responsabilidade da implementação do refúgio para as empresas detentoras da tecnologia (Gould, 1998; Carroll et al., 2012; Wangila et al., 2013).

No entanto a sobrevivência e o movimento larval de uma espécie-praga devem ser avaliados em uma possível estratégia de mistura de sementes, sobretudo para as espécies que apresentam alta capacidade de dispersão (Davis e Onstad, 2000). De acordo com Petzold-Maxwell et al. (2013), insetos que tendem a se dispersar no sentido da linha do plantio, estariam condicionados ao uso do refúgio estruturado, uma vez que nesse tipo de plantio os indivíduos podem encontrar o mesmo tipo de planta seja nos refúgios em blocos ou faixas. Por outro lado, o RIB pode aumentar a distribuição aleatória e acasalamento entre os insetos no campo, se não ocorrer o movimento das larvas entre as plantas Bt e não-Bt (Hutchison et al., 2010; Dhillon e Sharma, 2013). Para a broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), estudos anteriores evidenciaram que o RIB pode ser uma estratégia adequada para o MIR em milho Bt com pirâmide de genes (Wangila et al., 2013) e *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae) (Davis e Onstad, 2000; Siegfried e Hellmich, 2012). No entanto, estudos e informações sobre o movimento larval de *S. frugiperda* em milho Bt são escassos.

Neste contexto, visando a otimização de estratégias para o gerenciamento de resistência a *S. frugiperda*, objetivou-se avaliar: 1) em laboratório, a sobrevivência e o desenvolvimento de *S. frugiperda* exposta ao longo do desenvolvimento larval em milho Bt piramidado e não-Bt e 2) em casa de vegetação, avaliar a mobilidade larval em quatro esquemas de plantio com estas plantas de milho. Em todos os experimentos foram utilizados os eventos de milho Bt, MON 89034 × MON 88017 e Bt11 × MIR 162, referidos como Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3, respectivamente, e suas linhas isogênicas (não-Bt).

2. Material e Métodos

2.1. Condições experimentais

Os experimentos foram conduzidos em laboratório e em casa de vegetação no Departamento de Fitossanidade, Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Câmpus Jaboticabal, SP.

2.2. População de *Spodoptera frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* (~ 200 lagartas) foram coletadas em área de amendoim comercial, *A. hypogaea* L., em Jaboticabal, SP, Brasil, em 2011 (21° 24' 30.42" S 48° 28' 58.34" W; 608 m altitude). A coleta foi realizada em área sem aplicação de inseticidas. As lagartas foram colocadas em recipientes de criação (tubos de ensaio) de 39 cm³ fechados na extremidade com chumaço de algodão hidrófugo. Cada recipiente continha aproximadamente 7 cm³ de dieta artificial, proposta por Greene et al. (1976). As lagartas foram alimentadas em dieta artificial e os adultos em solução de mel a 10% (w v⁻¹). A criação foi mantida em laboratório sob condições controladas (Temperatura: 25 ± 2 °C; Umidade Relativa: 60 ± 10%, e fotoperíodo de (12L: 12D h).

2.3. Milho Bt e não-Bt

Dois híbridos de milho Bt contendo as tecnologias YieldGard® VT Pro™ 3 (evento MON 89034 (Cry1A.105 e Cry2Ab2) × MON 88017 (Cry3Bb1), Monsanto Company, Brasil) e Agrisure® Viptera™ 3110 TGTL Viptera (evento Bt11 (Cry1Ab) × Mir 162 (Vip3Aa20), Syngenta Seeds, Brasil) e suas isolinhas (milho não-Bt) foram utilizados nesse estudo. O milho Genuity YieldGard VT Pro 3 continha três genes Bt, incluindo Cry1A.105 e Cry2Ab2 para controle de lepidópteros pragas acima do solo e Cry3Bb1 para o controle de *Diabrotica* spp., pragas de raízes. Os híbridos apresentavam tolerância ao herbicida glifosato (Roundup®), pela expressão do gene *epsps*. Os híbridos de milho não-Bt expressavam a tolerância ao herbicida, mas não continha nenhuma das proteínas Bt. Ao longo do trabalho, para os híbridos de milho Bt foi adotada a denominação YieldGard VT Pro 3 para a tecnologia YieldGard® VT Pro™ 3 e Agrisure Viptera 3110 para a tecnologia Agrisure® Viptera™ 3110 TGTL Viptera.

2.4. Sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt e não-Bt

2.4.1. Semeadura e manutenção das plantas

As plantas de milho foram cultivadas em vasos plásticos com capacidade de 5 Litros (três plantas por vaso), com mistura de solo (Latossolo vermelho distrófico; Centurion et al., 1995), areia, e composto orgânico, na proporção 2:1:1. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (tela antiafídeo - 50 mesh) e irrigadas diariamente usando quantidades similares de água para evitar indução indesejada de estresse hídrico. Os experimentos foram iniciados utilizando-se folhas das plantas de milho Bt e suas respectivas isolinhas não-Bt no estágio de desenvolvimento vegetativo entre V4 e V6 (Magalhães e Durães, 2006).

2.4.2. Biologia de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt e não-Bt

As lagartas de *S. frugiperda* recém-eclodidas (menos de 24 h da eclosão) foram inoculadas individualmente em recipientes plásticos (5 cm diâmetro × 8 cm altura) contendo secções foliares (5 cm largura × 4 cm comprimento) da região do cartucho das plantas. A liberação das lagartas foi realizada com o auxílio de um pincel de pelo fino. Os recipientes continham ao fundo papel filtro umedecido com água deionizada. As simulações de alimentação larval, dias [D] (D-1, D-2, D-3, D-6, D-9, D-12 e D-15) consistiram em grupos de lagartas que foram alimentadas com milho não-Bt a partir do dia da eclosão e transferidas aos 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação [DAI] para milho Bt com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 ou YieldGard VT Pro 3. A simulação (NBt) foi constituída por lagartas alimentadas em milho não-Bt por todo o período de desenvolvimento larval, e (BtT) aquelas alimentadas somente com milho Bt. As secções foliares foram substituídas diariamente até a fase de pupação ou mortalidade completa dos insetos. Após a pupação, estas foram mantidas no mesmo recipiente contendo papel filtro ao fundo, o qual foi umedecido a cada 3 dias até a emergência do adulto.

As avaliações da sobrevivência e duração de cada estágio biológico de *S. frugiperda* foram realizadas diariamente. Ao atingir a fase de pupa (após 24 horas), foram pesadas em balança analítica de precisão 0.0001 g (Modelo Adventure AR2140, 2013, Ohaus Corporation, Florham, Park, NJ, EUA). As pupas foram sexadas observando a morfologia do abdome, conforme descrito por Luginbill (1928).

A razão sexual foi calculada através da fórmula $RS = \Sigma \text{fêmeas} / \Sigma (\text{fêmeas} + \text{machos})$. Após a emergência dos adultos, foi avaliada a longevidade, sem o fornecimento de alimento, a fim de investigar quanto tempo o inseto permaneceria vivo, com a energia adquirida por eles durante a fase larval mediante a alimentação nos híbridos de milho. Os dados de porcentagem de mortalidade das lagartas dos tratamentos com milho Bt foram corrigidos a partir dos respectivos tratamentos com milho não-Bt (Abbott, 1925). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições em cada tratamento, sendo cada repetição constituída por 5 lagartas, totalizando 100 lagartas por tratamento.

2.5. Mobilidade e injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt e não-Bt

2.5.1. Esquemas de plantio

O estudo da mobilidade larval e as injúrias provocadas pelas lagartas de *S. frugiperda* nas plantas foi realizado em casa de vegetação, sendo avaliado em quatro esquemas de plantio, os quais foram adaptados de Wangila et al. (2013). Cada esquema de plantio foi composto por parcelas constituídas de três linhas, com nove plantas em cada linha (27 plantas/esquema de plantio) (Fig. 1). O espaçamento foi semelhante ao utilizado nos campos de produção de milho no Brasil (50 cm entre linhas e 30 cm entre plantas).

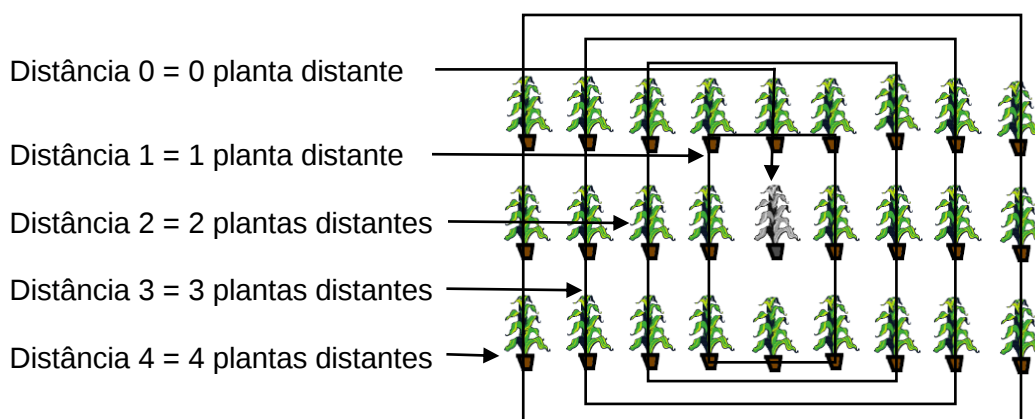


Figura 1. Constituição das parcelas e distribuição das distâncias de movimentação das lagartas de *Spodoptera frugiperda* nos esquemas de plantio com milho Bt piramidado e não-Bt. A distância 0 - refere-se a planta central inicialmente infestada com lagartas neonatas; distância 1 - refere-se a oito plantas, distantes uma planta da planta central; distância 2 - refere-se a seis plantas, localizadas a duas plantas da planta central; distância 3 - refere-se a seis plantas, distantes três plantas da planta central; distância 4 - refere-se a seis plantas periféricas localizadas a quatro plantas da planta central.

Os quatro esquemas de plantio (tratamentos [Trt]) foram: Trt 1 - 27 plantas Bt; Trt 2 - uma planta não-Bt no centro, circundada por 26 plantas Bt (refúgio na sacaria, RIB); Trt 3 - 27 plantas não-Bt (refúgio estruturado) e Trt 4 - uma planta Bt no centro, circundada por 26 plantas não-Bt (controle).

O esquema de plantio do Trt 2 foi projetado para simular um RIB (refúgio na sacaria) plantas não-Bt (96): plantas Bt (4%), enquanto o Trt 3 foi utilizado para simular uma área de “refúgio estruturado” de plantio. Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso com 5 repetições para cada esquema de plantio.

2.5.2. Semeadura e condução das plantas

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação (tela antiafídeo - 50 mesh). Para a condução dos experimentos as sementes dos híbridos de milho foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 5 Litros (três plantas por vaso), com mistura de solo (Latossolo vermelho distrófico; Centurion et al. 1995), areia, e composto orgânico, na proporção 2:1:1 e após a emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando uma planta por vaso. Nesse experimento foi adicionada adubação de plantio, com adição do equivalente a 350 kg/ha⁻¹ de nitrogênio-fósforo-potássio (NPK; 08-20-18 + 0,3% Zn; Fertilizantes Heringer S/A, Brasil). As plantas foram irrigadas sempre que necessário. Na fase vegetativa (V4) foi realizada a adubação de cobertura correspondente a 250 kg ha⁻¹ da formulação mineral NPK (30-00-10; Fertilizantes Heringer S.A, Brasil). A irrigação e eliminação de plantas daninhas foram realizadas sempre que necessário.

2.5.3. Infestação artificial e avaliação da mobilidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda*

As infestações com as lagartas de *S. frugiperda* foram realizadas no estágio vegetativo (V5) das plantas de milho. Foram liberadas 40 lagartas neonatas (até 12 horas após a eclosão) em cada esquema de plantio. A liberação das lagartas foi realizada na planta central de cada esquema de plantio (Trt) (Fig. 1), sendo liberadas na face adaxial das folhas na região do cartucho das plantas com o auxílio de um pincel de pelo fino.

As avaliações foram realizadas ao 3º, 9º e 15º dias após a infestação (DAI) das lagartas nas plantas de milho. Foram avaliados o número de lagartas por planta, nota visual de injúrias ocasionada pela alimentação e a mobilidade das lagartas de *S. frugiperda*.

Para a avaliação do número de lagartas de *S. frugiperda* por planta de milho, foram analisadas todas as plantas nos diferentes esquemas de plantio e registrado o número de lagartas. A determinação do número de lagartas por planta foi realizada verificando-se as três folhas centrais da região do “cartucho” das plantas.

Para a injúria das lagartas nas plantas foi atribuída uma nota de injúria, de acordo com a escala visual de nota de injúrias (escala Davis) (0 – nenhuma injúria visual a 9 –injúrias severas) (Davis et al., 1992) (Apêndice A).

A mobilidade das lagartas foi avaliada anotando a distribuição das lagartas nas diferentes distâncias avaliadas, em todas as avaliações. O número de lagartas foi distribuído categoricamente ao conjunto de distância: distância 0 - refere-se às plantas centrais que inicialmente foram infestadas com 40 lagartas neonatas de *S. frugiperda*; distância 1 - refere-se as plantas localizadas uma planta distante da planta central; distância 2 - refere-se as seis plantas localizadas duas plantas distantes da planta central; distância 3 - refere-se as seis plantas localizadas três plantas distantes da planta central; distância 4 - referem-se as seis plantas centrais periféricas localizadas quatro plantas distantes da planta central (Fig. 1), adaptado de Wangila et al. (2013).

2.6. Análise estatística

Os dados de crescimento e desenvolvimento de *S. frugiperda* foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Sminorv (Kolmogorov 1933, Smirnov 1939) para a verificação da normalidade dos resíduos e ao teste de Levene (Levene 1960) para a homogeneidade de variâncias. Os dados que não atenderem aos pressupostos de normalidade dos resíduos e/ou heterogeneidade das variâncias, foram submetidos à transformação mais adequada e em seguida submetidos ANOVA one-way ($P \leq 0,05$). Para a sobrevivência de pupas e emergência de adultos os tratamentos foram comparados a partir de intervalos de 95% de confiança para as proporções.

Os dados do experimento de mobilidade relacionados ao número de lagartas recuperadas do Trt 2 (plantas não-Bt; refúgio) foram separados daqueles das plantas Bt. Da mesma forma, os dados observados no Trt 4 (planta Bt no centro; circundada por plantas não-Bt). Dados sobre o número de insetos e notas de injúrias por planta foram transformados $\ln(x+1)$ e em seguida submetidos ANOVA one-way. As distâncias foram analisadas usando o teste LSD ($P \leq 0,05$). Para cada tratamento em cada um dos momentos de avaliação (dias), foi construído mapas de infestação de lagartas e mapas de injúrias usando o método da janela móvel de raio variável.

Todas as análises estatísticas dos dados foram realizadas usando o Software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2018).

3. Resultados

3.1. Sobrevivência e desenvolvimento de *S. frugiperda* em milho Bt piramidado e não-Bt

As lagartas de *S. frugiperda* de neoantas (D1) ao quinto ínstar (D5) quando expostas às folhas de milho Agrisure Viptera 3110, não completaram o desenvolvimento. O contrário foi observado no milho não-Bt (NBt) no qual 83% das lagartas atingiram a fase de pupa, com 76% de adultos emergidos (Tab. 1).

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 e não-Bt ao longo do desenvolvimento larval.

Tratamento ^a	Tempo de alimentação em milho não-Bt (d)	% sobrevivência larval a cada 3 dias								
		0	3	6	9	12	15	18	% pupas	% adultos
NBt	diariamente	100	96	91	90	90	88	85	83 ^c	76 ^c
D1	1	100	2	0	<i>-^b</i>	-	-	-	-	-
D2	2	100	7	0	-	-	-	-	-	-
D3	3	100	98	4	0	-	-	-	-	-
D6	6	100	97	92	31	0	-	-	-	-
D9	9	100	92	91	90	7	0	-	-	-
D12	12	100	96	93	91	91	18	0	-	-
D15	15	100	98	93	92	90	86	29	-	-
BtT	0	100	0	-	-	-	-	-	-	-

^aTratamento: NBtT, lagartas alimentadas em milho não-Bt; BtT, lagartas alimentadas apenas com milho Bt; D1, D2, D3, D6, D9, D12 e D15, lagartas alimentadas durante 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 15 dias em milho não-Bt e depois transferidas para milho Bt. ^bLagartas não completaram o ciclo de desenvolvimento. O número em itálico mostra o tempo e o número de lagartas que foram transferidas para milho não-Bt. ^cAnálise estatística não realizada devido ao número reduzido de repetições.

Nas simulações de exposição ao milho YieldGard VT Pro 3 foi verificada a sobrevivência de *S. frugiperda*, ao longo do desenvolvimento larval até a emergência do adulto (D1 - D15; Tab. 2).

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt ao longo do desenvolvimento larval.

Tratamento ^a	Tempo de alimentação em milho não-Bt (d)	% sobrevivência larval a cada 3 dias						
		0	3	6	9	12	15	18
NBt	diariamente	100	95	92	91	89	86	82
D1	1	100	20	14	13	9	9	9
D2	2	100	91	43	39	39	39	37
D3	3	100	96	28	28	27	27	26
D6	6	100	94	93	89	59	51	41
D9	9	100	97	96	94	71	50	42
D12	12	100	98	96	95	94	55	36
D15	15	100	96	93	91	92	90	63
BtT	0	100	43	20	17	13	13	6

^aTratamento: NBt, lagartas alimentadas em milho não-Bt; BtT, lagartas alimentadas apenas com milho Bt; D1, D2, D3, D6, D9, D12 e D15, lagartas alimentadas durante 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 15 dias em milho não-Bt e depois transferidas para milho Bt.

A sobrevivência de pupas variou de 16 a 43% e a emergência de adultos ente 14 e 39% (Figs 2A e 2B). Na simulação com exposição das lagartas durante toda a fase de desenvolvimento no milho Bt, 6% atingiram a fase adulta (dados não mostrados). As lagartas alimentadas com milho não-Bt, 83 e 76%, originaram pupas e adultos, respectivamente (Fig. 2A e 2B).

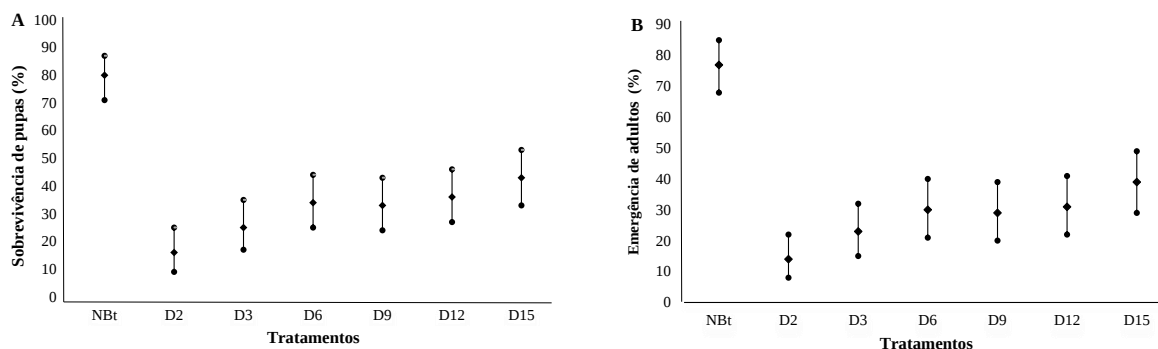


Figura 2. Médias e Intervalos de 95% de confiança para a proporção de sobrevivência de pupas (**A**) e emergência de adultos (**B**) de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt (isolinha) ao longo do desenvolvimento. Tratamentos: NBt, lagartas alimentadas em milho não-Bt; BtT, lagartas alimentadas apenas com milho Bt; D1, D2, D3, D6, D9, D12 e D15, lagartas alimentadas durante 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 15 dias em milho não-Bt e depois transferidas para milho Bt. Os tratamentos D1 e BtT não foram incluídos devido ao baixo número de indivíduos sobreviventes e/ou emergidos.

Nas simulações de exposição das lagartas de *S. frugiperda* de neonatas ao quinto ínstar, com o milho Agrisure Viptera 3110, não foi possível observar a duração das fases de desenvolvimento e crescimento devido a mortalidade total das lagartas expostas nos diferentes tempos, o mesmo ocorreu quando estas, foram expostas na simulação (Bt) por todo o período de desenvolvimento. Somente as lagartas expostas no milho não-Bt completaram as fases de desenvolvimento (Tab. 3).

Tabela 3. Duração em dias ($\pm$ EPM) das fases de larva, pupa, larva-adulto, razão sexual e biomassa de pupas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 e não-Bt em simulações de alimentação larval.

