

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CUSTO ADAPTATIVO E PERDA DA RESISTÊNCIA DE
Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) RESISTENTE AO MILHO BT**

Cíntia de Melo Gomes

Engenheira Agrônoma

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CUSTO ADAPTATIVO E PERDA DA RESISTÊNCIA DE
Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) RESISTENTE AO MILHO BT**

Discente: Cíntia de Melo Gomes

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Agronomia (Entomologia Agrícola).

G633c Gomes, Cíntia de Melo
Custo adaptativo e perda da resistência de *Spodoptera frugiperda*
(J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes ao milho Bt /
Cíntia de Melo Gomes. -- Jaboticabal, 2020
41 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Guilherme Duarte Rossi

1. Entomologia Agrícola. 2. Milho. 3. Lagarta do cartucho. 4. MRI. 5.
Custo adaptativo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CUSTO ADAPTATIVO E PERDA DA RESISTÊNCIA DE UMA POPULAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTE AO MILHO BT

AUTORA: CÍNTIA DE MELO GOMES

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

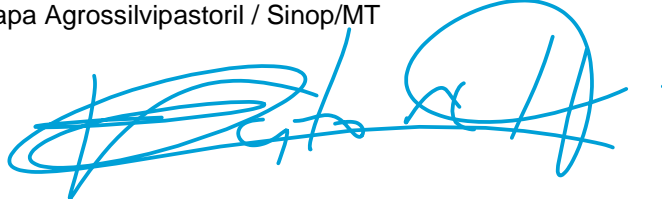
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola (Fitossanidade) / FCAV / UNESP – Jaboticabal



Pesquisador Dr. RAFAEL MAJOR PITTA (Participação Virtual)
Embrapa Agrossilvipastoril / Sinop/MT



Pesquisador Dr. JÚLIO CÉSAR FARETTO (Participação Virtual)
Syngenta Proteção de Cultivos (Latin America Trait Product Manager) / Piracicaba/SP

Jaboticabal, 22 de dezembro de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Cíntia de Melo Gomes – natural de Uberlândia-MG e nascida no dia 22 de dezembro de 1994. Em janeiro de 2011, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Câmpus de Uberlândia. Foi monitora das disciplinas de Entomologia Agrícola e Entomologia Aplicada sob coordenação do Prof. Dr. Marcus Vinícius Sampaio e do Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho, respectivamente. Foi estagiária do Programa de Melhoramento Genético do Algodoeiro (PROMALG-UFU) sob orientação da Prof. Dra. Larissa Barbosa de Sousa e desenvolveu trabalho de iniciação científica na área de Fitopatologia do algodoeiro com bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Participou da criação de conteúdo relacionado à disciplina de Melhoramento de Plantas para o programa PROSSIGA fundado pela UFU com o intuito de diminuir a evasão escolar. Em agosto de 2018, ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) para realização do mestrado sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por me guiar, capacitar e me conceder serenidade para a realização deste trabalho;

Ao Professor Dr. Guilherme Duarte Rossi pela orientação, paciência e por todos os ensinamentos transmitidos;

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) (PPGEA), Unesp/FCAV, pelo aprendizado e convivência;

Ao Professor Dr. Ricardo Antonio Polanczyk e a todos do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, em especial aos meus amigos Joacir do Nascimento, Tamires Doroteo de Souza, Matheus Henrique Tozzi Guarita Borges e Stéfane Carolina Quista da Silva Faria pelo fornecimento, manutenção e criação de uma das populações de lagartas utilizadas nos experimentos e nas avaliações e manutenção da área semeada com milho.

Ao Professor Dr. Odair Fernandes e ao doutorando Gabriel Fernandes Rezende, Laboratório de Ecologia Aplicada pelo fornecimento de insetos da população suscetível utilizada nos experimentos e por sempre me auxiliarem;

Ao Professor Dr. Oderlei Bernardi, Laboratório de Pesquisa em Resistência de Insetos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por me fornecer a população resistente desenvolvida pelo seu grupo de pesquisa e pela disponibilidade oferecida.

Aos amigos de laboratório Juliana Barroso Silva, Diandro Ricardo Barilli, Carolina Veluci Brondi, Ana Letícia Zero dos Santos, Sandy Sousa Fonseca e Leonardo Vinicius Thiesen pelos momentos de descontração, ajuda sempre imediata, convivência e amizade sincera;

Aos amigos do PPGEA, Ávyla Régia de Albuquerque, Joice Mendonça de Souza, Lauany Cavalcante dos Santos, Aimée Regali Seleglim, Caio Truzi, Natalia Vieira, Gilmar Nunes e Daniel Dalvan do Nascimento pela amizade, companhia, conselhos, risadas e apoio;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

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

À minha família e aos meus amigos que sempre me apoiaram, mesmo à distância e que mesmo em circunstâncias adversas, torceram e torcem pelo meu sucesso.

Ao meu pai José Reinaldo Gomes, à minha mãe Arteíza Melo de Matos e à minha irmã Taís de Melo Gomes Teixeira, meu sincero agradecimento pelos imensos esforços por se virarem em dois para fazer com que tudo desse certo. Obrigada pelo amparo, compreensão e amor incondicional.

Ao meu noivo Breno Vinícius Tozzi por todas as horas de ajuda, por vezes até de madrugada no laboratório. Obrigada por ser exatamente assim e me amparar a todo momento.