Tratamento ^a	Larva (d)	Pupa (d)	Larva-adulto (d)	RS(♀/♀+♂)	Biomassa de pupas (mg)
NBt	19,60 $\pm$ 0,25	10,58 $\pm$ 0,09	35,30 $\pm$ 0,32	0,56 $\pm$ 0,06	196,12 $\pm$ 3,25
D1	- ^b	-	-	-	-
D2	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	-	-
D6	-	-	-	-	-
D9	-	-	-	-	-
D12	-	-	-	-	-
D15	-	-	-	-	-
BtT	-	-	-	-	-

EPM – Erro Padrão da Média. ^aTratamento: NBt, lagartas alimentadas em milho não-Bt; BtT, lagartas alimentadas apenas com milho Bt; D1, D2, D3, D6, D9, D12 e D15, lagartas alimentadas durante 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 15 dias em milho não-Bt e depois transferidas para milho Bt. ^bLagartas não completaram o ciclo de desenvolvimento. Análise estatística não realizada devido ao número reduzido de tratamento.

No milho YieldGard VT Pro 3 duração das fases larval ($H_{6,95} = 33,47$; $P < 0,0001$), pupal ($H_{6,95} = 61,67$; $P < 0,0001$), e larva-adulto ($H_{6,95} = 29,33$; $P < 0,0001$) apresentaram diferenças significativas quando expostas ao longo do tempo nas simulações. A biomassa de pupas ($H_{6,95} = 29,48$; $P < 0,0001$) foi significativa entre as simulações. Para a razão sexual não houve diferenças significativas ($H_{6,95} = 3,62$; $P = 0,7270$) (Tab. 4).

Tabela 4. Duração em dias ($\pm$ EPM) das fases de larva, pupa, larva-adulto, razão sexual e biomassa de pupas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas em milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt em simulações de alimentação larval.

Tratamento ^a	Larva (d)	Pupa (d)	Larva-adulto (d)	RS(♀/♀+♂)	Biomassa de pupas (mg)
NBt	20,26 $\pm$ 0,18 ab	10,93 $\pm$ 0,11 a	34,87 $\pm$ 0,27 a	0,54 $\pm$ 0,05	241,38 $\pm$ 3,69 a
D1	- ^b	-	-	-	-
D2	20,87 $\pm$ 0,47 b	10,58 $\pm$ 0,19 ab	35,48 $\pm$ 0,64 a	0,43 $\pm$ 0,06	199,32 $\pm$ 5,77 b
D3	21,18 $\pm$ 0,38 b	8,87 $\pm$ 0,44 c	34,97 $\pm$ 0,65 a	0,50 $\pm$ 0,08	213,62 $\pm$ 5,79 ab
D6	21,86 $\pm$ 0,42 b	9,09 $\pm$ 0,11 c	34,34 $\pm$ 0,42 a	0,37 $\pm$ 0,08	174,75 $\pm$ 5,42 c
D9	21,42 $\pm$ 0,41 b	9,00 $\pm$ 0,13 c	34,31 $\pm$ 0,62 a	0,50 $\pm$ 0,07	185,52 $\pm$ 7,48 b
D12	20,92 $\pm$ 0,32 b	9,04 $\pm$ 0,18 c	33,61 $\pm$ 0,38 a	0,41 $\pm$ 0,06	178,25 $\pm$ 3,39 c
D15	19,38 $\pm$ 0,19 a	9,61 $\pm$ 0,16 b	32,21 $\pm$ 0,27 b	0,50 $\pm$ 0,06	178,25 $\pm$ 3,39 c
BtT	-	-	-	-	-

EPM – Erro Padrão da Média. ^aTratamento: NBt, lagartas alimentadas em milho não-Bt; BtT, lagartas alimentadas apenas com milho Bt; D1, D2, D3, D6, D9, D12 e D15, lagartas alimentadas durante 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 15 dias em milho não-Bt e depois transferidas para milho Bt. ^bMédia do tratamento não inserida devido ao número reduzido de repetições. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis).

3.2. Mobilidade e injúrias de *S. frugiperda* em milho Bt piramidado e não-Bt

A mobilidade das lagartas de *S. frugiperda* foi estatisticamente significativa entre os esquemas de plantio com Agrisure Viptera 3110 ($F_{5,25} = 31,22$; $P < 0,0001$) e YieldGard VT Pro 3 ($F_{5,25} = 15,08$; $P < 0,0001$) (Fig. 5). Lagartas vivas foram encontradas somente nos esquemas de plantio com plantas de milho não-Bt.

Tabela 5. Número médio ($\pm$ EPM) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* nos esquemas de plantio de milho Bt piramidado com as tecnologias Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3 e suas respectivas plantas não-Bt em casa de vegetação.

Esquema de plantio	Número de lagartas por planta			
	Agrisure 3110	Viptera	YieldGard Pro 3	VT
Trt 1: Plantas Bt	0,00 $\pm$ 0,04 c		0,00 $\pm$ 0,04 c	
Trt 2: uma planta não-Bt no centro, circundadas por 26 plantas Bt (RIB)	Plantas Bt 0,00 $\pm$ 0,04 c		0,20 $\pm$ 0,17 c	
	Plantas não-Bt 1,40 $\pm$ 0,20 a		1,20 $\pm$ 0,06 a	
Trt 3: Plantas não-Bt (refúgio estruturado)	0,68 $\pm$ 0,04 b		0,64 $\pm$ 0,06 b	
Trt 4: uma planta Bt no centro, circundadas por 26 plantas não-Bt	Plantas Bt 0,00 $\pm$ 0,04 c		0,00 $\pm$ 0,04 c	
	Plantas não-Bt 0,27 $\pm$ 0,04 c		0,32 $\pm$ 0,04 c	

EPM – Erro Padrão da Média. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$; Teste de LSD).

No esquema de plantio Trt 2 (RIB) com a tecnologia Agrisure Viptera foram recapturadas 1,40 lagartas por planta, e em YieldGard VT Pro 3 uma média de 1,20 lagartas (Tab. 5). No Trt 3 (refúgio estruturado) foram recuperadas, 0,68 e 0,64 lagartas em Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3, respectivamente. Lagartas vivas também foram observadas no Trt 4 (planta Bt no centro, circundadas por plantas não-Bt), com 0,27 lagartas em Agrisure Viptera 3110 e 0,32 lagartas em YieldGard VT Pro 3 (Tab. 5).

Ao observar as distâncias, no milho Agrisure Viptera 3110, houve diferenças significativas no número de lagartas vivas de *S. frugiperda* encontradas nos esquemas de plantio no terceiro DAI para a distância 0 ($F_{3,19} = 66,16$; $P < 0,0001$) (Tab. 6). Nos Trts 2 (1 planta não-Bt centro, 26 plantas não-Bt na parcela, RIB) e 3 (100% plantas não-Bt, refúgio estruturado) foram encontradas 6,80 e 5,00 lagartas, respectivamente. Nos Trts 1 (100% de plantas Bt) e 4 (1 planta Bt centro, 26 plantas não-Bt na parcela), não foi verificada a presença de lagartas. Nas demais distâncias (1 a 4) não foram encontradas lagartas sobreviventes. Na distância 1 ($F_{3,19} = 149,62$; $P < 0,0001$), o maior número de lagartas (0,92) por planta foi observado no esquema de plantio Trt 3, assim como nas demais distâncias. Na distância 2 ($F_{3,19} = 53,60$; $P < 0,0001$) e 3 ($F_{3,19} = 23,76$; $P < 0,0001$) o número de lagartas foi de 0,50 e 0,43, respectivamente. Na distância 4 ($F_{3,19} = 3,89$; $P < 0,0375$) o número de lagartas foi reduzido tanto no refúgio estruturado como no Trt 4 (Tab. 6).

Diferenças significativas foram observadas aos nove DAI de *S. frugiperda* em todos os esquemas de plantio e para todas as distâncias (Tab. 6). Na distância 0 ($F_{3,19} = 45,66$; $P < 0,0001$), foram verificadas lagartas vivas somente nos esquemas Trt 4 e Trt 3, 3,60 e 2,00 lagartas por planta, respectivamente. Na distância 1 ($F_{3,19} = 62,62$; $P < 0,0001$), o maior número médio de lagartas foi observado no Trt simulando refúgio estruturado (0,88). Na distância 2 ($F_{3,19} = 27,41$; $P < 0,0001$), o número médio de lagartas por planta foi de 0,40 e 0,30, no refúgio estruturado e Trt4, respectivamente. O número de lagartas vivas nas distâncias 3 ($F_{3,19} = 32,56$; $P < 0,0001$) e 4 ($F_{3,19} = 12,63$; $P = 0,0005$) foi maior no tratamento simulando refúgio estruturado, (0,73) e (0,33), respectivamente (Tab. 6).

Tabela 6. Número médio ($\pm$ EPM) de lagartas e notas de injúrias de *Spodoptera frugiperda* aos 3, 9, e 15 dias após a infestação em quatro esquemas de plantio de milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 e não-Bt.

Distância	Esquema de Plantio	Número médio de lagartas			Notas de Injúria		
		3	9	15	3	9	15
D0	Bt	0,00 $\pm$ 0,27 b	0,00 $\pm$ 0,13 c	0,00 $\pm$ 0,06 c	0,00 $\pm$ 0,21 b	0,00 $\pm$ 0,17 c	0,00 $\pm$ 0,06 c
	RIB	6,80 $\pm$ 1,23 a	3,60 $\pm$ 0,47 a	1,40 $\pm$ 0,18 a	3,20 $\pm$ 0,20 a	6,60 $\pm$ 0,17 a	8,00 $\pm$ 0,06 b
	Refúgio Estruturado	5,00 $\pm$ 0,95 a	2,00 $\pm$ 0,49 b	1,00 $\pm$ 0,06 b	4,00 $\pm$ 0,35 a	5,80 $\pm$ 0,26 b	8,40 $\pm$ 0,18 a
	Não Bt fora	0,00 $\pm$ 0,27 b	0,00 $\pm$ 0,13 c	0,00 $\pm$ 0,06 c	0,00 $\pm$ 0,21 b	0,00 $\pm$ 0,17 c	0,00 $\pm$ 0,06 c
D1	Bt	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,03 c	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,07 b	0,00 $\pm$ 0,13 c	0,00 $\pm$ 0,14 c
	RIB	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,03 c	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,07 b	0,05 $\pm$ 0,09 c	0,18 $\pm$ 0,15 c
	Refúgio Estruturado	0,92 $\pm$ 0,06 a	0,88 $\pm$ 0,06 a	0,73 $\pm$ 0,06 a	1,40 $\pm$ 0,15 a	4,05 $\pm$ 0,10 a	6,17 $\pm$ 0,42 a
	Não Bt fora	0,58 $\pm$ 0,05 b	0,48 $\pm$ 0,07 b	0,38 $\pm$ 0,07 b	1,22 $\pm$ 0,06 a	2,05 $\pm$ 0,20 b	3,28 $\pm$ 0,42 b
D2	Bt	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,02 b	0,00 $\pm$ 0,03 c	0,00 $\pm$ 0,04 c	0,00 $\pm$ 0,12 c	0,00 $\pm$ 0,34 b
	RIB	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,02 b	0,07 $\pm$ 0,06 c	0,00 $\pm$ 0,04 c	0,07 $\pm$ 0,06 c	0,47 $\pm$ 0,53 b
	Refúgio Estruturado	0,50 $\pm$ 0,04 a	0,40 $\pm$ 0,04 a	0,80 $\pm$ 0,03 a	0,90 $\pm$ 0,14 a	2,37 $\pm$ 0,21 a	5,17 $\pm$ 0,31 a
	Não Bt fora	0,30 $\pm$ 0,04 b	0,30 $\pm$ 0,06 a	0,37 $\pm$ 0,07 b	0,47 $\pm$ 0,13 b	1,53 $\pm$ 0,27 b	3,30 $\pm$ 0,64 a
D3	Bt	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,04 c	0,00 $\pm$ 0,01 c	0,00 $\pm$ 0,15 b	0,00 $\pm$ 0,15 c	0,00 $\pm$ 0,19 c
	RIB	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,04 c	0,07 $\pm$ 0,05 c	0,00 $\pm$ 0,15 b	0,00 $\pm$ 0,15 c	0,33 $\pm$ 0,36 c
	Refúgio Estruturado	0,43 $\pm$ 0,03 a	0,73 $\pm$ 0,03 a	0,53 $\pm$ 0,05 a	0,90 $\pm$ 0,15 a	3,03 $\pm$ 0,30 a	4,76 $\pm$ 0,17 a
	Não Bt fora	0,23 $\pm$ 0,06 b	0,30 $\pm$ 0,08 b	0,23 $\pm$ 0,03 b	0,74 $\pm$ 0,24 a	1,10 $\pm$ 0,37 b	2,43 $\pm$ 0,42 b
D4	Bt	0,00 $\pm$ 0,02 b	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,04 b	0,00 $\pm$ 0,07 b	0,00 $\pm$ 0,19 c
	RIB	0,00 $\pm$ 0,02 b	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,04 b	0,00 $\pm$ 0,07 b	0,13 $\pm$ 0,15 bc
	Refúgio Estruturado	0,17 $\pm$ 0,04 a	0,33 $\pm$ 0,06 a	0,37 $\pm$ 0,05 a	0,33 $\pm$ 0,10 a	1,80 $\pm$ 0,20 a	3,56 $\pm$ 0,43 a
	Não Bt fora	0,07 $\pm$ 0,05 ab	0,06 $\pm$ 0,06 a	0,10 $\pm$ 0,04 b	0,07 $\pm$ 0,05 b	0,23 $\pm$ 0,20 b	0,73 $\pm$ 0,29 b

EPM – Erro Padrão da Média. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$; Teste de LSD).

Na avaliação final, 15 DAI das lagartas, houve diferenças significativas entre o número médio de lagartas de *S. frugiperda* vivas por planta nos esquemas de plantio na distância 0 ($F_{3,19} = 82,81$; $P < 0,0001$), com 1,40 e 1,00 lagartas nos Trts com planta não-Bt no centro, refúgio na sacaria e refúgio estruturado (Tab. 6). Nas distâncias 1 ($F_{3,19} = 53,27$; $P < 0,0001$), 2 ($F_{3,19} = 34,58$; $P < 0,0001$), 3 ($F_{3,19} = 25,60$; $P = 0,0024$) e 4 ($F_{3,19} = 20,97$; $P < 0,0001$) o número de lagartas vivas por planta foi maior no Trt simulando o refúgio estruturado ($\geq 0,35$ lagartas por planta) (Tab. 6).

Quanto a nota de injúrias verifica-se que no milho com tecnologia Agrisure Viptera 3110, houve diferenças significativas nas injúrias causadas pelas lagartas de *S. frugiperda* na distância 0 ($F_{3,19} = 207,17$; $P < 0,0001$), com maiores valores médios de injúria nos Trts RIB (3,20) e 3 (4,00), ambos com plantas não-Bt no centro (Tab. 6). O Trt 1 (100% plantas Bt) não apresentou injúrias em nenhuma das distâncias.

Na distância 1 ($F_{3,19} = 96,68$; $P < 0,0001$) as maiores médias de injúrias foram observadas nos Trts 3 (1,40) e 4 (1,22), não diferindo entre si. Para a distância 2 ($F_{3,19} = 18,40$; $P < 0,0001$) a maior média de nota de injúria foi observada na simulação com refúgio estruturado (0,90). Na distância 3 ($F_{3,19} = 6,71$; $P = 0,0066$), nos Trts 3 e 4 foram observadas notas de injúria média de (0,90) e (0,74). Resultados semelhantes foram observados no Trt 3 (0,33) para a distância 4 ($F_{3,19} = 4,53$; $P = 0,0242$) (Tab. 6).

Aos nove dias, na distância 0 ($F_{3,19} = 1111,15$; $P < 0,0001$), a maior nota de injúria foi verificada na simulação com refúgio estruturado (5,80), seguida com RIB (6,60). Na distância 1 ($F_{3,19} = 303,25$; $P < 0,0001$) as maiores notas de injúria por planta, foram observadas no trt 3 (4,05). As maiores médias, também foram verificadas nas distâncias 2 ($F_{3,19} = 29,68$; $P < 0,0001$), 3 ($F_{3,19} = 26,67$; $P < 0,0001$) e 4 ($F_{3,19} = 29,17$; $P < 0,0001$), variando entre ($>1,80 \leq 3,03$) (Tab. 6).

Na última avaliação, aos 15 DAI foram observadas as maiores notas de injúria por planta, com diferenças significativas entre os quatro esquemas de plantio em cada uma das cinco distâncias avaliadas. Na distância 0 ($F_{3,19} = 1496,00$; $P < 0,0001$), as maiores notas de injúria foram verificadas nos Trts simulando refúgio estruturado (8,40) e RIB (8,00). O esquema de plantio com refúgio estruturado, atingiu as maiores notas médias de injúrias nas distâncias 1 ($F_{3,19} = 151,66,18$; $P <$

0,0001), 2 ($F_{3,19} = 19,66$; $P < 0,0001$) e 4 ($F_{3,19} = 31,49$; $P < 0,0001$). Na distância 2 ($F_{3,19} = 19,66$; $P < 0,0001$) os esquemas trts 3 e 4, não diferiram entre si. (Tab. 6).

Não houve diferenças significativas no número de lagartas vivas de *S. frugiperda* encontradas nos esquemas de plantio com o milho YieldGard VT Pro 3 no terceiro dia após a infestação, para a distância 0 (planta central) ($F_{3,19} = 3,29$; $P = 0,0581$) (Tab. 7). As distâncias 1 ($F_{3,19} = 39,71$; $P < 0,0001$), 2 ($F_{3,19} = 21,37$; $P < 0,0001$), 3 ($F_{3,19} = 10,81$; $P < 0,0001$) e 4 ($F_{3,19} = 19,90$; $P < 0,0001$) apresentaram diferenças significativas. Os Trts 3 e 4 apresentaram as maiores médias de lagartas vivas por planta nas distâncias de 1 a 4, variando entre 0,16 e 0,78 lagartas. No milho YieldGard VT Pro 3, Trt1 foi encontrado 0,13 lagartas vivas na distância 2 (Tab. 7).

Na avaliação realizada nove dias após a liberação, houve diferenças significativas no número de lagartas vivas nos esquemas de plantio, para a distância 0 ($F_{3,19} = 4,94$; $P = 0,0185$). Os plantios simulando RIB (3,20) e refúgio estruturado (2,20) apresentaram o maior número médio de lagartas vivas por planta. Para as demais distâncias houve diferenças significativas ($P < 0,0001$) entre os tratamentos. Não foram encontradas lagartas vivas de *S. frugiperda* no esquema de plantio com plantas Bt (100%). No refúgio estruturado o número médio de lagartas vivas por planta nas distâncias 1 ($F_{3,19} = 169,93$; $P < 0,0001$), 2 ($F_{3,19} = 34,47$; $P < 0,0001$), 3 ($F_{3,19} = 18,40$; $P < 0,0001$) e 4 ($F_{3,19} = 12,72$; $P < 0,0001$), variou entre 0,33 e 0,67. No plantio com (uma planta Bt no centro, cercada por 26 plantas não-Bt; Trt 4), verificou-se que as lagartas afastaram da planta central e dispersaram para as plantas não-Bt, com o número de lagartas variando entre 0,16 e 0,65 entre as distâncias (Tab. 7).

Tabela 7. Número médio ($\pm$ EPM) de lagartas e notas de injúrias de *Spodoptera frugiperda* aos 3, 9, e 15 dias após a infestação em quatro esquemas de plantio de milho Bt piramidado com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 e não-Bt.

Distância	Esquema de Plantio	Número médio de lagartas			Notas de Injúria		
		3	9	15	3	9	15
D0	Bt	5,20 $\pm$ 0,91	2,00 $\pm$ 0,33 ab	0,00 $\pm$ 0,06 b	1,80 $\pm$ 0,25 b	2,40 $\pm$ 0,68 b	2,80 $\pm$ 0,50 b
	RIB	6,00 $\pm$ 0,43	3,20 $\pm$ 0,28 a	1,20 $\pm$ 0,18 a	3,40 $\pm$ 0,20 a	5,40 $\pm$ 0,66 a	7,60 $\pm$ 0,42 a
	Refúgio Estruturado	3,40 $\pm$ 0,36	2,20 $\pm$ 0,42 a	1,20 $\pm$ 0,18 a	3,60 $\pm$ 0,35 a	5,40 $\pm$ 0,75 a	8,00 $\pm$ 0,46 a
	Não Bt fora	2,80 $\pm$ 0,33	0,80 $\pm$ 0,35 b	0,20 $\pm$ 0,18 b	1,60 $\pm$ 0,22 b	1,00 $\pm$ 0,48 ab	2,40 $\pm$ 0,69 b
D1	Bt	0,13 $\pm$ 0,04 b	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,10 $\pm$ 0,12 c	0,00 $\pm$ 0,20 b	0,00 $\pm$ 0,22 c
	RIB	0,00 $\pm$ 0,02 b	0,02 $\pm$ 0,04 b	0,00 $\pm$ 0,03 c	0,00 $\pm$ 0,11 c	0,28 $\pm$ 0,21 b	0,15 $\pm$ 0,29 c
	Refúgio Estruturado	0,78 $\pm$ 0,08 a	0,67 $\pm$ 0,02 a	0,70 $\pm$ 0,09 a	1,80 $\pm$ 0,16 a	3,35 $\pm$ 0,46 a	6,15 $\pm$ 0,39 a
	Não Bt fora	0,73 $\pm$ 0,10 a	0,65 $\pm$ 0,03 a	0,42 $\pm$ 0,06 b	1,10 $\pm$ 0,10 b	2,30 $\pm$ 0,22 a	4,38 $\pm$ 0,28 b
D2	Bt	0,00 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,04 b	0,00 $\pm$ 0,09 c	0,00 $\pm$ 0,15 c	0,00 $\pm$ 0,40 c
	RIB	0,00 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,04 b	0,00 $\pm$ 0,09 c	0,00 $\pm$ 0,15 c	0,00 $\pm$ 0,40 c
	Refúgio Estruturado	0,56 $\pm$ 0,06 a	0,60 $\pm$ 0,43 a	0,43 $\pm$ 0,05 a	1,47 $\pm$ 0,29 a	2,97 $\pm$ 0,36 a	4,37 $\pm$ 0,34 a
	Não Bt fora	0,40 $\pm$ 0,10 a	0,27 $\pm$ 0,07 b	0,30 $\pm$ 0,12 a	0,77 $\pm$ 0,15 b	1,00 $\pm$ 0,14 b	3,30 $\pm$ 1,04 b
D3	Bt	0,00 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,12 b	0,00 $\pm$ 0,25 b
	RIB	0,00 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,20 $\pm$ 0,17 b	0,00 $\pm$ 0,25 b
	Refúgio Estruturado	0,33 $\pm$ 0,07 a	0,50 $\pm$ 0,06 a	0,70 $\pm$ 0,08 a	1,83 $\pm$ 0,50 a	2,20 $\pm$ 0,34 a	3,46 $\pm$ 0,80 a
	Não Bt fora	0,27 $\pm$ 0,05 a	0,43 $\pm$ 0,10 a	0,43 $\pm$ 0,06 b	1,17 $\pm$ 0,17 ab	1,60 $\pm$ 0,19 a	3,94 $\pm$ 1,15 a
D4	Bt	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,00 $\pm$ 0,03 b	0,00 $\pm$ 0,05 c	0,00 $\pm$ 0,11 c
	RIB	0,00 $\pm$ 0,02 c	0,00 $\pm$ 0,00 c	0,00 $\pm$ 0,01 b	0,03 $\pm$ 0,08 b	0,00 $\pm$ 0,05 c	0,00 $\pm$ 0,11 c
	Refúgio Estruturado	0,40 $\pm$ 0,05 a	0,33 $\pm$ 0,05 a	0,60 $\pm$ 0,09 a	1,00 $\pm$ 0,21 a	1,73 $\pm$ 0,22 a	4,56 $\pm$ 0,50 a
	Não Bt fora	0,17 $\pm$ 0,05 b	0,13 $\pm$ 0,05 b	0,02 $\pm$ 0,07 b	0,33 $\pm$ 0,07 b	0,87 $\pm$ 0,20 b	1,53 $\pm$ 0,29 b

EPM – Erro Padrão da Média. Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$; Teste de LSD).

Na última avaliação realizada aos 15 DAI das lagartas, houve diferenças significativas entre o número médio de lagartas de *S. frugiperda* vivas por planta nos esquemas de plantio para a distância 0 ($F_{3,19} = 18,15$; $P < 0,0001$), com 1,20 lagartas vivas nos Trts 3 e 4. Nas distâncias 2 ($F_{3,19} = 30,54$; $P < 0,0001$), 3 ($F_{3,19} = 8,74$; $P = 0,0024$) e 4 ($F_{3,19} = 47,32$; $P < 0,0001$) o número de lagartas vivas por planta foi maior no refúgio estruturado ($\geq 0,4$ lagartas por planta). Nos Trts 1 e 2 não foram verificadas lagartas vivas nas distâncias de 1 a 4 (Tab. 7).

Com relação as injúrias ocasionadas por *S. frugiperda* observou-se que aos três DAI houve diferenças significativas nas injúrias causadas na distância 0 ($F_{3,19} = 11,52$; $P = 0,0008$), com maiores notas de injúrias por planta nos Trts 2 (3,40) e 3 (3,60) (Tab. 7). Nas distâncias 1 ($F_{3,19} = 58,45$; $P < 0,0001$), 2 ($F_{3,19} = 12,04$; $P = 0,0006$), 3 ($F_{3,19} = 3,66$; $P = 0,0440$), e 4 ($F_{3,19} = 4,35$; $P = 0,0272$) as maiores notas de injúrias por planta foram verificadas na simulação com refúgio estruturado ($\leq 2,00$). Nos esquemas de plantio Trts 1 e 2 com milho YieldGard Vt Pro 3, não foram observadas injúrias nas plantas a partir das distâncias 2 a 4 (Tab. 7).

Na avaliação realizada aos nove dias na distância 0 ($F_{3,19} = 7,18$; $P = 0,0051$), as maiores notas de injúria (5,80) foram obtidas nos trts 2 e 3, ambos com plantas não-Bt no centro. Para a distância 1 ($F_{3,19} = 46,97$; $P < 0,0001$) as maiores notas por planta, foram observadas nos trts 3 e 4, não diferindo entre si. Na distância 2 ($F_{3,19} = 69,38$; $P < 0,0001$), observou-se maiores injúrias no Trt 3. Para a distância 3 ($F_{3,19} = 34,36$; $P < 0,0001$), as notas de injúrias foram semelhantes nos Trts 3 e 4. Enquanto na distância 4 ($F_{3,19} = 40,07$; $P < 0,0001$), a maior média da nota de injúria foi observada no Trt 3 (1,84) (Tab. 7).

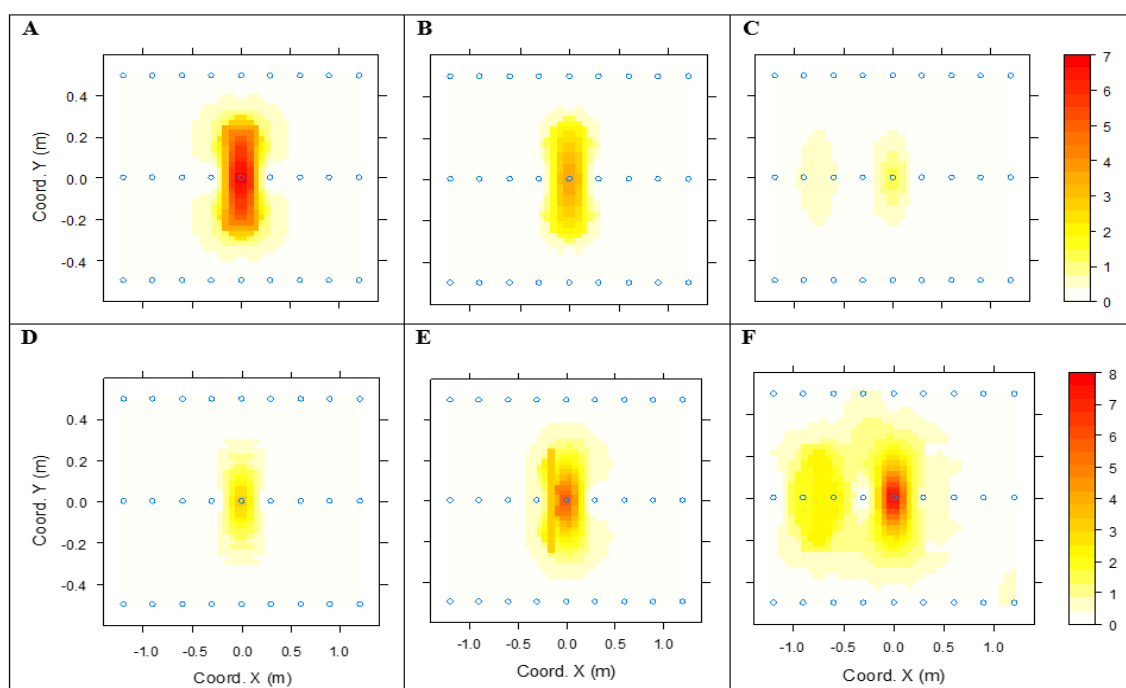
Na avaliação final aos 15 DAI houve diferenças significativas entre os quatro esquemas de plantio em cada uma das cinco distâncias avaliadas. Na distância 0 ($F_{3,19} = 24,18$; $P < 0,0001$), as maiores notas de injúria foram ocasionadas nos tratamentos com plantas não Bt no centro, refúgio estruturado (8,00) e refúgio na sacaria (7,60), não diferindo entre si. No esquema de plantio com refúgio estruturado, foram observadas as maiores notas médias de injúrias, na distância 1 ($F_{3,19} = 186,18,18$; $P < 0,0001$), 2 ($F_{3,19} = 10,02$; $P = 0,0014$) e 4 ($F_{3,19} = 87,81$; $P < 0,0001$). Somente a distância 3 ($F_{3,19} = 6,59$; $P = 0,007$) apresentou a menor média (Tab. 7).

Com base nos mapas de intensidade de infestação e de nota visual de injúrias (Figuras 3 a 8), observa-se que houve mobilidade das lagartas de *S. frugiperda* entre as plantas de milho Bt e não-Bt nos esquemas de plantio avaliados, tanto em Agrisure Viptera 3110 como em YieldGard VT Pro 3. Nos esquemas de plantio somente com plantas Bt, com as tecnologias avaliadas, não houve lagartas sobreviventes.

A distância média de caminamento das lagartas da planta de liberação foi reduzida nos esquemas de plantio simulando um RIB (Figs. 3 e 6). Nestes esquemas de plantio um maior número de lagartas, tenderam a se estabelecer inicialmente na planta de milho não-Bt (planta central). Ao longo das avaliações, as lagartas foram se dispersando da planta não-Bt para as plantas Bt. Nas avaliações realizadas no milho Agrisure Viptera 3110 aos três e nove DAI, verifica-se que lagartas se mantiveram na planta central (Fig.3). Aos quinze dias observa-se que as lagartas se movimentaram da planta não-Bt para plantas Bt adjacentes. Em YieldGard VT Pro 3 observou-se comportamento similar das lagartas (Fig. 6). No entanto, estas foram controladas pelas proteínas de Bt expressas nas plantas Bt nos eventos de milho avaliados. As notas de injúrias foram observadas, apenas nas plantas não-Bt em todas as avaliações realizadas. A movimentação das lagartas no plantio em RIB se deve principalmente a alta nota de injúria observada na planta não-Bt, o que provavelmente fez com que as lagartas procurassem por alimento.

A distância de movimento das lagartas entre plantas de milho não-Bt foi aproximadamente de 1,20 m da planta de infestação nos esquemas de plantio com planta central Bt, circundada por plantas não-Bt (Figs. 4 e 7) e simulando refúgio estruturado, plantas não-Bt (Figs. 5 e 8). Nas simulações com plantas Bt no centro, as lagartas se dispersaram para as plantas não-Bt adjacentes. De uma maneira geral as lagartas ficaram distribuídas nas plantas não-Bt (até 1,0 lagarta/planta) da parcela. Observa-se ainda que nesse caso as lagartas se dispersaram para as plantas adjacentes logo após a infestação pois na avaliação realizada aos três dias foi verificada presença das lagartas em mais de 75% das plantas de milho não-Bt, tanto em Agrisure Viptera 3110, quanto em YieldGard VT Pro 3. Nas plantas Bt, não foi constatada presença de lagartas vivas.

Na avaliação realizada aos três dias após a infestação em simulações de refúgio estruturado foi possível verificar a alta mobilidade das lagartas (Figs. 5 e 8), em ambas as tecnologias de milho, foi possível observar pelo menos uma lagarta/planta em aproximadamente 80% das plantas. Ao longo das avaliações nove e quinze dias as lagartas tenderam a movimentar para as plantas não infestadas. A variação da intensidade da nota de injúria foi crescente ao longo das avaliações. A menor intensidade foi verificada na isolinha da tecnologia Agrisure Viptera 3110 (Fig. 5) do que em YieldGard VT Pro 3 (Fig. 8).



As coordenadas representam o dimensionamento das parcelas: Coord. Y (m), representa o espaçamento da linha de plantio, partindo de 0.0 (linha central) até 0.5 ou -0.5 (linhas adjacentes) em metros (0.5 m); Coord. X (m), representa o comprimento da linha de plantio, partindo de 0.0 (planta central) a 1.8 m ou -1.8 m a última planta (distante da planta central). O círculo em azul representa cada uma das 27 plantas da parcela. A intensidade da cor nas escalas varia de branco a vermelho intenso. Em A, B, C – a escala varia 0 a 7 (lagartas) nos intervalos de tempo 3, 9, 15 dias após a infestação. Em D, E e F – a escala varia de 0 (folhas sem injúrias) a 8 (folhas com injúrias), nos intervalos de tempo 3, 9, 15 dias após a infestação das lagartas.

Figura 3. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho simulando RIB (planta central não-Bt, circundada com plantas Bt) com a tecnologia Agrisure Viptera 3110. **A, B e C**, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; **D, E e F**, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente.

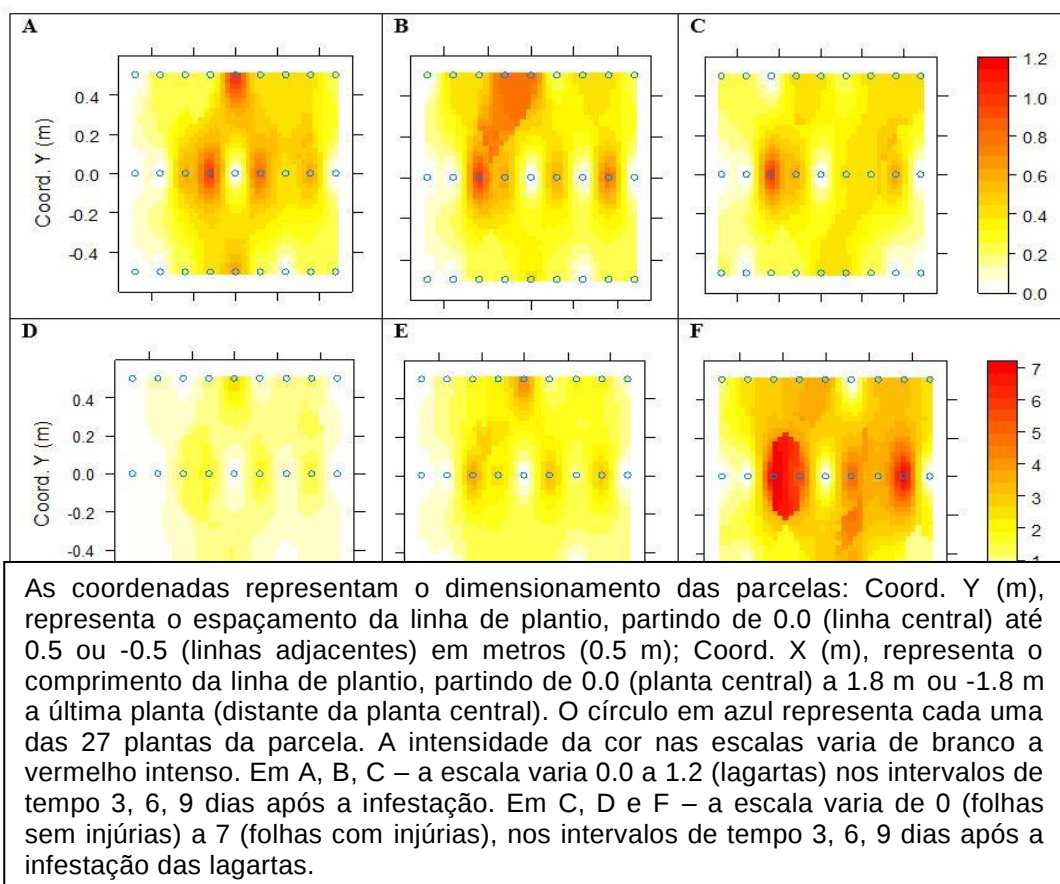


Figura 4. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho (planta central Bt, circundada com plantas não-Bt) com tecnologia Agrisure Viptera 3110. **A, B e C**, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; **D, E e F**, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação.

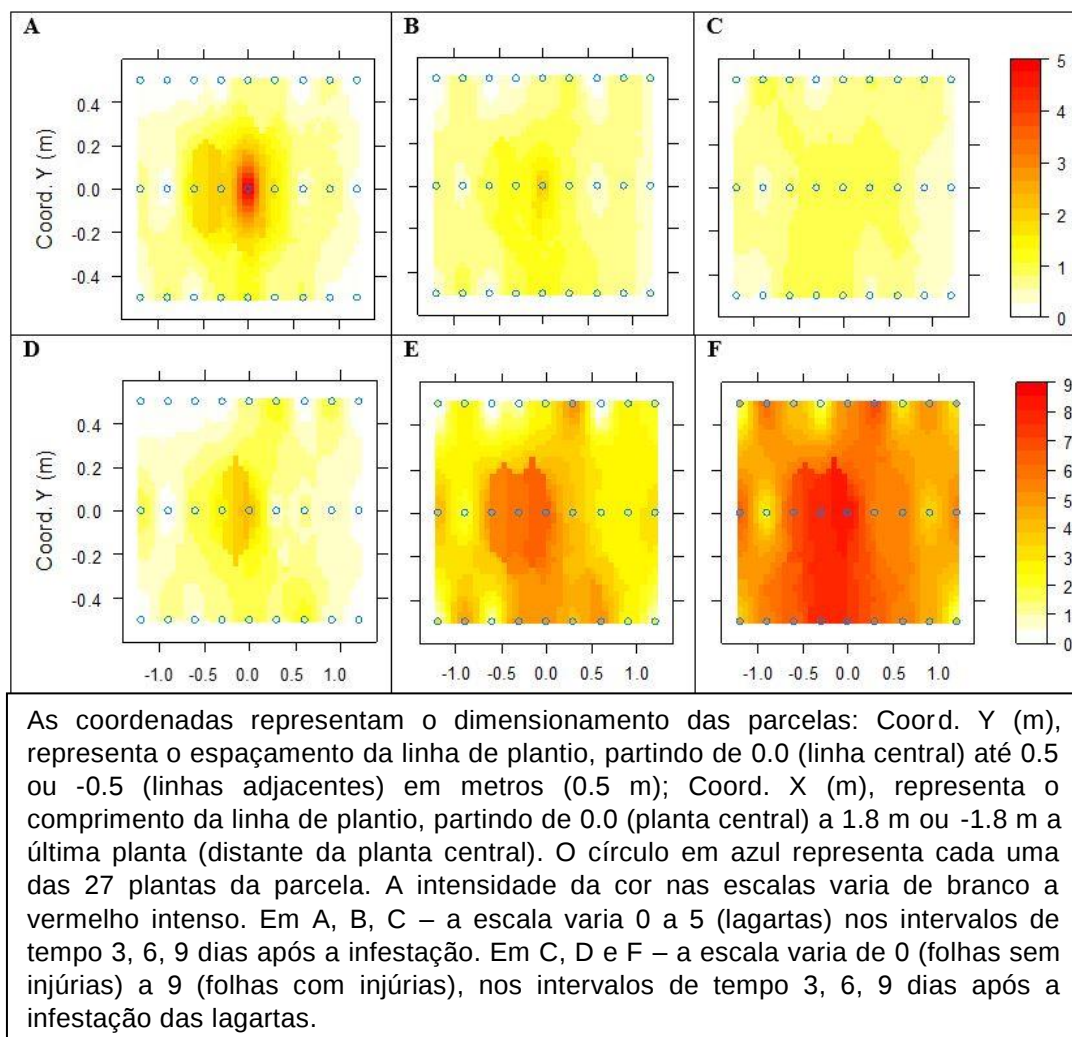
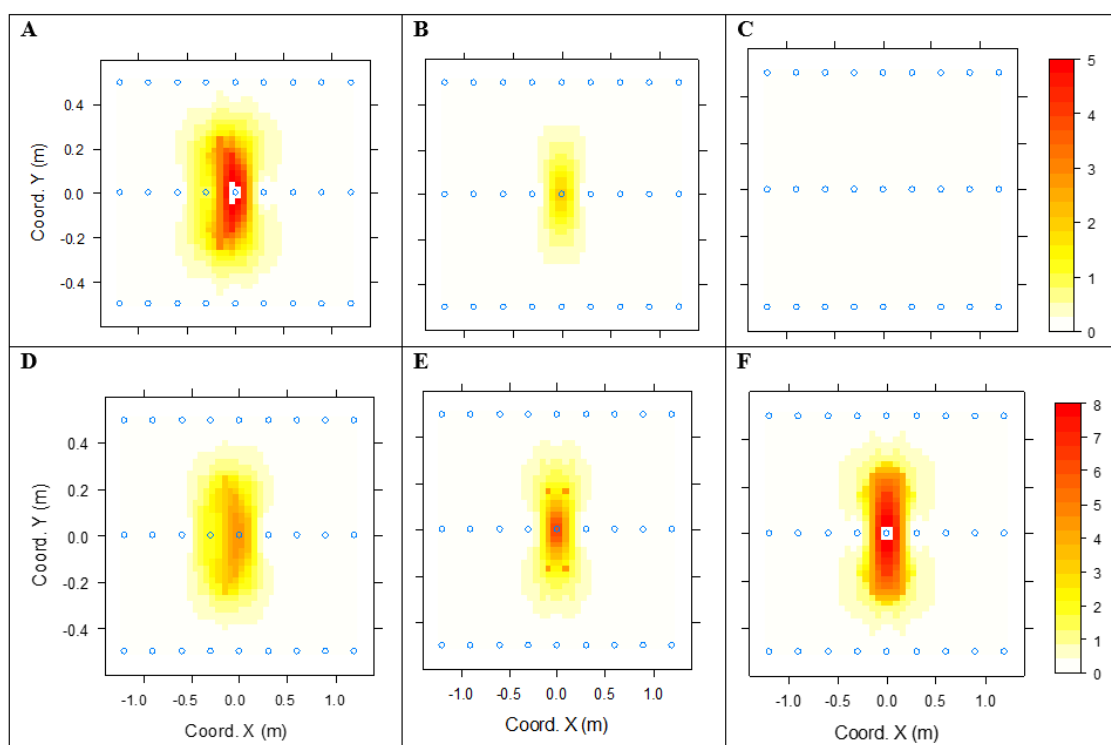


Figura 5. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho simulando refúgio estruturado (plantas não-Bt) isolinha da tecnologia Agrisure Viptera 3110. **A, B e C**, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; **D, E e F**, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente.