Sumário

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMO..... | vi |
| ABSTRACT | vii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Danos causados por <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Crambidae) e formas de controle..... | 4 |
| 2.2. Manejo da resistência de insetos a táticas de controle | 6 |
| 2.3. Custos adaptativos associados à resistência de insetos a táticas de controle .. | 8 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1. Insetos | 11 |
| 3.2. Bioensaios | 11 |
| 3.3. Análise do desenvolvimento das lagartas alimentadas com milho Bt e milho não Bt..... | 12 |
| 3.4. Análises Estatísticas | 13 |
| 4. RESULTADOS | 15 |
| 5. DISCUSSÃO | 20 |
| 6. CONCLUSÕES | 22 |
| REFERÊNCIAS..... | 23 |

CUSTO ADAPTATIVO E PERDA DA RESISTÊNCIA DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTENTE AO MILHO BT

RESUMO - A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga chave da cultura do milho. Para o manejo dessa praga, são predominantes as estratégias baseadas no uso de inseticidas químicos e/ou o uso de plantas transgênicas de milho, como o evento “MON89034 x TC1507 x NK603” que expressa as toxinas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F derivadas do microrganismo entomopatogênico *Bacillus thuringiensis* Berliner. Porém, casos de populações de *S. frugiperda* resistentes a ambas estratégias de manejo têm sido descritos. Apesar da seleção de populações de insetos resistentes garantir a sobrevivência dos insetos em ambientes nos quais há pressão de seleção, essa seleção é acompanhada de custos adaptativos. Informações sobre esses custos tem sido cada vez mais necessárias para compreensão do processo de seleção bem como para auxiliar o delineamento de estratégias de manejo da resistência de insetos (MRI). Por exemplo, o conhecimento dos custos adaptativos pode ser útil no MRI por gerar previsões como a quantidade de descendentes, ciclo biológico dos insetos e distância de voo das populações resistentes e suscetíveis ao agente de seleção. Devido ao custo adaptativo, muitas vezes a resistência pode ser perdida durante a evolução de uma população de insetos resistentes na ausência do agente de pressão de seleção. Utilizando plantas de milho Bt e lagartas de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes a essas plantas, objetivou-se com o presente trabalho (i) avaliar o desenvolvimento larval de populações de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes ao milho Bt na presença e ausência do agente de seleção, (ii) avaliar o desenvolvimento larval de uma população de *S. frugiperda* resistente ao milho Bt mantida sem pressão de seleção por aproximadamente 20 gerações. Análises dos resultados de desenvolvimento larval indicaram custos adaptativos associados às lagartas resistentes como aumento da taxa de consumo relativo, menor eficiência de conversão do alimento, maior consumo de alimento e menor ganho de peso em relação à população suscetível. A população resistente mantida sem pressão de seleção mostrou-se suscetível ao milho Bt e com parâmetros de desenvolvimento larval similares aos observados nas lagartas suscetíveis. A resistência observada na população R é, aparentemente, um fator constitutivo (resistência completa), visto que o desenvolvimento da população R na ausência do fator de seleção (milho não Bt) foi semelhante ao observado na presença do fator de seleção.

Palavras-chave: Lagarta do cartucho, manejo da resistência de insetos, culturas Bt, *Bacillus thuringiensis*

FITNESS COSTS AND LOSS OF RESISTANCE OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) RESISTANT TO BT MAIZE

ABSTRACT - The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), is a key pest in maize fields. For the management of this pest, strategies based on the use of chemical insecticides and/or the use of transgenic maize are predominant, such as the event “MON89034 x TC1507 x NK603” that expresses the toxins Cry1A.105, Cry2Ab2 and Cry1F derived from the entomopathogenic microorganism *Bacillus thuringiensis* Berliner. However, cases of *S. frugiperda* populations resistant to both pest management strategies have been described. Although the selection of resistant insect populations ensures the survival of insects in environments where there is selection pressure, the resistance is accompanied by fitness costs. Information on these costs has been highlighted for the comprehension of the selection process and to help the design of strategies for insect resistance management (IRM). For example, knowledge of fitness costs can assist IRM in the prediction of the size of the offspring of the pest, in the definition of periods of pest emergence, as well as in the prediction of pest dispersion in resistant and susceptible populations. Due to fitness costs, resistance can often be lost during the evolution of a population of resistant insects in the absence of selection pressure. Using Bt maize susceptible or Bt maize resistant *S. frugiperda* larvae, our objectives were (i) to evaluate the development of *S. frugiperda* larvae susceptible or resistant to Bt maize in the presence and absence of the selection agent, (ii) to evaluate the larval development of a population of *S. frugiperda* resistant to Bt maize that was maintained without selection pressure for approximately 20 generations. Analysis of larval development indicated fitness costs for resistant larvae, given by an increase in the relative consumption rate, less efficiency of food conversion, greater food consumption and less weight gain when compared with the susceptible population. The resistant population maintained without selection pressure was susceptible to Bt maize and results for larval development in this population were similar to those observed in susceptible larvae. The resistance to Bt maize is apparently a constitutive factor (complete resistance), since the development of R populations in the absence of the selection factor (fed with non-Bt maize) was similar to that observed in the presence of the selection factor.

Keywords: fall armyworm, insect resistance management, Bt crops, *Bacillus thuringiensis*

1. INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma espécie polífaga que utiliza plantas hospedeiras de diferentes famílias como fonte de alimento (Montezano et al., 2018). Na agricultura, *S. frugiperda* é considerada a principal praga da cultura milho e também tem sido responsável por elevadas perdas econômicas em cultivos de soja e algodão (Blanco et al., 2016; Faretto et al., 2017).

Para utilização de diferentes hospedeiros como fonte de alimento, lagartas de *S. frugiperda* possuem uma ampla versatilidade fenotípica. Conseqüentemente, lagartas de *S. frugiperda* podem utilizar fontes de alimento que contém inibidores de proteases (Paulillo et al., 2000; Oliveira et al., 2013) ou outros compostos secundários (Simon e Ing, 1984; Gouin et al., 2017) que muitas vezes impedem o desenvolvimento de outras espécies de lepidópteros não especializados. Além disso, populações com características próprias como as raças Arroz e Milho de *S. frugiperda* podem ser selecionadas em função do alimento utilizado (Gouin et al., 2017; Silva-Brandão et al., 2017).

Na cultura do milho, lagartas de *S. frugiperda* causam prejuízos significativos em função do corte de plantas jovens e consumo das folhas, cartucho e espiga (Faretto et al., 2017; Huang, 2020; Cruz, 2004). Além da definição de populações em função do alimento, o manejo de altas infestações de *S. frugiperda* em campo por meio de aplicações frequentes de inseticidas químicos também atua de forma a selecionar indivíduos para formação de populações resistentes (Carvalho et al., 2013; Nascimento et al., 2015; Okuma et al., 2018).

Após a liberação comercial do milho transgênico com atividade inseticida sobre *S. frugiperda* em 2007 (CTNBIO, 2020), a adoção dessa tática de manejo nos dias atuais é de aproximadamente 93% (ISAAA, 2018). As plantas transgênicas com atividade inseticida comercialmente disponíveis no Brasil são geneticamente modificadas para produzirem proteínas inseticidas Cry e Vip derivadas do microrganismo entomopatogênico *Bacillus thuringiensis* Berliner (CTNBIO, 2020) e são comumente conhecidas como plantas Bt.

Após serem ingeridas, as proteínas Cry e Vip expressas nas plantas Bt interagem com o sistema digestivo de insetos suscetíveis. De maneira simplificada, uma ativação das proteínas Cry expressas nas plantas Bt ocorre por meio de proteases digestivas no lúmen do trato digestivo. Em seguida, a toxina ativada atravessa a membrana peritrófica dos insetos e interage com proteínas específicas presentes na membrana das células do epitélio do intestino médio (aminopeptidases, fosfatases alcalinas, caderinas e proteínas transportadoras do tipo ABC) (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017).

Visto que as plantas Bt expressam continuamente as proteínas inseticidas, a contínua exposição dos insetos alvos ao agente de controle tem resultado na seleção de indivíduos de *S. frugiperda* resistentes a determinados eventos de milho Bt (Storer et al., 2012; Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016; Huang, 2020).

Muitas vezes, o custo adaptativo associado com o fenótipo de resistência em insetos pode ser um entrave para o estabelecimento de populações resistentes. A intensidade desse custo é dada pela composição genética do organismo sob pressão bem como pelo ambiente e pode definir a sobrevivência e estabelecimento de populações de insetos resistentes (Carrière e Tabashnik, 2001; Carrière et al., 2010). Desse modo, a evolução da resistência pode ser influenciada pela intensidade dos custos adaptativos associados às populações de insetos pragas (Tabashnik et al., 2005).

No caso de populações de *S. frugiperda* resistentes ao milho Bt, o custo adaptativo observado nas populações resistentes tem sido ausente ou não limitante para o estabelecimento da população resistente (Jakka et al., 2014; Bernardi et al 2015; Santos-Amaya et al., 2016a; Sousa et al., 2016). Essa condição tem favorecido o estabelecimento de populações de *S. frugiperda* resistentes a toxinas Bt em campo (Storer et al., 2012; Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016; Huang 2020).

Para o manejo da resistência de insetos (MRI) a táticas de controle, diversas estratégias podem ser tomadas. Por exemplo, a retirada de um fator de pressão de seleção seguida da utilização de outro princípio ativo é uma forma de manejar os níveis populacionais de um inseto praga evitando o desenvolvimento de populações de insetos resistentes. No caso de plantas transgênicas, a retirada do fator de pressão de seleção não é possível, visto que as proteínas inseticidas das plantas comerciais

atualmente disponíveis são expressas constitutivamente e a escolha do princípio ativo ocorre na compra da semente.

No presente estudo, foi investigado se uma população de *S. frugiperda* resistente ao milho Bt (MON89034 x TC1507 x NK603) apresentava custo adaptativo durante a fase larval em relação a uma população suscetível. Também foi investigado se as características de resistência seriam conservadas na população resistente mantida sem o fator de seleção por aproximadamente 20 gerações. Finalmente, foi investigado se os custos adaptativos eram mantidos quando as lagartas resistentes foram alimentadas com milho não Bt. Os resultados obtidos foram discutidos considerando o modo de ação das proteínas Cry e as ações para manejo da resistência de insetos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lagarta do cartucho do milho: prejuízos e formas de controle

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é um dos principais insetos pragas de diversas culturas agrícolas no Brasil, principalmente no milho (*Zea mays*) e algodão (*Gossypium hirtusum*) (Barros, 2010). Na cultura do milho, é considerada o inseto praga mais importante no Brasil e é responsável por uma redução média de 36% do estande e até 52% de redução de produtividade (Carvalho, 1970; Silva et al., 2012; Valicente, 2015).

Características biológicas como a polifagia, a elevada capacidade reprodutiva, a facilidade de dispersão dos adultos, bem como o elevado número de gerações por ano garantem o sucesso da lagarta do cartucho em alcançar altas taxas de infestação nas culturas nas quais é capaz de se desenvolver (Horikoshi et al., 2016).

Durante os primeiros ínstaes, as lagartas se alimentam por raspagem das folhas de forma que o limbo foliar não é rompido. À medida que se desenvolvem, adentram no cartucho da planta de milho e se alimentam dessa região da planta. Com a alimentação da lagarta do cartucho, são observadas folhas raspadas e perfuradas com conseqüente redução da área foliar das plantas bem como cartucho e espigas danificadas (Valicente, 2015; Vassalo, 2019).

A importância da lagarta do cartucho se deve não só à intensidade das injúrias provocadas nas plantas e aos danos provocados à produtividade, mas também à dificuldade para o manejo da praga (Santos et al., 2004). Historicamente, o método mais difundido de controle de *S. frugiperda* é a utilização de inseticidas químicos, que passaram a ser fundamentais para o sucesso da cultura do milho (Carvalho et al., 2013). Devido às altas infestações de *S. frugiperda* e os danos relacionados ao seu ataque, produtores de milho podem recorrer a aplicações de inseticidas químicos nas lavouras (Carvalho et al., 2013).

Apesar de um relativo sucesso para o controle de insetos, a aplicação de inseticidas químicos gera efeitos colaterais indesejados como a contaminação do homem e do meio ambiente bem como a seleção de insetos resistentes a moléculas inseticidas (Carvalho, 2017). A utilização inadequada e mal planejada de inseticidas químicos na cultura do milho, tem contribuído para o desenvolvimento de populações

de *S. frugiperda* resistentes a moléculas amplamente utilizadas, como organofosforados, carbamatos, piretroides, benzoilureias e diamidas (Carvalho et al., 2013; Boaventura et al., 2019; Wang et al., 2019).