As coordenadas representam o dimensionamento das parcelas: Coord. Y (m), representa o espaçamento da linha de plantio, partindo de 0.0 (linha central) até 0.5 ou -0.5 (linhas adjacentes) em metros (0.5 m); Coord. X (m), representa o comprimento da linha de plantio, partindo de 0.0 (planta central) a 1.8 m ou -1.8 m a última planta (distante da planta central). O círculo em azul representa cada uma das 27 plantas da parcela. A intensidade da cor nas escalas varia de branco a vermelho intenso. Em A, B, C – a escala varia 0.0 a 5 (lagartas) nos intervalos de tempo 3, 6, 9 dias após a infestação. Em C, D e F – a escala varia de 0 (folhas sem injúrias) a 8 (folhas com injúrias), nos intervalos de tempo 3, 6, 9 dias após a infestação das lagartas.

Figura 6. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho simulando RIB (planta central não-Bt, circundada com plantas Bt) com tecnologia YieldGard VT Pro 3. **A, B e C**, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; **D, E e F**, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente.

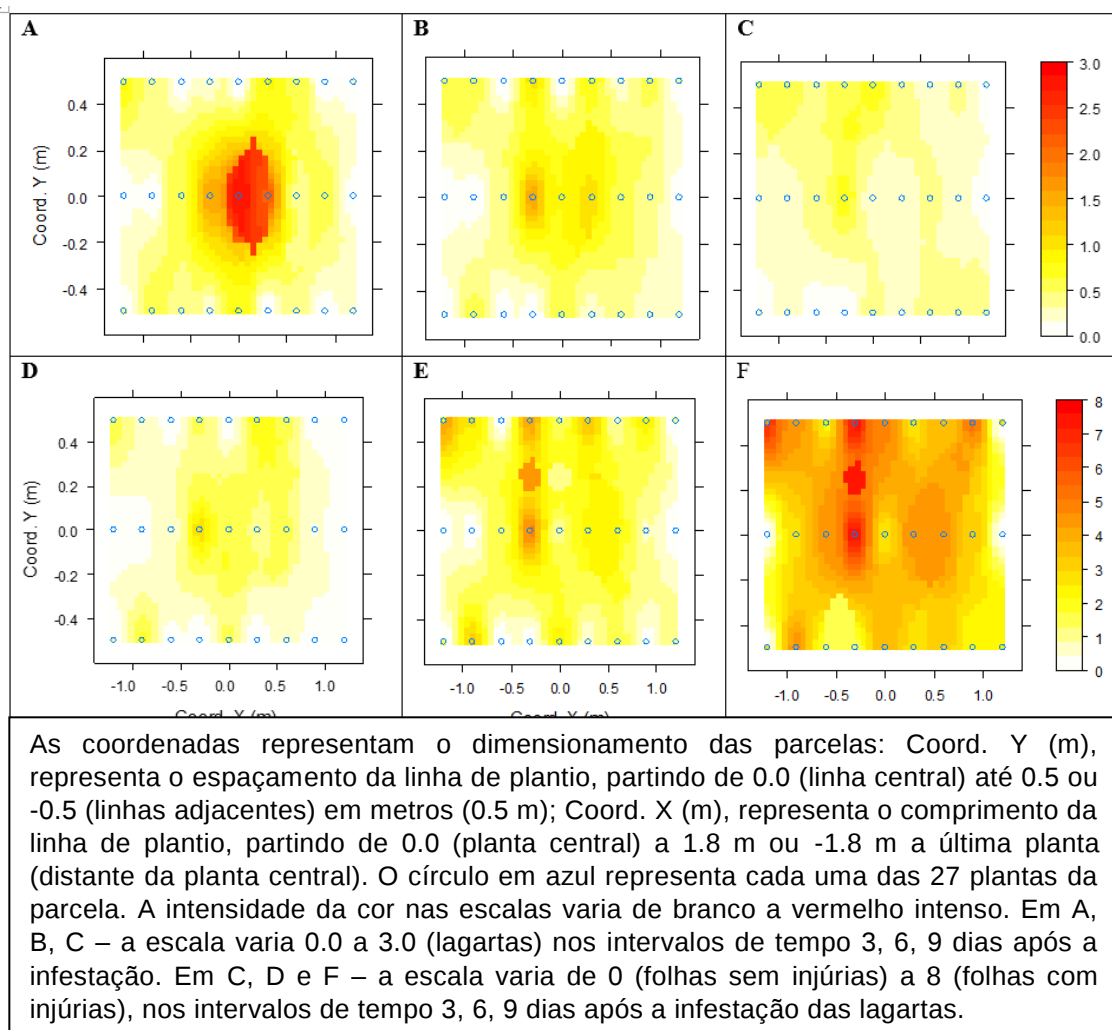


Figura 7. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho (planta central Bt, circundada com plantas não-Bt) com tecnologia YieldGard VT Pro 3. **A, B e C**, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; **D, E e F**, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação.

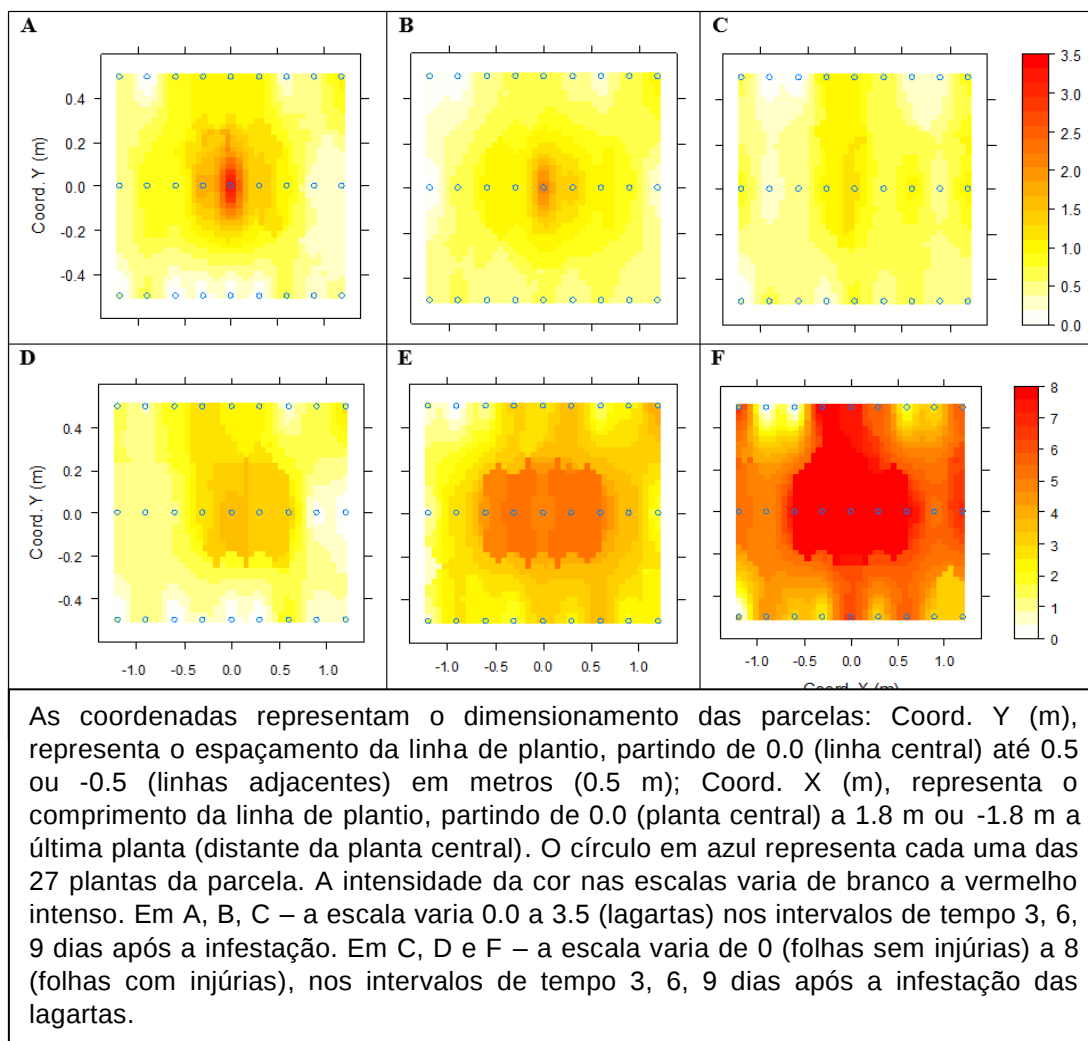


Figura 8. Mapas de infestação e de notas de injúrias de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em esquema de plantio de milho, simulando refúgio estruturado (plantas não-Bt) isolinha da tecnologia YieldGard VT Pro 3. **A, B e C**, mobilidade das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente; **D, E e F**, notas de injúrias das lagartas aos 3, 9 e 15 dias após a infestação, respectivamente.

4. Discussão

Neste estudo, inicialmente avaliou-se a sobrevivência e o desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* (neonatas aos 15 dias de idade) expostas em milho em simulações com as tecnologias Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3 e por fim verificou-se em casa de vegetação a mobilidade das lagartas em quatro esquemas de plantio. Os resultados de sobrevivência evidenciam que as lagartas de *S. frugiperda* expostas à alimentação ao longo do desenvolvimento, com secções foliares de plantas de milho Bt piramidado Agrisure Viptera 3110 foram eficientemente controladas pelas proteínas Bt expressas nestas plantas. O contrário foi observado com as lagartas alimentadas em YieldGard VT Pro 3, verificando sobrevivência em todas as simulações. Adicionalmente foi verificada uma alta mobilidade das lagartas de *S. frugiperda* nos esquemas de plantio de milho, principalmente naqueles contendo plantas não-Bt.

A ausência de lagartas sobreviventes no experimento com simulações de exposição a tecnologia Agrisure Viptera 3110, mesmo em um curto período de exposição a esta tecnologia, pode ser atribuída a toxicidade da proteína Vip3Aa20 à lagarta-do-cartucho. Estudos anteriores demonstraram que o milho MIR 162 que expressa a proteína Vip3Aa20 apresenta alto nível no controle da lagarta-do-cartucho (Drury et al., 2008; Hardke et al., 2011; Bernardi et al., 2015). Bernardi et al. (2015) verificaram que a expressão de Vip3Aa20 em tecidos liofilizados de Agrisure Viptera 3110 e Agrisure Viptera diluídos a uma proporção de 25 vezes na dieta, causaram alta mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*, confirmando a expressão da proteína em alta dose na planta. Ainda foi verificado, que mais de 80% das lagartas de *S. frugiperda* heterozigotas e suscetíveis em diferentes idades não sobreviveram quando alimentadas com tecidos foliares destas tecnologias. De forma contrária, foi observado que no milho Bt11, que expressa a proteína Cry1Ab, não houve a expressão da proteína em alta dose para ambas as espécies. Isto se deve a baixa afinidade da proteína Cry1Ab com tecidos do intestino médio de *S. frugiperda*, resultando em uma baixa suscetibilidade da espécie à proteína Bt (Aranda et al., 1996, Omoto et al., 2016). Miranda et al. (2001) verificaram que lagartas de *S. frugiperda* conseguem degradar mais rapidamente

Cry1Ab do que espécies de insetos mais suscetíveis.

No milho YieldGard VT Pro 3 foi possível observar a eficácia no controle das lagartas de *S. frugiperda* (neonatas), em mais de 95%, quando expostas à alimentação foliar por toda a fase larval. No entanto, quando alimentadas com seções foliares de milho não-Bt e em determinado tempo de desenvolvimento larval (dias), expostas a alimentação com seções foliares de milho Bt, houve uma tendência de aumento no número de sobreviventes, atingindo as fases de pupa e adulta, sobretudo nas simulações a partir do terceiro ínstar. Esse resultado demonstra que a suscetibilidade das lagartas decresce com o maior avanço do desenvolvimento larval para esta tecnologia de milho. Isso permite um possível potencial na evolução da resistência, pois entre os indivíduos sobreviventes, podem estar os heterozigotos, que são considerados os principais responsáveis pela evolução inicial da resistência (Gould, 1998). A proteína Cry1A.105, expressa no milho YieldGard VT Pro 3 é um gene quimérico que compartilha o mesmo sítio das proteínas Cry1A (domínios I e II) e Cry1F (domínio III), o que pode elevar a probabilidade de ocorrer resistência cruzada, contribuindo diretamente com a evolução da resistência (Hernández-Rodríguez et al., 2013). No Brasil, além do milho com a tecnologia YieldGard VT Pro 3 as proteínas inseticidas Cry1A.105 + Cry2Ab2, estão inseridas nas tecnologias YieldGard VT Pro™, YieldGard VT Pro Max™ e PowerCore™, sendo que as duas últimas, também expressam a proteína Cry1F (CTNBio, 2018). A possibilidade de resistência cruzada entre Cry1A.105, Cry1Ab e Cry1F reduz o efeito da pirâmide de genes, fazendo com que estas tecnologias funcionem como um milho Bt de gene único para o controle de *S. frugiperda* (Hernández-Rodríguez et al., 2013, Huang et al., 2014). Neste contexto, a eficácia a longo prazo do milho YieldGard VT Pro 3 é parcialmente dependente da proteína Cry2Ab2, que não apresenta resistência cruzada com proteínas Cry1 (Ferré e Van Rie, 2002; Caccia et al., 2010).

O crescimento e desenvolvimento da fase larval de *S. frugiperda* foi prolongado em 1-2 dias nas simulações com exposição das lagartas em YieldGard VT Pro 3. No entanto, em condições de campo, esses resultados tenderiam a reduzir a sobrevivência de *S. frugiperda*, porque lagartas com maior período de desenvolvimento, teriam maiores chances de exposição a doenças, inimigos

naturais e outros fatores ambientais. É importante ressaltar que houve sincronismo no desenvolvimento larval entre as simulações e o milho não-Bt. Essa sincronia entre mariposas suscetíveis e mariposas heterozigotas aumentaria a probabilidade de acasalamento entre os indivíduos e poderia contribuir para a redução da frequência de alelos de resistência nos indivíduos da população. A razão sexual dos adultos se manteve entre 0,37 e 0,50, próximo ao encontrado nos insetos alimentados em milho não-Bt. Estudos anteriores mostraram que a capacidade reprodutiva de *Spodoptera* spp. está relacionada às reservas de nutrientes adquiridas durante a fase larval (Zhang et al., 2011; Boregas et al., 2013). Nesse estudo verificou-se que a biomassa das pupas expostas ao milho YieldGard VT Pro 3, foi reduzida em relação ao milho não-Bt, o que provavelmente se traduziria em diferenças significativas na fecundidade e fertilidade.

Na avaliação da mobilidade larval de *S. frugiperda*, nos esquemas de plantio com as tecnologias Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3 (Trt 1) não houve lagartas de *S. frugiperda* sobreviventes e praticamente não houve injúrias nas plantas. Da mesma forma, no tratamento simulando o RIB maior número de lagartas sobreviveu apenas na planta não-Bt (Trt 2), ocasionado injúrias tanto na planta não-Bt, como em plantas Bt ao longo das avaliações. Ao se moverem da planta não-Bt (planta central, RIB) as lagartas alimentavam do tecido da planta Bt, no entanto, estas não sobreviveram, devido a ação das proteínas de Bt expressas nas tecnologias de milho. De maneira geral, os resultados mostraram que as tecnologias de milho Bt, Agrisure Viptera e YieldGard VT Pro 3 foram eficazes para o controle de *S. frugiperda* protegendo as plantas das injúrias foliares ocasionadas pelas lagartas (Figs. 4 e 7).

O presente estudo evidencia que as lagartas de *S. frugiperda* tem a capacidade de se mover das plantas inicialmente infestadas, para pelo menos quatro plantas distantes (1,20 m) da planta de liberação (Figs. 5, 6, 8 e 9). No entanto a grande maioria das lagartas ficam até três plantas distantes da planta de liberação, Trt 3 (plantas não-Bt) (Figs. 5 e 8) e Trt 4 (plantas Bt centro, circundada por plantas não-Bt) (Figs. 6 e 9). As lagartas de *S. frugiperda* também moveram da linha infestada para as linhas adjacentes. Após 72 horas da liberação, 70 a 90% das lagartas abandonaram as plantas centrais e se dispersaram para outras plantas

tanto na linha infestada, quanto nas linhas adjacentes. Todas as lagartas vivas recuperadas nos Trts com milho não-Bt estavam amplamente distribuídas na parcela. Em um estudo de campo foi verificado que 50% das lagartas de *S. frugiperda* se manteve na linha infestada e 91,4% em um raio de 1,1 m da planta de milho de liberação (Pannuti et al., 2016). De forma semelhante foi verificado que em algodão as lagartas permaneceram predominantemente, a uma distância média de 1 a 2,4 plantas da planta de liberação, não dispersando mais de cinco plantas do local de infestação (Ali et al., 1990).

É possível que a dispersão das lagartas tenha ocorrido por balonismo ou caminamento, o que é muito comum nos noctuídeos. No balonismo as lagartas neonatas produzem um fio de seda para pendurar nas estruturas das plantas e entrar em contato com outros tecidos da mesma planta ou com outros hospedeiros e ainda para serem carregadas por correntes de ar (Bell et al.; 2005; Goldstein et al., 2010). À medida que as lagartas crescem, o balonismo torna-se impossível devido ao aumento de peso, e a dispersão passa a ser realizada por caminamento. No entanto, o movimento de caminhar pode acontecer a qualquer momento, quando partes da planta hospedeira são inadequadas para o estabelecimento das lagartas (Zalucki et al., 2002). Neste estudo foi observado que as lagartas se utilizaram mais da dispersão por caminamento provavelmente devido a proteção da casa de vegetação com tela de náilon anti-afídeo, reduzindo a corrente de ar.

Por outro lado, a fase imatura de lepidópteros, exibem uma fase de exploração foliar na qual eles procuram por superfícies palatáveis ou tecidos foliares, se alimentando daqueles mais preferidos (Wangila et al., 2013). Isso permite que lagartas neonatas possam abandonar a planta após a alimentação inicial, antes de ingerir uma dose tóxica, o que poderia aumentar as chances de dispersão das lagartas e uma maior porcentagem de sobreviventes. No presente estudo, o movimento larval significativo de *S. frugiperda* também foi observado no esquema de plantio Trt 4, tanto na tecnologia Agrisure Viptera, como em YieldGard VT Pro 3. As diferenças observadas neste esquema de plantio se deve a diferença na alimentação das lagartas, que possivelmente realizaram a picada de prova inicial na planta de liberação, ingerindo uma subdose das proteínas de Bt e se dispersaram procurando outra fonte de alimento. Vários estudos também demonstraram que a

alimentação e/ou mobilidade comportamental de lagartas é diferente entre as plantas Bt e não-Bt. Lagartas neonatas de *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), aumentaram a dispersão em plantas de algodão Bt que expressam a proteína Cry1Ac para plantas não-Bt (Zhang et al., 2004; Ramalho et al., 2014). Da mesma forma, neonatas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) foram capazes de detectar rapidamente plantas de milho que expressavam as proteínas Cry1Ab e movimentarem para plantas não-Bt (Goldstein et al., 2010). Em lagartas de *S. frugiperda* no terceiro ínstar foi evidenciada uma resposta de aversão ao milho que expressa a proteína Cry1F, sem consumir uma dose letal da proteína (Binning et al., 2014).