Como alternativa ao uso de inseticidas químicos, híbridos comerciais de milho transgênico com resistência a *S. frugiperda* e outros lepidópteros pragas estão disponíveis no mercado desde 2008. Esses híbridos comerciais têm sido desenvolvidos para expressão isolada ou combinada de diferentes toxinas (proteínas Cry, do inglês *crystal*, e Vip, do inglês *vegetative insecticidal protein*) derivadas de *Bacillus thuringiensis* Berliner e são conhecidos como plantas Bt.

Os materiais de milho transgênico com atividade inseticida (milho Bt) apresentam nos dias atuais espectro limitado para o controle de lepidópteros imaturos como a lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, a lagarta da espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae), e a broca do colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), e também para o coleóptero *Diabrotica speciosa* Germar, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae), popularmente conhecido como larva alfinete ou besouro brasileirinho.

Atualmente, observam-se aprovados para comercialização no Brasil eventos de milho Bt que expressam até 4 proteínas inseticidas ativas sobre lepidópteros imaturos (Tecnologia PowerCore Ultra - Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa20) e o evento "MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87411" que, além da expressão de 3 proteínas tóxicas para o controle de lepidópteros (Cry1A.105, Cry2Ab2 e Vip3Aa20), expressa 1 proteína tóxica (Cry3Bb1) e 1 tipo de dsRNA (dvsnf7) para controle de coleópteros (CIB, 2019).

Apesar do desenvolvimento das plantas Bt, sabe-se que a seleção de lagartas de *S. frugiperda* resistentes a proteínas inseticidas é uma realidade. O desenvolvimento de populações de insetos resistentes é dado pela forte pressão de seleção exercida pela expressão contínua dessas toxinas nas plantas Bt (Gould, 1998). No Brasil, o sistema de cultivo realizado em algumas regiões do país também agrava o quadro de pressão de seleção, como é o caso de regiões nas quais ocorre a "ponte verde".

Ponte verde é a sucessão de culturas como soja, milho ou algodão, todas hospedeiras de *S. frugiperda*, em uma mesma área ao longo dos anos agrícolas

(Fatoretto et al., 2017). Nesse cenário, ocorre a manutenção de lagartas de *S. frugiperda* alimentando-se ativamente em campo de culturas Bt que muitas vezes compartilham as mesmas proteínas inseticidas. A evolução da resistência é um dos principais fatores limitantes para a continuidade do uso das plantas Bt, embora seja um fator que pode ser minimizado com aplicação de táticas para o Manejo da Resistência de Insetos (MRI) (Farias et al., 2016).

2.2. Manejo da resistência de insetos a táticas de controle

O principal desafio para a durabilidade e sustentabilidade das plantas Bt tem sido a evolução da resistência em populações de insetos pragas. A resistência é uma tendência natural dos processos evolutivos (Bernardi et al., 2016). Após uma contínua pressão de seleção realizada por plantas Bt, indivíduos de composição genética e, conseqüentemente, fenotípica adequadas conferidas por fatores genéticos podem vir a sobreviver. Ao longo dos anos e das gerações desses indivíduos favorecidos, esses podem constituir uma numerosa população resistente às plantas Bt (Bernardi et al., 2016).

Desse modo, a resistência de insetos a plantas Bt pode ser definida como a capacidade de uma praga a sobreviver e produzir descendentes viáveis ao se alimentar somente de plantas Bt (Andow e Alstad, 2008). A falta de adoção de táticas de MRI é um dos principais riscos ambientais associados à utilização contínua de plantas Bt (Storer et al., 2012). O MRI traz um conjunto de procedimentos efetivos e completos aplicados em campo no intuito de prevenir, retardar, detectar e minimizar o número de casos ou evolução da resistência de insetos às toxinas presentes nas plantas Bt empregadas para seu controle (Roush, 1997; Machado e Fiuzza, 2011).

Em síntese, o objetivo principal das estratégias de MRI é prevenir ou atrasar as “falhas” que ocorrem em campo (Andow e Alstad, 2008). A estratégia mais recomendada e eficiente para retardar a seleção de insetos resistentes nas culturas transgênicas capazes de produzir proteínas Bt é a utilização de expressão de alta dose de proteínas inseticidas isoladas ou piramidadas aliada a utilização de áreas de refúgio. A alta dose em plantas Bt resulta no controle de organismos heterozigotos e as áreas de refúgio são áreas cultivadas com material não Bt a fim de permitir o acasalamento entre indivíduos resistentes provenientes das culturas Bt com

indivíduos suscetíveis das áreas de refúgio para obtenção de indivíduos heterozigotos suscetíveis ou parcialmente suscetíveis às plantas que expressam alta dose (Carrière et al., 2010; Farias et al., 2016).

A utilização de plantas que expressam alta dose associada a implementação de áreas de refúgio tem sido considerada uma estratégia eficiente para retardar a evolução da resistência da praga alvo (Bernardi et al., 2011). No entanto, uma proteína pode ter atividade de alta dose para um determinado inseto praga e atividade moderada para outro. Este fato não desqualifica o MRI da praga, uma vez que a ação da toxina pode auxiliar na ação de outros fatores, como a predação natural e fatores ambientais (Martinelli e Omoto, 2005).

A não implantação da estratégia de alta dose/refúgio pode implicar na evolução da resistência em populações de insetos pragas em cultivos Bt (Huang et al., 2011), sendo a falta de adoção do refúgio um dos principais fatores (Kruger et al., 2012). Para ser efetivo, o refúgio precisa ter a área e localização adequadas para fornecer indivíduos suscetíveis para o acasalamento com os insetos resistentes advindos da cultura Bt (Farias et al., 2016). No entanto, apenas 8% dos produtores de milho de sete estados avaliados no Brasil adotam áreas de refúgio adequadamente (Machado e Fiuzza, 2016), o que justifica a ocorrência cada vez mais frequente de relatos de populações de *S. frugiperda* resistentes às toxinas Cry no País.

A piramidação de genes pode ser também considerada uma estratégia eficiente quando utilizada em conjunto com alta dose/refúgio. Devido ao fato da planta expressar duas ou mais proteínas inseticidas, o potencial de controle das plantas piramidadas é aumentado em relação aos materiais que expressam uma única proteína (Carrière et al., 2015). Casos de resistência de *S. frugiperda* no Brasil a materiais transgênicos não piramidados contendo Cry1F (Farias et al., 2014) e Cry1Ab (Omoto et al., 2016) foram diagnosticados após apenas três anos de utilização da tecnologia em campo (Fatoreto et al., 2017).

O diferencial da piramidação de genes está na evolução mais lenta da resistência em relação às plantas que expressam uma única proteína, uma vez que os insetos resistentes à uma determinada toxina podem ser controlados pela ação de outra presente no mesmo material (Huang, 2011). No entanto, tal estratégia pode ser considerada eficiente quando as proteínas expressas pela planta apresentarem

modos de ação distintos, ou seja, se os sítios de ligação das toxinas não forem os mesmos e se o inseto praga não apresentar resistência cruzada às proteínas pirimidadas (Tabashnik et al., 2009).

Para que as estratégias de refúgio e alta dose tenham sucesso no MRI, alguns requisitos são desejáveis: *i*) herança recessiva e monogênica; *ii*) baixa frequência inicial de alelos de resistência (Bernardi et al., 2015); *iii*) presença de refúgio com plantas não Bt em área suficiente e adjacentes à cultura Bt de forma a existir indivíduos suscetíveis em abundância para acasalamento aleatório (Gould, 1998); *iv*) presença de custos adaptativos associados à resistência dos insetos.

2.3. Custos adaptativos associados à resistência de insetos a táticas de controle

A adoção de plantas Bt vem aumentando cada vez mais (ISAAA, 2018). Tal estratégia de manejo de pragas apresenta controle eficiente de populações de insetos pragas com nenhum ou quase nenhum dano aos seres humanos e insetos não alvo e implica na redução na aplicação de inseticidas convencionais com consequentes benefícios econômicos (Acharya et al., 2017). No entanto, esses benefícios podem ser suprimidos à medida que populações de insetos pragas resistentes às plantas Bt são selecionadas (Gassman et al., 2009).

Devido à forte pressão de seleção imposta pela utilização desmedida das culturas Bt, a evolução da resistência passa a ser um dos maiores desafios para o manejo integrado de insetos pragas (Tabashnik et al., 2013). Nos últimos anos, a resistência de insetos às plantas Bt foi reportada em diversas espécies para toxinas Bt recomendadas para o manejo de lepidópteros pragas (Acharya et al., 2017) principalmente em populações de *S. frugiperda* (Storer et al., 2010; Farias et al., 2014; Bernardi et al., 2015). Os fatores que podem influenciar essa resistência incluem a herança da resistência, a frequência inicial dos alelos de resistência, comportamento, interações multitróficas, estratégias de manejo de pragas, dinâmica das populações e custos adaptativos reduzidos (Carrière et al., 2004; Gould, 1998; Onstad, 2008; Tabashnik et al., 2008).

Custo adaptativo pode ser definido como uma penalidade ecológica ou biológica que os organismos portadores de alelos de resistência carregam. A intensidade do custo adaptativo é influenciada pelas características genéticas do

inseto e o efeito ambiental sobre o mesmo (Carrière et al., 2010). Considerando a adoção das estratégias de alta dose/refúgio, o custo tem maior impacto sobre os indivíduos resistentes (rr), sendo os resistentes menos aptos ao ambiente na ausência da pressão de seleção em relação aos indivíduos suscetíveis (ss) (Fatoretto, 2017).

Como o intuito do refúgio é fornecer indivíduos suscetíveis para o acasalamento com os indivíduos resistentes, qualquer sobrevivência de homocigotos dominantes pode aumentar consideravelmente o risco de evolução da resistência (Carrière e Tabashnik, 2001). Portanto, a durabilidade da tecnologia Bt pode ser maior quando a característica de resistência estiver associada a um alto custo energético, ser recessiva e haver refúgio em abundância disponível em campo, mesmo que a frequência inicial dos alelos de resistência seja alta (Carrière e Tabashnik, 2001).

No caso de frequência inicial baixa dos alelos resistentes (r) e indivíduos heterocigotos (rs) a evolução da resistência é governada pela diferença de custos adaptativos entre os indivíduos suscetíveis (ss) e heterocigotos (rs) quando alimentados em áreas de refúgio, ou seja, sem pressão de seleção (Fatoretto, 2017). Para populações de *S. frugiperda* resistentes a algumas proteínas Cry, estudos mostram que o custo adaptativo para conferir a resistência é reduzido ou nulo, quando lagartas resistentes são alimentadas de milho não Bt ou de outras plantas hospedeiras (Jakka et al., 2014; Santos-Amaya et al., 2016b), limitando assim a efetividade do refúgio para o manejo de resistência de insetos pragas (Fatoretto, 2017).

A existência de custos adaptativos é normalmente avaliada pela comparação entre características de desenvolvimento, como sobrevivência, duração de estágios larvais ou adulto, peso de larvas e parâmetros de fertilidade entre as populações resistentes e suscetíveis. Além dos parâmetros biológicos, o custo pode também ser avaliado pelo monitoramento da estabilidade da resistência na ausência de pressão de seleção (Jakka et al., 2014). De acordo com Gassman (2009), em 77 estudos, envolvendo 18 espécies de insetos, 62% detectaram custos adaptativos associados ao desenvolvimento, 15,5% na sobrevivência, 7,4% em tempo de desenvolvimento e 2,5% no peso dos insetos.

Embora a maioria dos custos fossem associados ao caráter recessivo da resistência, o caráter não recessivo pode selecionar ainda mais indivíduos resistentes. No entanto, apesar de muitos dados referentes aos custos associados à resistência de insetos

pragas às proteínas Cry individualmente, ainda faltam pesquisas a respeito do custo adaptativo associado à evolução da resistência às proteínas piramidadas nas culturas em campo (Jakka et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos

Foram utilizadas 3 populações de *S. frugiperda* com diferentes interações com plantas de milho Bt (30A37PW; MON89034 x TC1507 x NK603; com expressão das proteínas inseticidas Cry1A.105, Cry1F e Cry2Ab2). A população suscetível (S) foi obtida no Laboratório de Ecologia Aplicada (ApEcoLab) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal-SP de responsabilidade do Professor Doutor Odair A. Fernandes. A população S é proveniente de uma criação mantida em laboratório sem exposição a inseticidas ou plantas transgênicas por, pelo menos, 15 anos.