Adicionalmente, o estudo em laboratório demonstrou a capacidade de tolerância de lagartas de *S. frugiperda* nos instares finais de desenvolvimento quando expostas a tecnologia YieldGard VT Pro 3. Do ponto de vista prático, em campo as lagartas nos instares iniciais de desenvolvimento podem se alimentar de plantas não-Bt e, quando atingirem os últimos instares, movimentarem para as plantas Bt e sobreviverem à fase adulta. Esse tipo de alimentação/dispersão e comportamento é crucial para a evolução da resistência das pragas-alvo, uma vez que pode criar um ambiente propício para tal comportamento, principalmente para os indivíduos heterozigotos resistentes ou portadores de alelos de resistência, do que os suscetíveis. De maneira contrária, a alta suscetibilidade verificada pelas lagartas de *S. frugiperda* no milho com a tecnologia Agrisure Viptera 3110, pode reduzir o número de indivíduos suscetíveis originados no plantio em RIB.

O movimento larval significativo observado com as lagartas de *S. frugiperda* demonstra que as condições de RIB em milho parecem não ser os mais apropriados para a espécie. A estratégia de plantios em RIB tem sido recomendada para insetos que apresentam baixo movimento de planta a planta (Mallet e Porter, 1992). Para insetos que apresentam alta mobilidade entre plantas, a implementação de refúgios estruturados tem se apresentado como a mais viável (Davis e Onstad, 2000). No entanto, acredita-se que pesquisas em campo são necessárias para determinar se esses comportamentos podem alterar quando a praga é exposta nestas condições.

5. Conclusões

Os híbridos de milho Agrisure Viptera 3110 e Yeldgard VT Pro 3 são altamente eficazes no controle de lagartas neonatas de *S. frugiperda*.

Lagartas de *S. frugiperda* são eficientemente controladas quando expostas ao longo do desenvolvimento larval em Agrisure Viptera 3110.

Lagartas de *S. frugiperda* são capazes de sobreviverem quando expostas ao longo do desenvolvimento larval em YeldGard VT Pro 3.

O comportamento de movimentação larval de *S. frugiperda* entre as plantas demonstra que a estratégia de mistura de sementes pode não ser efetiva para retardar a evolução de resistência a praga.

7. Referências

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18:265-267.

Andow DA (2008) The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews** 4:142-199.

Andrews KL (1988) Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist** 71:630-653.

Ali A, Luttrell RG, Pitre HN (1990) Feeding sites and distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on cotton. **Environmental Entomology** 19:1060-1067.

Aranda E, Sanchez J, Peferoen M, Güereca L, Bravo A (1996) Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 68:203-212.

Bates S, Zhao LJZ, Roush RT, Shelton AM (2005) Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology** 23:57-62.

Bell JR, Bohan DA, Shaw EM, Weyman GS (2005) Ballooning dispersal using silk: world fauna, phylogenies, genetics and models. **Bulletin of Entomological Research** 95:69-114.

Bernardi O, Bernardi D, Amado D, Sousa RS, Fatoletto J, Medeiros FCL, Conville J, Burd T, Omoto C (2015) Resistance risk assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn. **Journal of Economic Entomology** 108:2711-2719.

Binning RR, Joel C, Kong X, Hellmich RL (2014) Susceptibility and aversion of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F Bt maize and considerations for insect resistance management. **Journal of Economic Entomology** 107:368-374.

Boregas KGB, Mendes SM, Waquil JM, Wilson G (2013) Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia** 72:61-70.

Buntin GD, All JN, Lee RD, Wilson DM (2004) Plant-incorporated *Bacillus thuringiensis* resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Journal of Economic Entomology** 97:1603-1611.

Caccia S, Hernández-Rodríguez CS, Mahon RJ, Downes S, James W, Bautsoens N, Van Rie J, Ferré J (2010) Binding site alteration is responsible for field isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. **PLoS one** 5:e9975.

Carroll MW, Head G, Caprio MA (2012) When and where a seed mix refuge makes sense for managing insect resistance to Bt plants. **Crop Protection** 38:74-79.

CÉLERES 2017: **3º Levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil**, safra 2016/17 (2017). Uberlândia. Disponível em: <http://www.celeres.com.br/>. Acesso em: 21 de abr. 2018.

Centurion JF, Andrioli I, Marques Júnior J, Marcgiori DG (1995) Características de latossolos roxos desenvolvidos de rochas alcalinas e básicas de Jaboticabal, SP. **Scientia Agricola** 52:226-232.

Cruz I, Figueiredo M, Oliveira AC, Vasconcelos CA (1999) Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management** 45:293-296.

Cruz I, Figueiredo M, Silva RB, Silva IF, Paula CS, Foster JE (2012) Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize. **International Journal of Pest Management** 58:83-90.

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2007) **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos evento MON810**. Parecer Técnico N° 1.100/2007. Brasília, 2007. 19 p.

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2010) **Liberção comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos eventos MON 89034 × TC1507**. Parecer Técnico N° 2754/2010. Brasília, 19 p.

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2018) **Commercial Release of the Genetically Modified Insect Resistant Corn (*Zea mays*)**. <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>.

Davis FM, Ng SS, Williams WP (1992) **Visual rating scales for screening whorl stage corn for resistance to fall armyworm**. Mississippi: Agricultural and Forestry Experiment Station. USDA. 9 p. (Technical Bulletin, 186).

Davis PM, Onstad DW (2000) Seed mixtures as a resistance management strategy for European corn borers (Lepidoptera: Crambidae) infesting transgenic corn expressing Cry1Ab protein. **Journal of Economic Entomology** 93:937-948.

Dhillon MK, Sharma HC (2013) Comparative studies on the effects of Bt-transgenic and nontransgenic cotton on arthropod diversity, seedcotton yield and bollworms control. **Journal of Environmental Biology** 34:67-73.

Drury SM, Reynolds TL, Ridley WP, Bogdanova N, Riordan S, Nemeth MA, Sorbet R, Trujillo WA, Breeze ML (2008) Composition of forage and grain from second-generation insect-protected corn MON 89034 is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56:4623-4630.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection** 64:150-158.

Ferré J, Van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 47:501-533.

Goldstein JA, Mason CE, Pesek J (2010) Dispersal and movement behavior of neonate European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on non- Bt and transgenic Bt corn. **Journal of Economic Entomology** 103:331-339.

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

Greene GL, Leppa NC, Zickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487-488.

Hardke JT, Leonard BR, Huang F, Jackson RE (2011) Damage and survivorship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic field corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. **Crop Protection** 30:168-172.

Hernández-Rodríguez CS, Hernández-Martínez P, Van Rie J, Escriche B, Ferré J. (2013) Shared midgut binding sites for Cry1A, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS one** 8:e68164.

Huang F, Qureshi JA, Meagher Jr RL, Reisig DD, Head GP, Andow DA, Ni X, Kerns D, Buntin GD, Niu Y, Yang F, Dangel V (2014) Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS one** 9:e112958.

Hutchison WD, Burkness EC, Mitchell PD, Moon RD, Leslie TW, Fleischer SJ, Abrahamson M, Hamilton KL, Steffey KL, Gray ME, Hellmich RL, Kaster LV, Hunt TE, Wright RJ, Pecinovsky K, Rabaey TL, Flood BR, Raun ES (2010) Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science** 330:222-225

James C (2017) **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016**. ISAAA Brief No. 52. Ithaca, NY: ISAAA. Disponível em: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf>. Acesso em: 02 de jun. de 2018.

Kolmogorov, A. 1933. Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione. **Giornale dell'Istituto Italiano degli Attuari** 4: 83-91.

Levene, H. 1960. Robust tests for equality of variances. pp. 278-292. In: I. Olkin, S. G. Ghurye, W. Hoeffding, W. G. Madow, H. B. Mann. **Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling**. Stanford, California, USA.

Luginbill P (1928) **The Fall Armyworm**. Washington: USDA: United States Department of Agriculture, 91 p. (USDA. Technical Bulletin, 34).

Magalhães PC, Durães FO (2006) **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 10 p. (Embrapa Milho e sorgo: Circular Técnica, 22).

Mallet J, Porter P (1992) Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed-mixtures or refugia the best strategy? **Proceedings of the Royal Society B** 250:165-169.

Miranda R, Zamudio FZ, Bravo A (2001) Processing of Cry1Ab –endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 31:1155-1163.

Murphy AF, Ginzel MD, Krupke CH (2010) Evaluating corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) emergence and root damage in a seed mix refuge. **Journal of Economic Entomology** 103:147-157.

Nagoshi RN, Rosas-García NM, Meagher RL, Fleischer SJ, Westbrook JK, Sappington TM, Hay-Roe M, Thomas JMG, Murúa GM (2015) Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology** 108:135-144.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72:1727-1736.

Pannuti LER, Paula-Moraes SV, Hunt TE, Baldin ELL, Dana L, Malaquias JV (2016) Plant-to-Plant Movement of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize (*Zea mays*). **Journal of Economic Entomology** 109:1125-1131.

Petzold-Maxwell JL, Alves AP, Estes RE, Gray ME, Meinke LJ, Shields EJ, Thompson SD, Tinsley NA, Gassmann AJ (2013) Applying an Integrated Refuge to manage Western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): Effects on survival, fitness, and selection pressure. **Journal of Economic Entomology** 106:2195-2207.

R Core Team (2018) R: the R project for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Version 3.5.1.

Ramalho, FS, Pachú JKS, Lira ACS, Malaquias JB, Zanuncio JC (2014) Feeding and dispersal behavior of the cotton leafworm, *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on Bt and non-Bt cotton: implications for evolution and resistance management. **PLoS one** 9:e111588.

Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG (2008) Integration of insect-resistant genetically modified crops with IPM programs. **Springer**, New York 441 p.

Siegfried BD, Hellmich RL (2012) Understanding successful resistance management: The European corn borer and Bt corn in the United States. **GM Crops & Food** 3:184-193.

Smirnov, N. 1939. On the estimation of the discrepancy between empirical curves of distribution for two independent samples. **Moscow University Mathematics Bulletin** 2: 3-14.

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM. (2010) Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology** 103:1031-1038.

Showers WB, Reed GL, Robinson JF, Derozari MB (1976) Flight and sexual activity of European corn borer. **Environmental Entomology** 5:1099-1104.

Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carrière Y (2009) Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology** 102:2011-2025.

Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology** 31:510-521.

Téllez-Rodríguez P, Raymond B, Morán-Berto I, Rodríguez-Cabrera L, Wright DJ, Borroto CG, Ayra-Prado C (2014) Strong oviposition preference for Bt over non-Bt maize in *Spodoptera frugiperda* and its implications for the evolution of resistance. **BMC Biology** 12:48.

Wangila DS, Leonard BR, Ghimire MN, Bai Y, Zhang L, Yang Y, Emfinger KD, Head GP, Yang F, Niu Y, Huang F (2013) Occurrence and larval movement of *Diatraea*

saccharalis (Lepidoptera: Crambidae) in seed mixes of non-Bt and Bt pyramid corn. **Pest Management Science** 69:1163-1172.

Zalucki MP, A. R. Clarke AR, Malcom SB (2002) Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. **Annual Review of Entomology** 47:361-393.

Zhang JH, Wang CZ, Qin JD, Guo SD (2004) Feeding behavior of *Helicoverpa armigera* larvae on insect-resistant transgenic cotton and non-transgenic cotton. **Journal of Applied Entomology** 128:218-225.

CAPÍTULO 3 - MISTURA DE SEMENTES EM MILHO BT “PIRAMIDADO” NO MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO – Vários eventos de milho que expressam toxinas inseticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner são eficazes à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), e na redução dos danos às plantas de milho. No entanto, a alta adoção do milho Bt e a ausência de refúgios efetivos, tem levado à seleção de populações resistentes da praga, o que contribui para a evolução da resistência. Neste estudo foi avaliada em campo a estratégia de mistura de sementes. Os estudos foram realizados avaliando-se quatro proporções de mistura de sementes (2,5; 5,0; 7,5; e 10,0%) contendo milho Bt e não-Bt, um tratamento em refúgio estruturado e dois tratamentos controle (um com apenas sementes Bt e outro somente com sementes não-Bt). Os experimentos foram conduzidos nas safras de verão e inverno, nos anos agrícolas (2016 e 2017). A avaliação foi conduzida com dois híbridos de milho Bt em pirâmide de genes, Agrisure Viptera 3110 e YieldGard VT Pro 3. Os resultados demonstram que a estratégia de mistura de sementes com Agrisure Viptera 3110 controla eficientemente as lagartas de *S. frugiperda*. Nas avaliações realizadas não foram encontradas lagartas sobreviventes de *S. frugiperda* nas plantas de Agrisure Viptera 3110. As injúrias causadas às plantas de Agrisure Viptera 3110 foram insignificantes nas proporções de refúgios e safras avaliadas, menos de 5% das plantas apresentaram injúrias, e destas, menos de 0,5% com nota de injúria ≥ 3 . Observou-se que as lagartas de *S. frugiperda* podem sobreviver em plantas de YieldGard VT Pro 3, com maior incidência na safra de inverno. As injúrias foram variáveis entre as proporções de refúgio, não diferindo entre si. Nas safras de verão, entre 18 a 28% das plantas apresentaram injúrias, com menos de 14% das plantas com nota de injúria ≥ 3 , no entanto nas safras de inverno a porcentagem de plantas com injúria foi próxima a 40%, destas, mais de 40% apresentaram nota de injúria ≥ 3 . Os resultados demonstram que a estratégia de mistura de sementes pode não ser efetiva para retardar a evolução de resistência de *S. frugiperda* com o uso do milho YieldGard VT Pro 3, devido a eficácia das proteínas Cry. O milho Agrisure Viptera 3110, embora altamente eficaz no controle de *S. frugiperda*, não deve ser recomendado nesta estratégia de refúgio, pois poderia reduzir a eficácia da proteína Vip3A, expressa em plantas de milho Viptera.

Palavras-chave: lagarta-do-cartucho, manejo de resistência de insetos, milho Bt, refúgio na sacaria, piramidação de genes

CHAPTER 3 - SEED MIXTURES OF “PYRAMIDED” BT MAIZE IN THE MANAGEMENT OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT – Several maize events expressing insecticidal toxins derived from *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner are effective in managing fall armyworms and reducing damage to maize plants. However, the high adoption of Bt maize leads to the selection of resistant populations of the pest, which contributes to the evolution of resistance. In this study, we evaluated the seed mixture strategy in the field. The studies were conducted in the field, evaluating four (2.5, 5, 7.5 and 10.0%) seed mixture ratios containing Bt and non-Bt maize, a treatment with structured refuges, and two control treatments (one with only Bt seeds and another with only non-Bt seeds). The experiments were carried out in the summer and winter crop seasons of 2016 and 2017. The evaluation was conducted with two pyramided Bt maize hybrids, Agrisure Viptera 3110, and YieldGard VT Pro 3. Our results demonstrate that the seed mixture strategy with Agrisure Viptera 3110 efficiently controls *S. frugiperda* larvae. In the evaluations performed, no surviving *S. frugiperda* larvae were found in the Agrisure Viptera 3110 plants. The damage to Agrisure Viptera 3110 plants was insignificant in the ratios of refuges and harvests evaluated; less than 5% of plants showed damage, and of these, less than 0.5% had a damage score ≥ 3 . We observed that *S. frugiperda* larvae can survive in Yieldgard VT Pro 3 plants, with a higher incidence in winter crops. The injuries were variable between the proportions of refuge, but were not significantly different. In the summer crops, between 18% and 28% of the plants showed damage, with less than 14% of these showing a damage score ≥ 3 ; however, in the winter crops, the percentage of damaged plants was close to 40%; of these, more than 40% presented an injury score ≥ 3 . The results demonstrate that the seed mixture method may not be effective in delaying the evolution of *S. frugiperda* resistance with the use of YieldGard VT Pro 3 maize, due to the effectiveness of the Cry proteins. Agrisure Viptera 3110 maize, although highly effective in the control of *S. frugiperda*, should not be recommended in this refuge strategy, as it could reduce the effectiveness of the Vip3A protein expressed in maize Viptera plants.

Keywords: fall armyworm, insect resistance management, Bt maize, refuge in the bag, gene pyramiding

1. Introdução

Culturas geneticamente (GM) modificadas expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner foram plantadas em 101,1 milhões de hectares no mundo em 2017, incluindo 95,8% das áreas de milho no Brasil (James, 2017). O uso intensivo de cultivos Bt, como verificado no Brasil, impõe uma alta pressão de seleção sobre populações de pragas-alvo. Esta pressão de seleção pode levar à rápida evolução de resistência (Tabashnik et al., 2013). Em milho, a evolução de resistência a proteína Cry1F já foi relatada em Porto Rico (Storer et al., 2010), Estados Unidos (Huang et al., 2014) e Brasil (Farias et al., 2014; Huang et al., 2014), além de Cry1Ab (Omoto et al., 2016), neste último. As principais causas que favoreceram a seleção de indivíduos portadores de alelos de resistência no Brasil foram a disponibilidade constante de hospedeiros, áreas de refúgios naturais insuficientes e a sobrevivência de indivíduos heterozigotos no milho Cry1F (Farias et al., 2014; Farias et al., 2016).

As principais estratégias para o manejo de resistência de insetos – MRI tem sido a estratégia de alta dose/refúgio (Roush, 1994; Head e Greenplate, 2012; Tabashnik et al., 2013) e plantas em pirâmide de genes (Storer et al., 2012; Tabashnik e Carrière, 2017). A estratégia de alta dose é baseada no conceito de que as plantas Bt devem controlar, além dos indivíduos homozigotos suscetíveis, quase todos os insetos heterozigotos; adicionalmente, os indivíduos suscetíveis produzidos nas áreas de refúgio (não-Bt) se acasalarão com os raros indivíduos homozigotos resistentes que poderão emergir da cultura Bt, reduzindo os níveis dos portadores de alelos de resistência (Gould, 1998; Tabashnik e Carrière, 2017). A pirâmide de genes funciona como uma estratégia de ataque múltiplo, pois as plantas contêm dois ou mais genes Bt, com modo de ação distinto, visando ao controle da mesma praga-alvo (Gould, 1998; Carrière et al., 2010).

A porcentagem de área de refúgio preconizada para o milho no Brasil, é de 10% da área Bt (IRAC, 2018). O refúgio deve ser implementado de forma estruturada, podendo ser disposto de várias formas, por exemplo em blocos, faixas ou nas margens das áreas Bt. A área de refúgio deve estar a uma distância mínima de 800 m da área Bt (IRAC 2018). No entanto características do cenário agrícola

brasileiro como a baixa adoção de áreas de refúgio e a utilização de eventos não “piramidados” podem contribuir para a evolução da resistência de pragas (Omoto et al., 2016).

Para tentar reduzir a não conformidade de áreas de refúgio, tem sido sugerida uma estratégia alternativa comumente referida como mistura de sementes (“refúgio na sacaria” ou RIB) (Gould 1998, Carroll et al., 2012). Nesta estratégia é adicionada uma proporção predeterminada de sementes não-Bt junto as sementes Bt e desta maneira a não-conformidade aos requisitos de refúgio é eliminada (Gould, 1996; Onstad et al., 2011).

Uma grande preocupação para a implementação da mistura de sementes é a movimentação da praga, o que pode afetar negativamente o refúgio. A eficácia da estratégia da mistura de sementes para o MRI tem sido um tema discutido por pelo menos duas décadas (Mallet e Porter, 1992; Onstad et al., 2011; Carroll et al., 2012; Carrière et al., 2016). Estudos dos efeitos de misturas de sementes de milho Bt piramidado na sobrevivência e na movimentação da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) devem fornecer subsídios importantes para a implementação de estratégias de MRI.

A lagarta-do-cartucho é uma espécie polífaga e principal praga do milho e de várias culturas agrícolas importantes no Brasil e no continente americano (Andrews, 1980; Cruz et al., 2012; Nagoshi et al., 2015). As lagartas podem danificar as plantas de milho desde o início do desenvolvimento vegetativo até a maturidade. As perdas de rendimento podem atingir 57%, dependendo do estágio fenológico da cultura (Andrews, 1988; Cruz et al., 1999). Além disso, a espécie é a única no mundo a desenvolver a resistência a proteína Cry1F em três países, além de Cry1Ab no Brasil.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a estratégia de mistura de sementes no manejo de *S. frugiperda*. Os estudos foram conduzidos em campo, avaliando dois híbridos de milho Bt piramidado (um com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 e um com a tecnologia YieldGard VT Pro 3) em quatro proporções de mistura de sementes (Bt e não-Bt), contendo (2,5; 5,0; 7,5; e 10,0%), nas safras de verão e inverno, nos anos agrícolas (2016 e 2017).

2. Material e Métodos

2.1. Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos na área experimental da Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão (FEPE) pertencente a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil, em condições de campo nas safras de verão de 2015/2016 e 2016/2017 (coordenadas: 21° 14' 21" S, 48° 17' 21" W e altitude 587 m) e durante as safrinhas de 2016 e 2017 (coordenadas: 21° 43' 28" S, 48° 17' 12" W e altitude 589 m).

O clima da região, segundo Köppen, é classificado como Aw ou tropical úmido, sendo caracterizado por verão chuvoso e inverno seco, com temperatura média de 22° C (Köppen, 1948).

2.2. Milho Bt e não-Bt

Um híbrido de milho Bt contendo a tecnologia YeldGard® VT Pro™ 3 (evento MON 89034 (Cry1A.105 e Cry2Ab2) × MON 88017 (Cry3Bb1), Monsanto do Brasil, Brasil), DKB 177 e dois híbridos com a tecnologia Agrisure® Viptera™ 3110 TGTL Viptera (evento Bt11 (Cry1Ab) × Mir 162 (Vip3Aa20), Syngenta Seeds, Brasil). O milho YeldGard VT Pro 3 continha três genes Bt, incluindo Cry1A.105 e Cry2Ab2 para controle de lepidópteros-praga da parte aérea das plantas e Cry3Bb1 para o controle de *Diabrotica* spp., pragas de raízes. Para a tecnologia YeldGard VT Pro 3, foi utilizado o híbrido comercial DKB 177 nos dois anos agrícolas. Para a tecnologia Agrisure Viptera 3110 foram utilizados os híbridos Syngenta Impacto (safras de verão) e Syngenta Fórmula (safras de inverno). Além disso as suas isolinhas (milho não-Bt) foram utilizadas nesse estudo. O cultivo dos híbridos de milho seguiu as recomendações técnicas de cultivo para a região de Jaboticabal, conforme especificado pelas empresas.

2.3. Semeadura e condução do experimento

A área de milho da safra de verão do ano agrícola 15/16 foi semeada em 05 de dezembro de 2015 e da safra 16/17 em 08 de dezembro de 2016. A área de milho safrinha 2016 foi semeada em 20 de fevereiro de 2016 e a safrinha 2017 em 18 de fevereiro de 2017. A semeadura foi realizada em sistema convencional de plantio.

A semeadura do milho Bt foi realizada mecanicamente com auxílio de uma semeadora adubadora em sistema de arrasto. Nas parcelas constituídas por mistura de sementes e refúgio estruturado, as sementes de milho não-Bt foram semeadas manualmente, de acordo com a porcentagem de mistura de sementes previamente estabelecida.

Em cada ponto de plantio da semente não-Bt, foram semeadas duas sementes, distante 5 cm da linha de plantio. Para a identificação das plantas não-Bt na área e para facilitar as amostragens, o local do plantio da semente não-Bt foi identificado no momento do plantio. A identificação foi realizada com uma bandeira de identificação, confeccionada com varetas de madeira (30 cm de comprimento) e com fita adesiva para demarcação. Imediatamente à emergência das plântulas foi realizado o desbaste das plântulas excedentes, conforme densidade planejada ($65.000 \text{ plantas ha}^{-1}$).

Na instalação do experimento e durante o desenvolvimento das plantas de milho o manejo foi realizado com práticas agronômicas convencionais visando o manejo de plantas daninhas e a nutrição das plantas.

Na fase de pré-plantio da cultura, foi aplicado glifosato ($1680 \text{ g i.a. ha}^{-1}$) visando o manejo de plantas daninhas. Na pós-emergência da cultura do milho (25 DAE) e das plantas daninhas foi realizada a aplicação de uma mistura de atrazina + tembotrione ($2000 \text{ g i.a. ha}^{-1} + 100 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, respectivamente).

Na semeadura foi adicionada adubação de plantio, com adição do equivalente a 350 kg ha^{-1} de nitrogênio-fósforo-potássio (NPK; 08-20-18 + 0,3% Zn; Fertilizantes Heringer S.A, Brasil), e no estágio de crescimento vegetativo V4 (quatro folhas totalmente expandidas), 250 kg ha^{-1} da formulação NPK (30-00-10; Fertilizantes Heringer S.A, Brasil).

2.4. Delineamento experimental

Os híbridos de milho foram semeados em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Os tratamentos foram distribuídos em um arranjo 7×4 , sendo que cada bloco continha sete parcelas (cada parcela composta por sete linhas de milho com 20 m de comprimento e espaçamento de 0,5 m entre linhas). A área útil das parcelas foi constituída pelas cinco linhas centrais, descartando-se 2,0 metros iniciais e finais de cada linha, totalizando 40 m². Os tratamentos foram compostos na forma de mistura de sementes constituída por (97,5 - 2,5%); (95,0%-5,0%); (92,5% - 7,5%) e (90,0% - 10,0%), de sementes (Bt - não-Bt), respectivamente, um tratamento em refúgio estruturado, (90,0-10,0% de sementes Bt e não-Bt), um tratamento com 100% de sementes Bt e um tratamento com 100% de sementes não-Bt.

2.5. Amostragem de campo

As avaliações das lagartas de *S. frugiperda* foram realizadas semanalmente, compreendendo o período entre 15 e 43 DAE. As avaliações foram realizadas visualmente observando-se as três folhas centrais do “cartucho” das plantas. Em cada parcela foi realizado dois pontos amostrais sendo cada ponto constituído por 17 plantas (16 plantas Bt: 1 planta não-Bt). Para cada planta avaliada foi atribuída uma nota visual de injúria, de acordo com a escala de Davis (0 – nenhuma injúria visual a 9 – injúrias severas) (Davis et al., 1992). Além da nota de injúria também foi contabilizado o número de plantas com injúria no cartucho (convertido em plantas injuriadas) e na sequência foram convertidos para a porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 . As plantas que continham lagartas de *S. frugiperda* também foram contabilizadas (convertidas na porcentagem de plantas com injúria). O número de plantas com a classificação de injúria ≥ 3 tem sido sugerido como critério para o controle de lagartas de *S. frugiperda* sobreviventes em áreas de milho Bt e não-Bt (refúgio) no Brasil (IRAC, 2018).

Para a estimativa de rendimento de grãos (RG), aos 150 DAE das plantas foi realizada a colheita manual da quinta linha útil de cada parcela. As espigas foram

trilhadas e a umidade foi padronizada a 13% e posteriormente foi estimado o rendimento em Kg ha⁻¹.

2.6. Análise estatística

A porcentagem de plantas de milho Bt com injúrias ocasionadas por *S. frugiperda* e a porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 foram submetidos a análise de deviance (ANADEV) para modelos lineares generalizados com distribuição binomial. As variáveis safras e refúgios foram consideradas fatores fixos no modelo. Para o rendimento de grãos (kg ha⁻¹) foi realizada a análise conjunta dos dados de produção das safras pela análise de variância (ANOVA), no entanto, como não houve interação entre safras $\times$ refúgio, foi realizado apenas um conjunto de intervalos de confiança (IC > 95%) para comparar os tratamentos. Comparações entre as variáveis de produção avaliadas nas tecnologias de milho, não foram realizadas devido as diferenças na base genética dos híbridos. As análises estatísticas dos dados foram realizadas usando o Software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2018).

3. Resultados

A interação safras × refúgio foi significativa para as variáveis porcentagem de plantas de milho danificadas por *S. frugiperda* e para plantas com nota de injúria ≥ 3 (Tab. 1).

Tabela 1. Análises de *Deviance* (ANADEV): % de plantas com injúria, % de plantas com nota de injúria ≥ 3 (escala Davis), ocasionadas por *Spodoptera frugiperda* em milho Bt com as tecnologias Yeldgard VT Pro 3 e Agrisure Viptera 3110 em mistura de sementes nas safras de verão (2015/2016 e 2016/2017) e safra de inverno (2016 e 2017).

Variável resposta	Variável explicativa	g.l.	Deviance	Residual g.l.	Residual Deviance	P- valor
% Plantas injuriadas	Mod. Nulo	--	--	223	12003,4	--
	Safras	7	4363,4	216	7640,0	<0,01**
	Refúgio	6	5793,8	210	1846,2	<0,01**
	Bloco × Safras	24	90,4	186	1755,8	<0,01**
	Safras × Refúgio	42	1534,6	144	221,2	<0,01**
% Plantas com nota de injúria ≥ 3	Mod. Nulo	--	--	223	12265,5	--
	Safras	7	4274,9	216	7990,7	<0,01**
	Refúgio	6	6236,1	210	1754,6	<0,01**
	Bloco × Safras	24	95,3	186	1659,3	<0,01**
	Safras × Refúgio	42	1449,7	144	209,6	<0,01**

** Significativo a 1% de probabilidade pela análise de *Deviance*.

No entanto, não houve efeito significativo na interação safras × refúgio para a variável rendimento de grãos. Analisando os fatores isolados safras e refúgio, verifica-se que estes também afetaram significativamente a porcentagem de plantas injuriadas, plantas com nota de injúria ≥ 3 e o rendimento de grãos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA): rendimento de grãos (kg ha⁻¹) em milho Bt com as tecnologias Yeldgard VT Pro 3 e Agrisure Viptera 3110 em mistura de sementes nas safras de verão (2015/2016 e 2016/2017) e safra de inverno (2016 e 2017).

Variável resposta	Variável explicativa	g.l.	Deviance	Residual g.l.	Residual Deviance	F	P- valor
Rendimento de grãos (kg ha ⁻¹)	Mod. Nulo	--	--	167	989003764	--	--
	Safras	5	853939926	162	135063837	428,90	<0,01**
	Refúgio	6	64134690	156	709299148	26,84	<0,01**
	Bloco × Safras	18	13396870	138	575322278	1,87	0,02*
	Safras × Refúgio	30	14527203	108	43005075	1,22	0,23

* 5% de probabilidade pela análise de *Deviance*. ** Significativo a 1% pela análise de *Deviance*.

3.1. Eficácia em campo das proteínas inseticidas em mistura de sementes

Os eventos de milho Bt piramidado apresentaram variações na eficácia a campo nas proporções de mistura de sementes avaliadas, nas safras de verão (2015/2016 e 2016/2017) e nas safras de inverno (2016 e 2017) no controle de *S. frugiperda* (Figuras 1 e 2).

Na safra 2015/2016, a porcentagem de plantas injuriadas pelas lagartas de *S. frugiperda* foi significativamente maior para YeldGard VT Pro 3 em relação a Agrisure Viptera 3110 (Figuras 1 e 2).

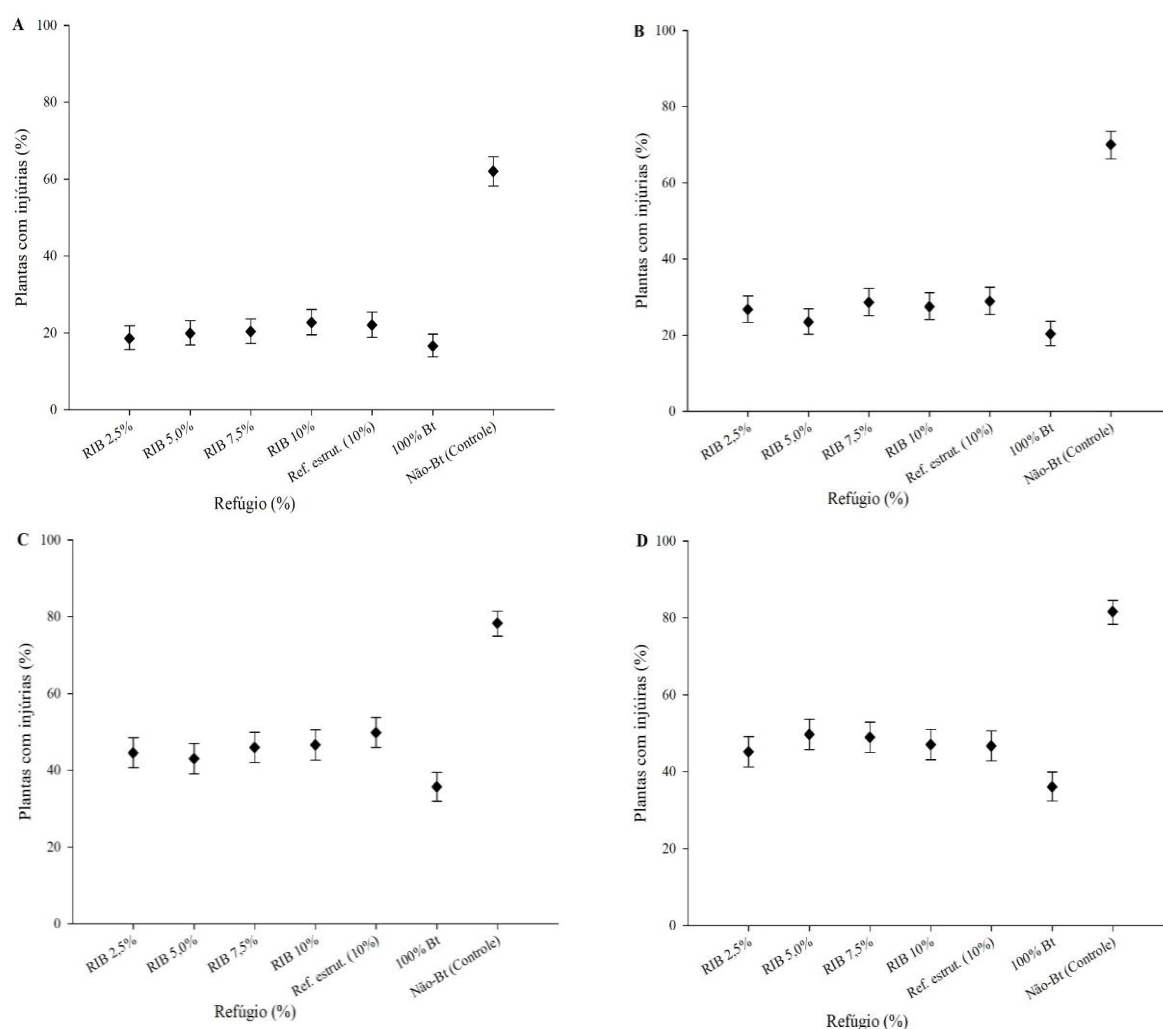


Figura 1. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas de milho com injúrias nas safras de verão: 2015/2016 (A) e 2016/2017 (B); safras de inverno: 2016 (C) e 2017 (D) em milho Bt piramidado com a tecnologia YeldGard VT Pro 3.

A variação de plantas injuriadas nos refúgios foi de 18 a 22% de plantas com injúrias, sem diferenças significativas entre os mesmos. No entanto houve diferenças destes com o controle (plantas não-Bt) (43% de plantas com injúrias) (Fig. 1A). No milho Bt com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 a porcentagem de plantas injuriadas nos refúgios foi reduzida, < 3,0% das plantas foram danificadas pelas lagartas, em relação ao milho não-Bt (35% de plantas com injúrias) (Fig. 2A).

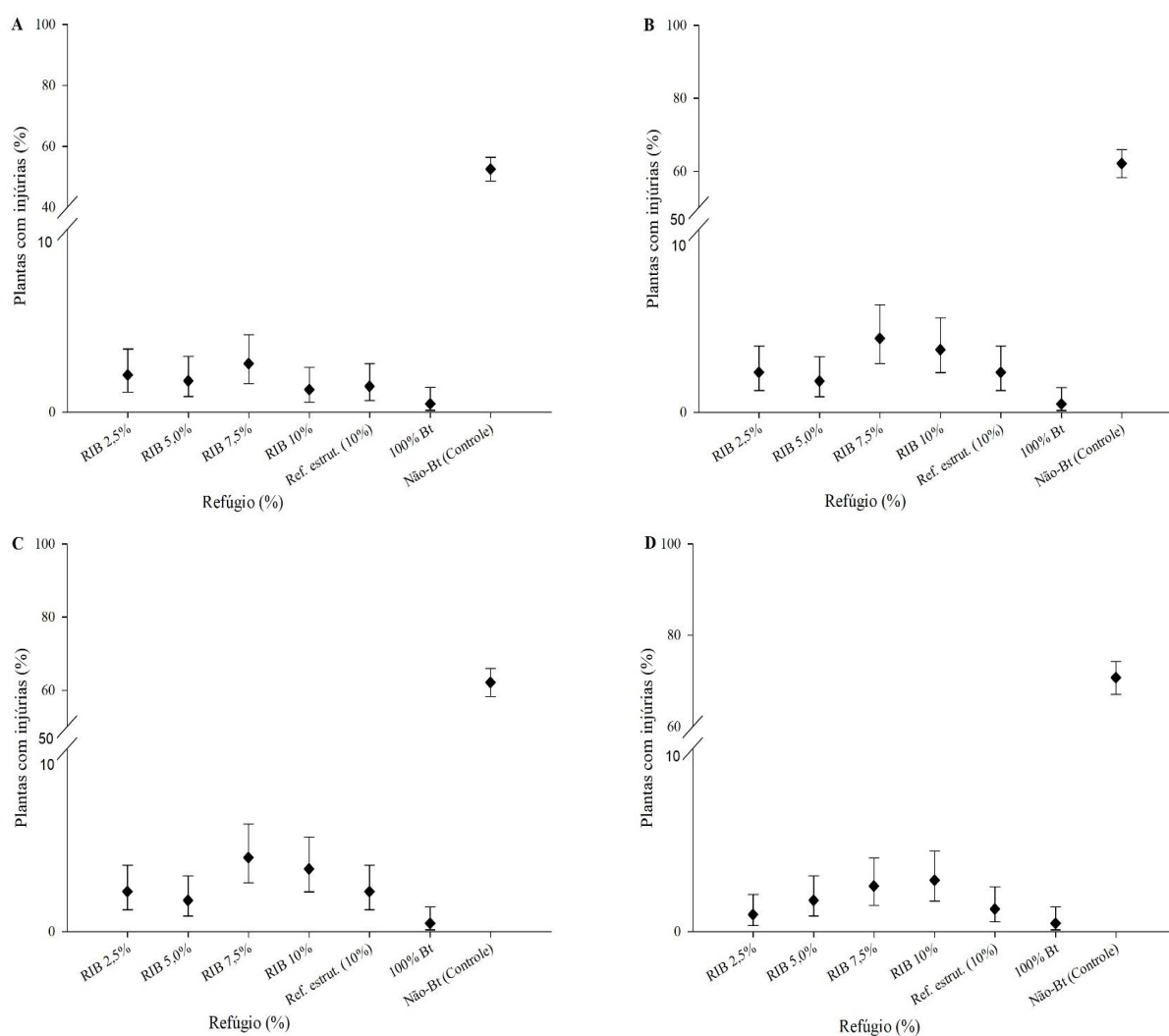


Figura 2. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas de milho com injúrias nas safras de verão: 2015/2016 (**A**) e 2016/2017 (**B**); safras de inverno: 2016 (**C**) e 2017 (**D**) em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110.

Na safra 2016/2017, a porcentagem de injúria nas plantas em mistura de sementes com a tecnologia YeldGard VT Pro 3 variou de 23 a 28%, sem diferenças

significativas na porcentagem de refúgio avaliada, no entanto, nas plantas não-Bt observou-se uma taxa de 1,9 vezes a mais de plantas com injúria (Fig. 1B). Nos refúgios com milho Agrisure Viptera 3110 a porcentagem de plantas injuriadas foi < 4,0%, diferindo das plantas não-Bt com > 32% de plantas com injúrias (Fig. 2B).

Nas safras de inverno, foi verificado um aumento significativo nas injúrias causadas por *S. frugiperda* nas plantas com a tecnologia YeldGard VT Pro 3 em todas as proporções de mistura de sementes, não diferindo entre si. Na safrinha 2016 a porcentagem de plantas com injúrias variou de 42 a 46% entre os refúgios. Houve diferença significativa com plantas não-Bt (controle) que apresentou 78% das plantas com nota de injúria (Fig. 1C). No milho Agrisure Viptera 3110 a taxa de plantas injuriadas permaneceu baixa entre os refúgios < 3%, diferenciado também das plantas não-Bt, com 75% (Fig. 2C).

Na safra de inverno 2017 a injúrias as plantas de YeldGard VT Pro 3 variaram de 45 a 49% nos refúgios (Fig. 1D). A porcentagem de injúrias nas plantas nos refúgios com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 foi inferior a 2%. No milho não-Bt, de ambas as tecnologias foi verificado injúrias superior a > 75% das plantas (Fig. 2D).

Ao avaliar a porcentagem de plantas com injúrias ≥ 3 , observa se que na safra de verão 2015/2016 a variação foi de 3 a 7% nos refúgios com milho YeldGard VT Pro3, não diferindo entre si, no entanto, diferença significativa foi observada em relação ao milho não-Bt, com 48% das plantas com uma classificação ≥ 3 (Fig. 3A). No milho Agrisure Viptera 3110, menos de 0,5% das plantas receberam a classificação ≥ 3 , diferindo do milho não-Bt com 36% de plantas com nota de injúria ≥ 3 (Fig. 4A).