A população resistente (R) foi obtida no Grupo de Pesquisa em Resistência de Insetos (G-PRI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob responsabilidade do Professor Doutor Oderlei Bernardi e corresponde à linhagem P.R., geração F29, resistente ao milho Bt. Esta população foi mantida sob pressão de seleção utilizando milho Bt (PowerCore) como recurso alimentar a cada, pelo menos, duas gerações desde a F1. A população R utilizada no presente experimento (F30) veio de uma criação em que a pressão de seleção vinha sendo aplicada nas últimas sete gerações consecutivas (F22-F29).

A população resistente sem exposição a pressão de seleção (R^{PS}) foi derivada da população R e foi mantida sem pressão de seleção por aproximadamente 20 gerações. Essa população foi verificada como suscetível ao milho Bt pois a mortalidade observada foi superior a 85% quando as lagartas foram alimentadas com folhas do milho Bt.

3.2. Bioensaios

As sementes de milho Bt e de um híbrido não Bt (isolinha 30A37RR) foram cedidas pela Corteva Agriscience. Foram semeadas 3 linhas de 15 m com 6 plantas/m espaçadas 90 cm entre si em campo experimental. Duas linhas sem semeadura foram deixadas entre o milho Bt e não Bt, a fim de reduzir a dispersão de lagartas de instares mais avançados, advindas de milho convencional, para se alimentarem de milho Bt.

Folhas +3 de milho em estágio V7-V9 foram utilizadas para alimentação das lagartas. Para isso, as folhas de milho foram destacadas das plantas e levadas para laboratório.

No laboratório, as folhas foram limpas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,075%) por 30 seg seguida de três lavagens em água deionizada. As folhas foram enxugadas superficialmente, cortadas em discos (2 cm de diâmetro) e colocadas em placas de cultivo de células (12 poços de 2 cm de diâmetro x 2 cm de altura) que continham 1 mL de ágar-água 1% solidificado na base e um disco de papel entre a folha e o ágar. Três lagartas de *S. frugiperda* em primeiro ínstar foram colocadas em cada poço. As folhas foram trocadas diariamente de forma a não faltar alimento às lagartas.

Após sete (7) dias do início da alimentação, as lagartas apresentaram peso suficiente para pesagens individuais em balança analítica. As lagartas foram transferidas individualmente para recipientes plásticos (7 cm de diâmetro x 3 cm de altura) previamente esterilizados por imersão em solução de hipoclorito de sódio 1%, secos e mantidos em câmara de fluxo com luz ultravioleta durante 2 horas. Em seguida, 15 mL de solução de ágar-água 1% foram transferidos os recipientes plásticos. Após solidificação, o ágar foi coberto com discos de papel filtro cortados no mesmo diâmetro dos recipientes plásticos e discos foliares (3,5 cm de diâmetro) de milho Bt ou não Bt foram colocados sobre o disco de papel.

3.3. Análise do desenvolvimento das lagartas alimentadas com milho Bt e milho não Bt

As análises do desenvolvimento das lagartas suscetíveis (S e R^{PS}) foram realizadas unicamente em milho não Bt, uma vez que foram observadas mortalidades de 100% e 85% dos indivíduos das populações S e R^{PS}, respectivamente, ao se alimentarem do milho Bt. O desenvolvimento da população resistente R foi avaliado tanto em milho não Bt como em milho Bt.

A partir dos sete (7) dias após início da alimentação, as avaliações diárias de peso de alimento fornecido e alimento consumido bem como o peso das lagartas foram iniciadas. A perda de umidade das folhas foi quantificada pela manutenção da mesma quantidade de folhas fornecidas às lagartas nas mesmas condições dos

tratamentos, porém sem as lagartas (Parra, 1991). Foram instalados cinco (5) grupos de 10 lagartas para as populações S e R-^{PS} e seis (6) grupos de 12 lagartas individualizadas da população R. As observações foram realizadas para obtenção dos seguintes parâmetros:

- T: Duração do período de alimentação (dias);
- AF: Peso do alimento fornecido ao inseto (g);
- AR: Peso da sobra do alimento fornecido ao inseto (g);
- B: Ganho de peso pelas lagartas (g);
- PM: Peso médio das lagartas (g);
- I: Peso do alimento ingerido (g);

Os parâmetros indicados acima foram utilizados para determinação dos seguintes índices nutricionais (Waldbauer, 1968; Scriber e Slansky Jr., 1981) das populações de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes alimentadas com milho não Bt ou milho Bt:

Taxa de consumo relativo (g/g/dia): $RCR = I / (PM \times T)$;

Eficiência de conversão do alimento ingerido (%): $ECI = B / I \times 100$;

3.4. Análises Estatísticas

As médias de peso larval máximo (mg), peso médio durante o desenvolvimento larval (mg), ganho de peso (mg), consumo de alimento (mg), taxa de consumo relativa (RCR, mg/mg/dia), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI, %) e período larval (dias) foram calculadas considerando uma lagarta como repetição. As médias de mortalidade foram calculadas sobre os grupos pré-determinados de 10-12 lagartas por repetição.

A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Cramer-von Mises ($p < 0,05$) e a homocedasticidade dos dados pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$) (ganho máximo de peso, mortalidade larval, período larval e peso de pupas) ou BoxCox ($p < 0,05$) (consumo, ECI e RCR). Para ajuste à homocedasticidade e normalidade, os

dados de consumo, ECI e RCR foram transformados, respectivamente, por $y^{-0,19}$, $y^{0,3}$ e $y^{-0,15}$. Após verificação e adequação aos requisitos, os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) e, em caso de significância ($p < 0,05$), foram realizados testes de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias obtidas de cada parâmetro dos diferentes tratamentos. Os dados originais foram apresentados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R (R Core Team, 2019).

Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada considerando as variáveis ECI, RCR, consumo de alimento, período larval, peso larval máximo e peso de pupas na plataforma MetaboAnalyst 4.0 (Chong et al., 2019). Os dados para PCA foram submetidos a normalização pela mediana, transformação por $\log x$ e "Pareto Scaling".

4. RESULTADOS

O ganho máximo de peso larval (diferença entre peso máximo e peso inicial) das diferentes populações de *S. frugiperda* alimentadas com milho Bt ou milho não Bt foi diferente nas condições avaliadas (ANOVA, $F_{3,188}=15,18$; $p<0,001$). As populações suscetíveis ao milho Bt (S e R^{-PS}) alimentadas com milho não Bt apresentaram ganho máximo de peso larval superior à população resistente (R) alimentada com milho Bt. Quando a população R foi alimentada com milho não Bt, o ganho máximo de peso larval foi similar ao observado na população R^{-PS} (Figura 1).

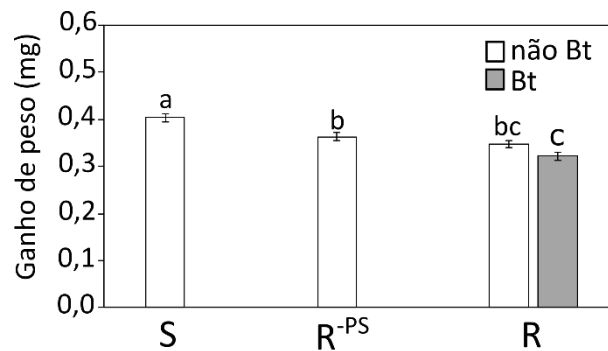


Figura 1. Ganho máximo de peso larval (mg) em populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis ou resistentes a plantas de milho Bt alimentadas com folhas de milho não Bt e milho Bt. S: população suscetível ao milho Bt. R: população resistente ao milho Bt. R^{-PS}: população derivada da R mantida sem pressão de seleção. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p<0,05$).

O consumo de alimento entre as populações foi diferente (ANOVA, $F_{3,188}=61,84$; $p<0,001$). A população R apresentou um consumo de alimento maior ao se alimentar tanto de milho não Bt como de milho Bt em relação ao consumo observado nas populações S e R^{-PS} (Figura 2)

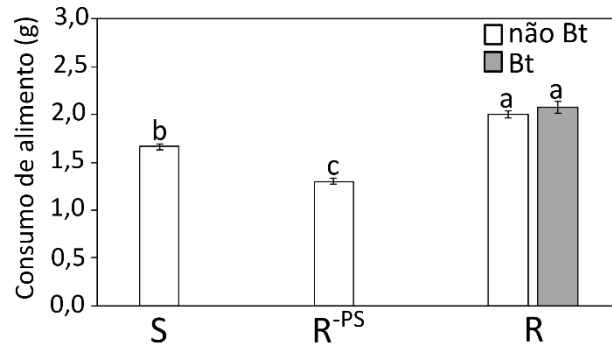


Figura 2. Consumo de alimento (g) em populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis ou resistentes a plantas de milho Bt alimentadas com folhas de milho não Bt e milho Bt. S: população suscetível ao milho Bt. R: população resistente ao milho Bt. R^{-PS}: população derivada da R mantida sem pressão de seleção. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

A taxa de consumo relativo (RCR) diferiu entre as populações (ANOVA, $F_{3,186}=307,38$, $p < 0,001$). A população R alimentada com milho Bt apresentou a maior RCR, seguida da população R alimentada com milho não Bt, população S e população R^{-PS}.

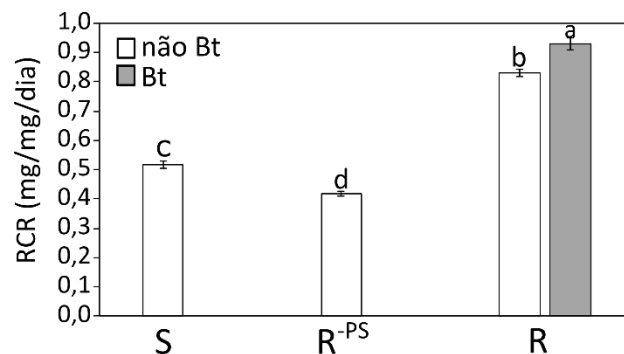


Figura 3. Taxa de consumo relativo (RCR) (mg/mg/dia) em populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis ou resistentes a plantas de milho Bt alimentadas com folhas de milho não Bt e milho Bt. S: população suscetível ao milho Bt. R: população resistente ao milho Bt. R^{-PS}: população derivada da R mantida sem pressão de seleção. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

A eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) diferiu entre as populações (ANOVA, $F_{3,188}=155,9$, $p < 0,001$). A menor ECI foi observada para população R

alimentada com milho Bt, seguida da população R alimentada com milho não Bt, população R^{-PS} e população S.

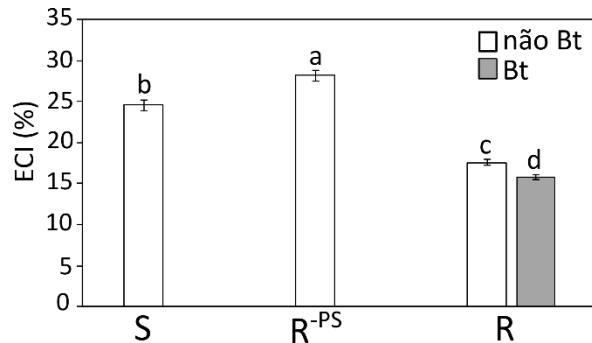


Figura 4. Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) (%) em populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis ou resistentes a plantas de milho Bt alimentadas com folhas de milho não Bt e milho Bt. S: população suscetível ao milho Bt. R: população resistente ao milho Bt. R^{-PS}: população derivada da R mantida sem pressão de seleção. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

O período larval diferiu entre as populações (ANOVA, $F_{3,190}=55,96$, $p < 0,001$). O menor período larval foi observado para população R alimentada com milho Bt, período intermediário para a população R alimentada com milho não Bt e população R^{-PS} e período larval mais longo para a população S.