Na safra 2016/2017 houve um aumento na porcentagem das plantas com injúria, a variação foi de 9 a 14%, sem diferenças entre os refúgios, no entanto estes diferiram do não-Bt, com > 52% das plantas com injúria ≥ 3 (Fig. 3B). Em Agrisure Viptera 3110, a porcentagem de plantas com esta classificação nos refúgios, foi inferior a 0,7%, estas, diferiram das plantas não-Bt, que apresentaram uma classificação superior a > 44% das plantas (Fig. 4B).

Nas safras de inverno 2016 e 2017, as maiores porcentagens de plantas com nota de injúria ≥ 3 foi verificada nos refúgios com a tecnologia YeldGard VT Pro 3

(Fig. 3C e 3D). Na safra de inverno 2016 a variação foi de 33 a 42% de plantas com classificação ≥ 3 , sem diferenças significativas entre os refúgios, no entanto quando comparados ao milho não-Bt (70%), houve diferença significativa (Fig. 3C).

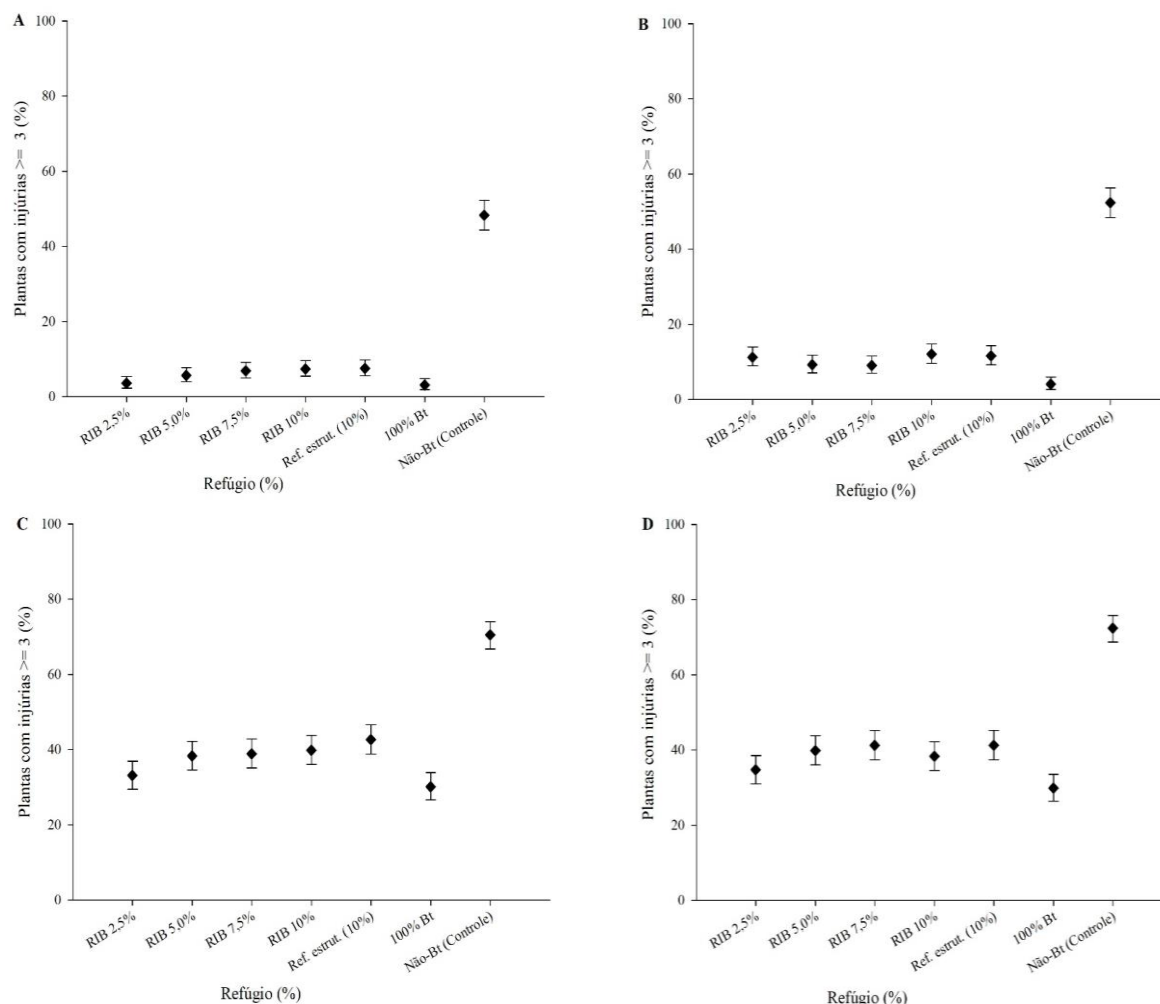


Figura 3. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 nas safras de verão: 2015/2016 (A) e 2016/2017 (B) e safras de inverno: 2016 (C) e 2017 (D) em milho Bt piramidado com a tecnologia YeldGard VT Pro 3.

Na safra 2017 a variação foi de 34 a 41% das plantas, diferindo apenas de plantas não-Bt com 72% (Fig. 3D). De maneira geral nas duas safras de inverno, as plantas com a tecnologia Agrisure Viptera 3110, apresentaram reduzida porcentagem de injúrias com classificação ≥ 3 , sendo inferior a 0,5% das plantas, no entanto, as injúrias nas plantas não-Bt foram de aproximadamente 70% das plantas nas duas safras (Figs. 4C e 4D).

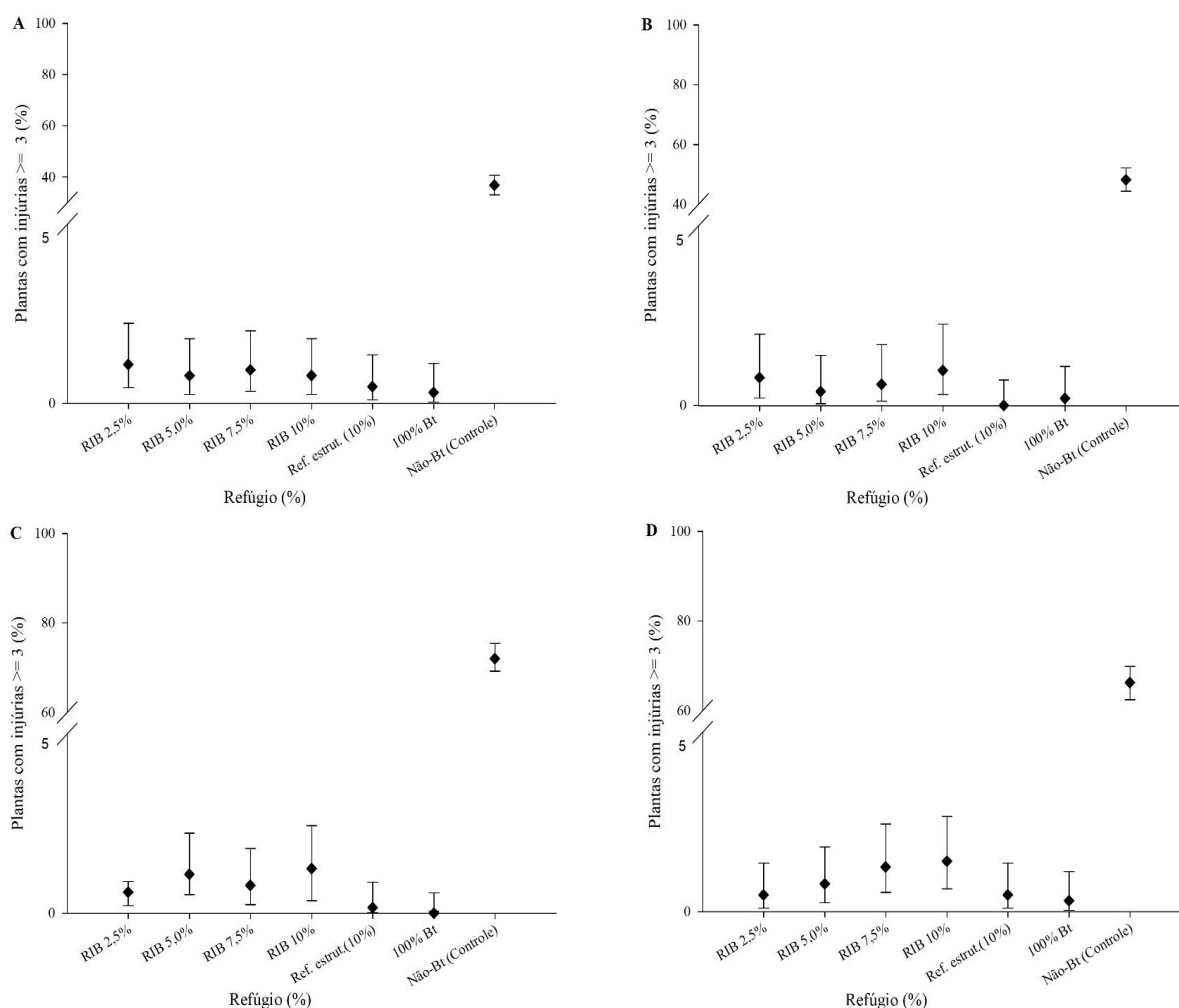


Figura 4. Intervalos de 95% de confiança da porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 nas safras de verão: 2015/2016 (**A**) e 2016/2017 (**B**) e safras de inverno: 2016 (**C**) e 2017 (**D**) em milho Bt piramidado com a tecnologia Agrisure Viptera 3110.

3.2. Eficácia a campo dos eventos de milho Bt piramidado

Houve variação na eficácia a campo dos eventos de milho YeldGard VT Pro 3 e Agrisure Viptera 3110, considerando os tratamentos com 100% de plantas Bt, nas safras de milho avaliadas (Figs. 1 e 2).

No milho YeldGard VTPro 3, na safra de verão 2015/2016, mais de 16% das plantas Bt apresentaram injúrias por *S. frugiperda* (Fig. 1A). Na safra 2016/2017, as injúrias às plantas foram superiores a 20% (Fig. 1B). Quando observadas as safras de inverno 2016 e 2017, observa-se que houve um aumento considerável na

porcentagem de plantas com injúrias, próximo de 35% (Figs. 1C e 1D). Ao analisar a porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 , verifica-se que nas safras de verão, 2015/2016 e 2016/2017 foi inferior a 4%, no entanto, nas safras de inverno houve um aumento considerável, com $\sim 30\%$ das plantas com notas de injúria ≥ 3 (Fig. 3).

No milho com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 a porcentagem de plantas com injúria foi inferior a 0,5% nas quatro safras avaliadas (Fig. 2). Quando avaliada em % de plantas com notas de injúria ≥ 3 , a classificação foi muito reduzida, $< 0,3\%$ (Fig. 4).

3.3. Rendimento de grãos

Houve diferenças significativas no rendimento de grãos nos refúgios (Fig. 3). O rendimento de grãos no refúgio com mistura de sementes na proporção de 2,5 foi superior aos demais, 7440 kg ha^{-1} , seguido pela proporção de 5,0% (7169 kg ha^{-1}), que não diferenciou do refúgio estruturado (7228 kg ha^{-1}) (Fig. 5).

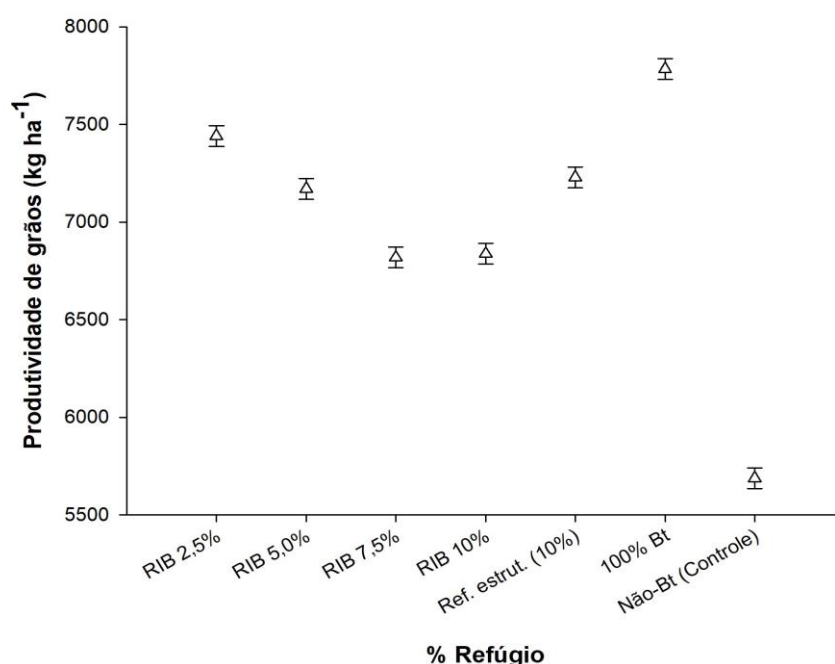


Figura 5. Médias e Intervalos de 95% de confiança para o rendimento de grãos em milho Bt piramidado com as tecnologias YieldGard VT Pro 3 e Agrisure Viptera 3110.

Os refúgios de 7,5% e 10% não diferiram entre si, o rendimento de grãos foi de 6818 e 6837 kg ha⁻¹, respectivamente. No tratamento com 100% de plantas Bt foi verificado o maior rendimento (7784 kg ha⁻¹). O menor rendimento de grãos foi observado no tratamento controle (5688 kg ha⁻¹) (Fig. 5).

4. Discussão

Diferentemente da primeira geração de plantas de milho Bt, que expressavam uma única proteína inseticida de *B. thuringiensis*, na segunda geração, espera-se que os híbridos em pirâmide de genes sejam mais eficazes contra insetos-praga alvo da cultura, como *S. frugiperda*. No entanto, resultados de pesquisa demonstrando a eficácia em campo de milho Bt com pirâmide de genes e em mistura de sementes no controle de *S. frugiperda* são escassos. Os resultados deste estudo demonstram que a mistura de sementes com a tecnologia YeldGard VT Pro 3 apesar de ter apresentado alto controle de *S. frugiperda* nas safras de verão (2015/2016 e 2016/2017) (< 8% plantas com injúrias ≥ 3), não foi efetiva nas safras de inverno (2016 e 2017) (aproximadamente 40% de plantas com injúrias ≥ 3) (Tab. 1), resultando em falhas de controle nas proporções de refúgio avaliadas.

A reduzida infestação de *S. frugiperda* nas safras de verão pode ser explicada pela baixa/ausência de plantas hospedeiras em campo, no período da entressafra (julho a novembro) na região de condução dos experimentos. Esse fator reduz a população da praga que só irá aumentar sua densidade populacional quando o alimento estiver disponível novamente, ou seja, no início de uma nova safra.

Outro fator que pode ter contribuído para a redução da densidade populacional da praga é a maior quantidade de chuvas na safra de verão, nos instares iniciais de desenvolvimento, as lagartas ficam mais sujeitas a mortalidade seja por afogamento no interior do cartucho das plantas ou mesmo o deslocamento causado por estas (Cruz 1999). Entretanto, na safra de inverno ocorre uma inversão nas condições do ambiente, as condições climáticas se tornam favoráveis a espécie, alta disponibilidade de alimentos, presença de gerações sobrepostas, que contribuirão para o aumento da densidade populacional da praga (Cruz, 1999) e consequentemente as injúrias verificadas nas plantas.

O aumento significativo das infestações de *S. frugiperda* no período da safra de inverno poderia também, estar relacionado como consequência da alta pressão de seleção e da baixa adoção de áreas de refúgio para o MRI no plantio das safras de verão. Este cenário poderia contribuir para a sobrevivência de insetos heterozigotos, que são os carreadores de alelos de resistência, e neste caso são os maiores responsáveis pela evolução de resistência (Gould, 1998).

Por outro lado, a movimentação das lagartas entre plantas de milho Bt e não-Bt nos refúgios em mistura de sementes pode ter exposto as lagartas a subdoses das proteínas inseticidas expressas no milho YeldGard VT Pro 3. Essa movimentação pode aumentar a sobrevivência dos indivíduos heterozigotos nas plantas Bt (Murphy et al., 2010), principalmente na segunda safra onde foi verificado alta porcentagem de plantas com nota de injúria ≥ 3 . Estudos anteriores evidenciaram que plantios em mistura de sementes, em que a praga apresente alta movimentação larval pode acelerar a resistência por redução da sobrevivência de indivíduos homozigotos suscetíveis e aumento da sobrevivência relativa de indivíduos heterozigotos (Mallet e Porter, 1992; Davis e Onstad, 2000; Onstad et al., 2011; Tabashnik et al., 2013). No Capítulo 2, apresentamos resultados que evidenciam a sobrevivência das lagartas quando expostas ao longo do desenvolvimento em tecidos foliares de plantas Bt com a tecnologia YeldGard VT Pro 3. Evidenciamos também que as lagartas de *S. frugiperda* apresentam alta capacidade de movimentação entre as plantas de milho Bt e não-Bt. Se levado em conta esse cenário, fica evidenciado que a mistura de sementes para o milho YeldGard VT Pro 3, não seria a melhor estratégia para o MRI de *S. frugiperda*.

Outro aspecto importante a ser considerado é a presença em campo de populações de *S. frugiperda* resistentes as proteínas Cry1F e Cry1Ab no Brasil (Farias et al. 2014; Huang et al., 2014; Omoto et al., 2016). Esse aspecto gera preocupação, uma vez que estudos anteriores demonstraram que proteínas do grupo Cry1 apresentam similaridade na sequência de aminoácidos, e os mesmos sítios de ligação (Huang et al., 2014; Bernardi et al., 2015; Carrière et al., 2015; Santos-Amaya, et al., 2015). Carrière et al. (2015) verificaram que as proteínas Cry1F e Cry1A.105 apresentam 72% de similaridade. Nesse caso fica evidente que pode ocorrer a resistência cruzada entre as proteínas inseticidas do grupo Cry1.

Com isso, o efeito da piramidação de genes na tecnologia YeldGard VT Pro3, é descartado, o que pode implicar diretamente na redução da eficiência de controle de *S. frugiperda* pela tecnologia, se adotada a estratégia de refúgio com mistura de sementes, conforme observamos e ainda, contribuir para a evolução de resistência de *S. frugiperda*.

Estudos anteriores verificaram que a proteína Cry2Ab2, possui aproximadamente 34 e 35% de similaridade com Cry1F e Cry1A.105, respectivamente, mas esta não compartilha o mesmo sítio de ligação com as proteínas Cry1 (Hernandez-Rodriguez et al., 2013; Carrière et al., 2015). O histórico da tecnologia YeldGard® VT Pro™ em campo demonstra que desde a sua liberação comercial em 2009, as injúrias de *S. frugiperda* às plantas Bt tem aumentado significativamente ao longo das safras nas regiões de cultivo do estado de São Paulo, variando de 0,81 (safra 2010/2011) para próximo de 4 (safra 2017) (Waquil et al., 2013; Moraes et al., 2015; Michelotto et al., 2017a; 2017b). Santos-Amaya et al. (2015) verificaram que *S. frugiperda* possui um alto potencial de adaptação as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2. Essa adaptação da praga a estas proteínas pode contribuir para a eficácia da tecnologia em campo. Além de YeldGard VT Pro 3, as tecnologias YeldGard® VT Pro™ e PowerCore™ expressam estas proteínas inseticidas, além de Cry1F em PowerCore (CTNBio, 2018).

Os resultados do milho Bt com a tecnologia Agrisure Viptera 3110, demonstram que a proteína Vip3A expressa na tecnologia é altamente eficaz no controle *S. frugiperda*. A porcentagem de injúrias nas plantas foi insignificante em todas as porcentagens de refúgio e nas safras avaliadas (Fig. 2), mesmo quando observado as safras de inverno onde a infestação da praga é maior. Estudos conduzidos em condições de campo, laboratório e casa de vegetação demonstram que a proteína inseticida tem sido extremamente eficaz no controle de *S. frugiperda* (Yang et al., 2013; Huang et al., 2014; Moraes et al., 2015; Michelotto et al., 2017a; 2017b). Michelotto et al. (2017a) avaliando em campo a eficiência de híbridos de milho Bt com diferentes tecnologias, a lagarta-do-cartucho durante quatro anos agrícola na safrinha (2013 a 2017) no estado de São Paulo, verificaram notas de injúrias inferiores a 0,5 em plantas de milho com a tecnologia Viptera 3. Nos híbridos de milho não-Bt a nota de injúria foi superior a 7.

No período das avaliações realizadas em campo não foram encontradas lagartas sobreviventes de *S. frugiperda* nas plantas de milho com a tecnologia Agrisure Viptera 3110 em nenhuma das safras avaliadas. Esses resultados observados no campo são suportados pelo que verificamos nos ensaios de laboratório em que as lagartas de *S. frugiperda* quando expostas ao longo do seu desenvolvimento para alimentar de tecido foliar de milho Agrisure Viptera 3110, não sobreviveram (Capítulo 2). Estudos conduzidos por Huang et al. (2014) observaram que lagartas de *S. frugiperda* resistentes a proteína Cry1F também não sobreviveram quando alimentadas com tecido foliar ou infestadas em plantas de milho expressando a proteína Vip3A.

A proteína Vip3A é uma proteína relativamente nova com um modo de ação distinto das proteínas Cry. Para aumentar a eficácia das tecnologias de milho Bt à *S. frugiperda* novas combinações de genes, envolvendo a proteína Vip3A estão sendo aprovadas comercialmente, além da cultura do algodão (CTNBio, 2018). O que reforça a importância da preservação da tecnologia, pois o uso intensivo pode colocar a tecnologia em risco.

Os dados conjuntos do rendimento de grãos demonstram que entre os refúgios em mistura de sementes, o refúgio de 2,5% foi o mais produtivo, seguido pelo refúgio de 5,0%, que não se diferenciou da área com refúgio estruturado. Comparando a produção da área de refúgio estruturado, que é o tipo de refúgio recomendado no Brasil e o RIB 2,5%, verifica-se que a produção do refúgio estruturado foi inferior em 1,03 vezes a do tratamento RIB. Como esperado a menor produção seria nos híbridos não-Bt com redução de mais de 26% e 21% em relação ao RIB 2,5% e refúgio estruturado, respectivamente.

Os resultados verificados neste trabalho têm implicações significativas para o MRI de *S. frugiperda* e demonstra que a tecnologia Bt depende também da aplicabilidade conjunta das táticas do MIP, como rotação de culturas, monitoramento de adultos, preservação dos inimigos naturais, e complementação com inseticidas seletivos, quando necessário. Ademais a estratégia de mistura de sementes com YeldGard VT Pro3 e Agrisure Viptera 3110, não parece ser a melhor estratégia para o manejo de resistência de *S. frugiperda* em milho Bt dado os resultados apresentados e discutidos neste trabalho.

5. Conclusões

As injúrias de lagartas de *S. frugiperda* são reduzidas na safra de verão, no entanto, a intensidade aumenta nas safras de inverno.

Os resultados demonstram que a estratégia de mistura de sementes pode não ser efetiva para retardar a evolução de resistência de *S. frugiperda* com o uso do milho YeldGard VT Pro 3.

O milho Agrisure Viptera 3110, embora altamente eficaz no controle de *S. frugiperda*, não deve ser recomendado nesta estratégia de refúgio, pois pode reduzir a eficácia da proteína Vip3A, expressa em plantas de milho Viptera.

6. Referências

Andrews, KL (1980) The whorlworm, *Spodoptera frugiperda*, in Central America and neighboring areas. **Florida Entomologist** 63:456-467.

Andrews KL (1988) Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist** 71:630-653.

Bernardi O, Bernardi D, Ribeiro RS, Okuma DM, Salmeron E, Fatoretto J, Medeiros FCL, Burd, T, Omoto C (2015) Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection** 76:7-14.

Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik BE (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology** 33:161-168.

Carrière Y, Crowder DW, Tabashnik BE (2010) Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications** 3:561-573.

Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik BE (2016) Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? **Trends in Biotechnology** 34:291-302.

Carroll MW, Head G, Caprio M (2012) When and where a seed mix refuge makes sense for managing insect resistance to Bt plants. **Crop Protection** 38:74-79.

Cruz I, Figueiredo M, Silva RB, Silva IF, Paula CS, Foster JE (2012) Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize. **Integrated Journal Pest Management** 58:83-90.

Cruz, I, Figueiredo M, Oliveira AC, Vasconcelos CA (1999) Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **Integrated Journal Pest Management** 45:293-296.

Davis FM, Ng SS, Williams WP (1992) **Visual rating scales for screening whorl stage corn for resistance to fall armyworm**. Mississippi: Agricultural and Forestry Experiment Station. USDA. 9 p. (Technical Bulletin, 186).

Davis PM, Onstad DW (2000) Seed mixtures as a resistance management strategy for European corn borers (Lepidoptera: Crambidae) infesting transgenic corn expressing Cry1Ab protein. **Journal of Economic Entomology** 93:937-948.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection** 64: 150-158.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Santos ACD, Omoto C (2016) Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest management science**, 72:974-979.

Gould F (1996) Deploying pesticidal engineered crops in developing countries. In: Persley GJ (Ed.) **Biotechnology and Integrated Pest Management**, CABI: Wallingford, p.264-293.

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

Head GP, Greenplate J (2012) The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. **GM Crops & Food** 3:144-153.

Hernandez-Rodriguez C, Hernandez-Martinez P, Van Rie J, Escriche B, Ferre J (2013) 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** 8:e0068164.

Huang F, Qureshi JA, Meagher Jr RL, Reisig DD, Head GP, Andow DA, Ni X, Kerns D, Buntin GD, Niu Y, Yang F, Dangal V (2014) Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS one** 9: e112958.

IRAC- Insect Resistance Action Committee (2018) Recomendações de manejo da resistência a inseticidas e manejo de pragas para soja, algodão e milho no Brasil. [Online]. Insect **Resistance Action Committee**. Disponível em: http://media.wix.com/ugd/2bed6c_52f993a9b3ed4c548138d3fbf81c283c.pdf. Acesso em 28 de jun. 2018).

James C. (2017) **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017** Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. Ithaca: ISAAAA, 2017. (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA Brief, 53).

Köppen W (1948) **Climatologia**: con um estúdio de los climas de la Tierra. México: Fondo de Cultura Economica. 479p.

Mallet J, Porter P (1992) Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy? **Proceedings of the royal society** 250:165-169.

Michelotto MD, Duarte AP, Freitas RS, Miguel FB, Netto, JC (2017a) Controle da lagarta-do-cartucho em milho transgênico na safrinha em São Paulo: Dez anos de uso. **Nucleus** EE:67-74.

Michelotto, MD, Neto JC, Pirotta MZ, Duarte AP, Freitas RS, Finoto EL (2017b) Efficacy of transgenic maize insecticide treatment to control fall armyworm in late-season maize in São Paulo state, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia** 41:128-138.

Moraes ARA, Lourenção AL, Paterniani MEAGZ (2015) Resistência de híbridos de milho convencionais e isogênicos transgênicos a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) **Bragantia** 74:50-57.

Murphy AF, Ginzel MD, Krupke CH (2010) Evaluating western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) emergence and root damage in a seed mix refuge. **Journal of Economic Entomology** 103:147-157.

Nagoshi RN, Rosas-García NM, Meagher RL, Fleischer SJ, Westbrook JK, Sappington TW, Hay-Roe M, Thomas JMG, Murúa GM (2015) Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology** 108:135-144.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72:1727-1736.

Onstad DW, Mitchell PD, Hurley TM, Lundgren JG, Porter RP, Krupke CM, Spencer JL, DiFonzo CD, Baute TS, Hellmich RL, Buschman LL, Hutchison WD, Tooker JF (2011) Seeds of change: corn seed mixtures for resistance management and integrated pest management. **Journal of Economic Entomology** 104:343-352.

R Core Team (2018) R: the R project for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Version 3.5.1.

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

Santos-Amaya OF, Rodrigues JV, Souza TC, Tavares CS, Campos SO, Guedes RN, Pereira EJG (2015) Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific Reports** 5:18243.

Sparks AN (1979) A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist** 62:82-87.

Storer NP, Thompson GD, Head GP (2012) Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. **GM crops & food** 3:154-162.

Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y (2013) Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology** 31:510-521.

Tabashnik BE, Carrière Y (2017) Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature biotechnology** 35:926-935.

Yang F, Huang F, Qureshi JA, Leonard BR, Niu Y, Zhang L, Wangila DS (2013) Susceptibility of Louisiana and Florida populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to transgenic Agrisure® Viptera™ 3111 corn. **Crop Protection** 50:37-39.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil, após a aprovação comercial do milho Bt, ocorrida em 2005 e com novas liberações comerciais nos anos seguintes, houve uma rápida adoção de cultivo pelos agricultores, atingindo mais de 14,5 milhões de hectares na safra 2017 (James, 2017), impulsionado por diversos benefícios com destaque para aqueles relacionados aos ganhos de produtividade. É inegável a eficácia das culturas Bt às principais pragas-alvo das culturas, como por exemplo *S. frugiperda*, no entanto, para que a tecnologia continue exercendo o seu papel é fundamental que sejam preconizadas as estratégias de manejo de resistência.

A evolução de resistência de populações de *S. frugiperda* em milho Bt que expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ab no Brasil, foi resultado da utilização intensiva de cultivos Bt em campo e da falta de adoção de áreas de refúgios.

O sistema brasileiro de cultivo de milho é altamente intensivo, sendo cultivado ao longo de todo o ano agrícola (safra de verão, inverno e/ou sob irrigação), em diversas regiões do país. Além desse cenário, as culturas de soja e algodão que também expressam proteínas inseticidas são amplamente cultivadas, contribuindo para uma maior dificuldade no manejo de *S. frugiperda* nesses sistemas.

A não-conformidade das áreas de refúgio é uma preocupação no Brasil, embora constitua-se como uma premissa básica em cultivos Bt, esta estratégia tem sido pouco utilizada em campo.

O histórico de *S. frugiperda* às diversas táticas de controle disponíveis já é conhecido, desta forma é difícil prever com confiança o sucesso de qualquer tática direcionada para o MRI da praga, devido principalmente às características bioecológicas da praga, principalmente em regiões de clima tropical como no Brasil.

O uso adequado das estratégias de MRI (refúgio/alta dose, eventos piramidados) é primordial para manter a sustentabilidade do milho Bt. Para o médio e longo prazo não se tem novas proteínas inseticidas para aprovação comercial. As aprovações comerciais têm sido baseadas em combinações de eventos já aprovados comercialmente (CTNBio, 2018), o que pode aumentar os riscos, caso não sejam observados os princípios básicos do MRI.

A utilização conjunta das estratégias de MRI e táticas relacionadas ao MIP, como rotação de culturas, controle comportamental visando observar a ocorrência de adultos na área, monitoramento da presença de lagartas, inimigos naturais e quando necessário, a utilização do controle químico, seguindo as recomendações do Comitê de Ação de Resistência a inseticidas no Brasil (IRAC, 2018) são necessários para auxiliar no manejo de *S. frugiperda*.

Referências

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2018) **Plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização**. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>. Acesso em: 06 de jun. de 2018.

IRAC- Insect Resistance Action Committee (2018) Recomendações de manejo da resistência a inseticidas e manejo de pragas para soja, algodão e milho no Brasil. [Online]. Insect **Resistance Action Committee**. Disponível em: http://media.wix.com/ugd/2bed6c_52f993a9b3ed4c548138d3fbf81c283c.pdf. Acesso em 28 de jun. 2018.

James C. (2017) **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017** Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. Ithaca: ISAAAA, 2017. (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA Brief, 53).

APÊNDICES

Apêndice A

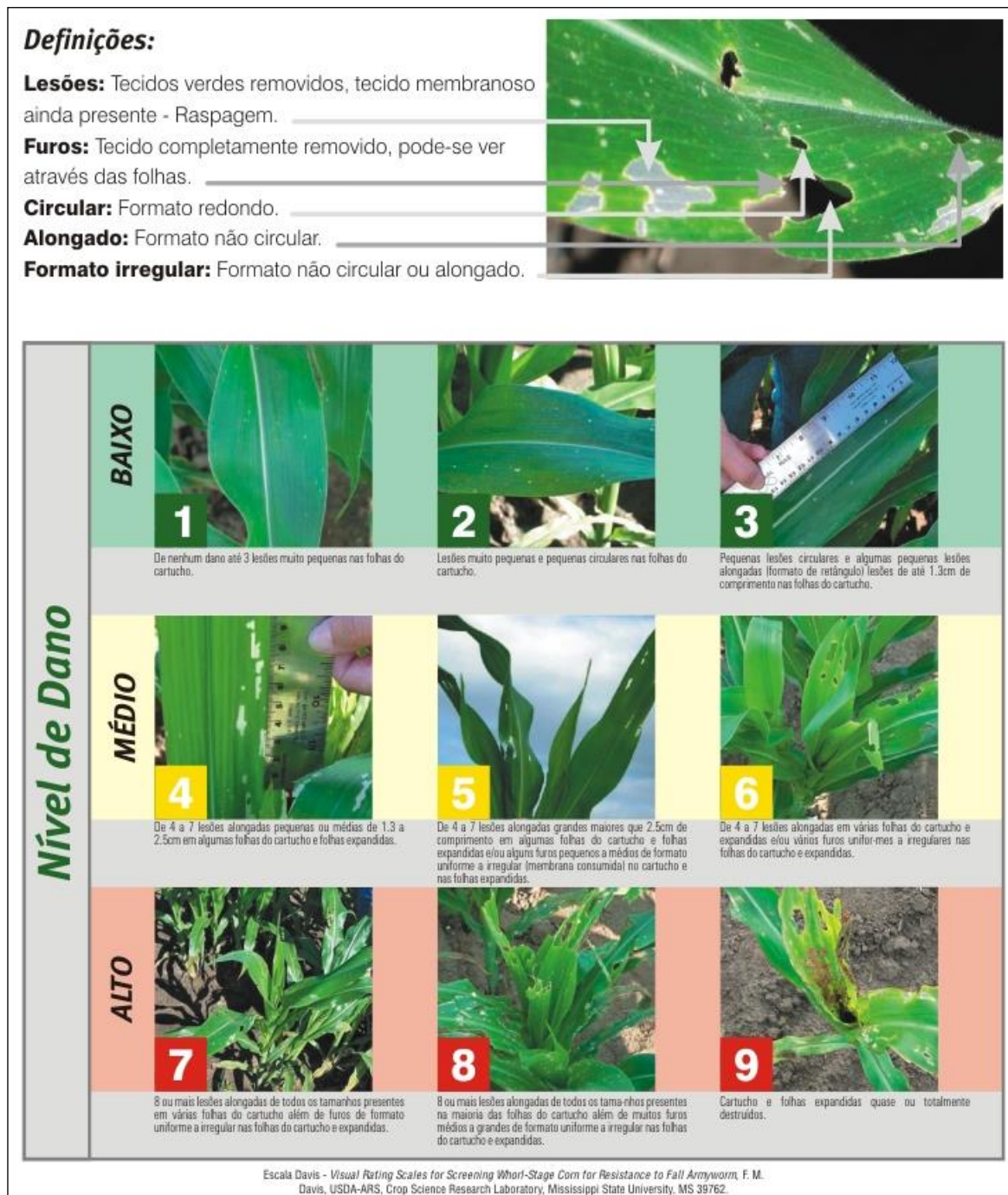


Figura 1A. Escala de avaliação visual de nota de injúrias/danos de *Spodoptera frugiperda*, adaptada de Davis et al. (1992). (Fonte: Dupont do Brasil - Divisão Pioneer Sementes).

Apêndice B

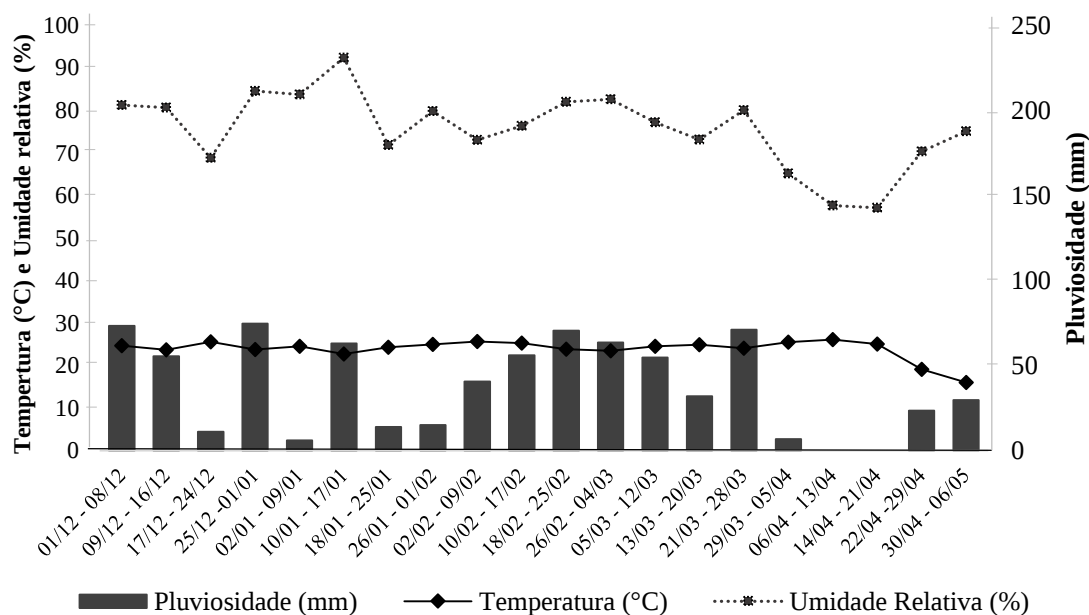


Tabela 1B. Médias de Temperatura (°C), Umidade Relativa (UR%) e Pluviosidade acumulada (mm) a cada sete dias no período de 01 de dezembro de 2015 a 06 de maio de 2016, relativos ao período de desenvolvimento fenológico da cultura do milho na safra de verão (2015/2016) e safra de inverno (2017). (Fonte: Estação Agroclimatológica - Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP).

“Os elementos meteorológicos registrados durante o período de coleta dos dados foram extraídos de um conjunto de dados pertencentes ao acervo da área de Agrometeorologia do Departamento de Ciências Exatas (Unesp – Câmpus de Jaboticabal). As observações realizadas na Estação Agroclimatológica são cotadas, digitadas em formato padronizado, realizada a consistência e controle de qualidade. Em seguida são obtidas as médias diárias, mensais e anuais que são repassadas aos usuários”.

Apêndice C

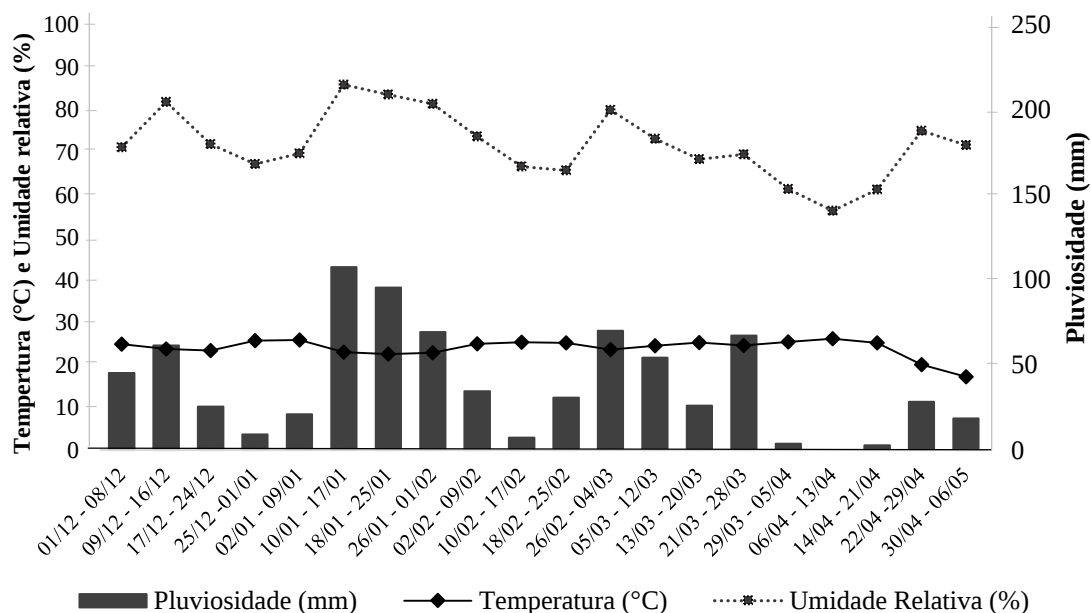


Figura 1C. Médias de Temperatura (°C), Umidade Relativa (UR%) e Pluviosidade acumulada (mm) a cada sete dias no período de 01 de dezembro de 2016 a 06 de maio de 2017, relativos ao período de desenvolvimento fenológico da cultura do milho na safra de verão (2016/2017) e safra de inverno (2017). (Fonte: Estação Agroclimatológica - Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP).

“Os elementos meteorológicos registrados durante o período de coleta dos dados foram extraídos de um conjunto de dados pertencentes ao acervo da área de Agrometeorologia do Departamento de Ciências Exatas (Unesp – Câmpus de Jaboticabal). As observações realizadas na Estação Agroclimatológica são cotadas, digitadas em formato padronizado, realizada a consistência e controle de qualidade. Em seguida são obtidas as médias diárias, mensais e anuais que são repassadas aos usuários”.