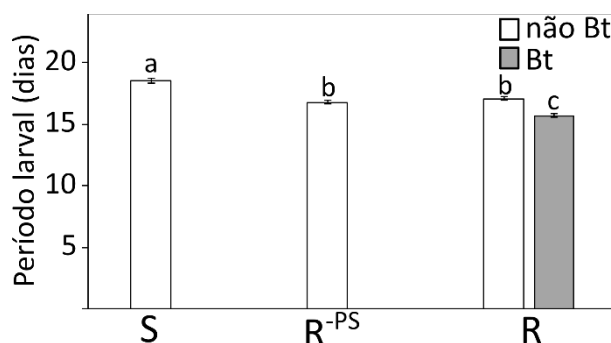


Figura 5. Período larval (dias) de populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis ou resistentes a plantas de milho Bt alimentadas com folhas de milho não Bt e milho Bt. S: população suscetível ao milho Bt. R: população resistente ao milho Bt. R^{-PS}: população derivada da R mantida sem pressão de seleção. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

A mortalidade larval não diferiu entre as populações (ANOVA, $F_{3,18}=1,89$, $p=0,168$).

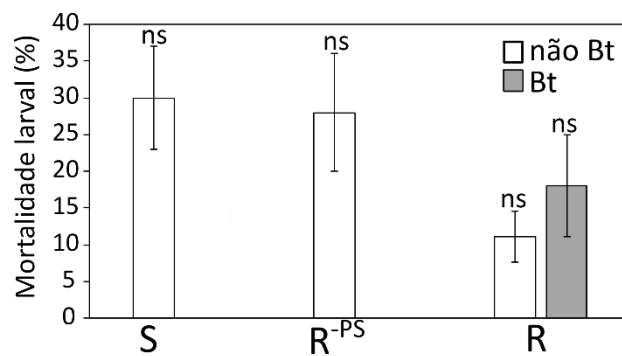


Figura 6. Mortalidade larval (%) de populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis ou resistentes a plantas de milho Bt alimentadas com folhas de milho não Bt e milho Bt. S: população suscetível ao milho Bt. R: população resistente ao milho Bt. R^{-PS}: população derivada da R mantida sem pressão de seleção. ns = sem diferença significativa entre as médias de acordo com ANOVA ($p > 0,05$).

O peso de pupas diferiu entre as populações (ANOVA, $F_{3,191}=58,59$, $p < 0,001$). A população R alimentada com milho Bt ou milho não Bt apresentou o menor peso pupal, seguida da população R^{-PS} e, finalmente, da população S que apresentou o maior peso de pupas (Figura 7).

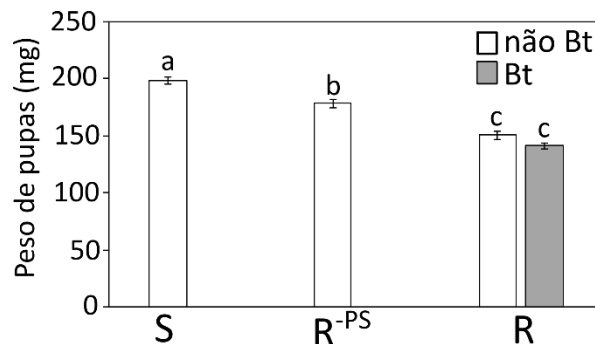


Figura 7. Peso de pupas (mg) de populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis ou resistentes a plantas de milho Bt alimentadas com folhas de milho não Bt e milho Bt. S: população suscetível ao milho Bt. R: população resistente ao milho Bt. R^{-PS}: população derivada da R mantida sem pressão de seleção. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

O componente principal 1 (PC1, 85,3%) da análise de PCA indicou a diferenciação da população R alimentada com milho Bt e milho não Bt das demais populações S e R^{-PS}. Esse agrupamento indica a distinção entre as populações S e R-

R^{PS} da população R ao serem considerados atributos do desenvolvimento larval das populações de *S. frugiperda* (Figura 8).

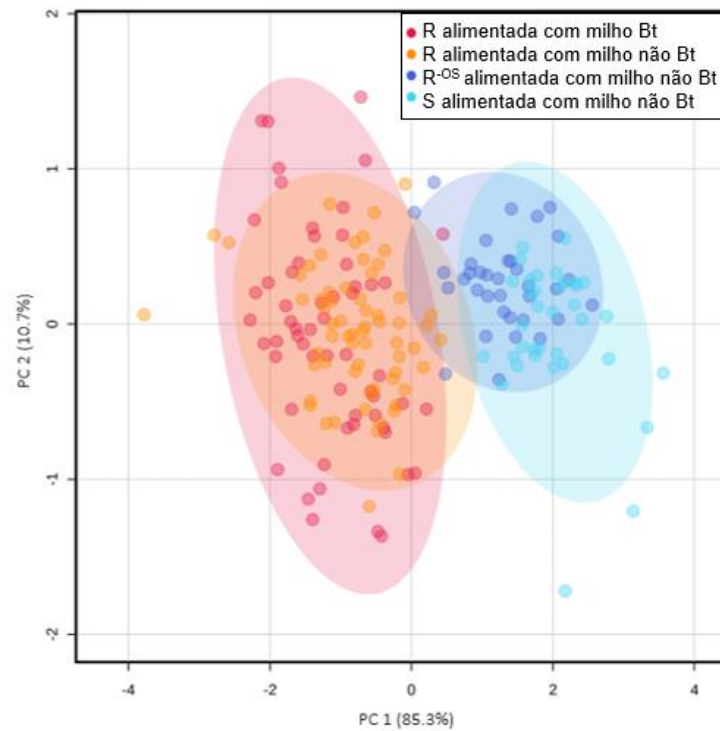


Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) considerando atributos do desenvolvimento larval de duas populações de *Spodoptera frugiperda* suscetíveis (S e R^{PS}) ao milho Bt alimentadas com milho não Bt e de uma população resistente (R) ao milho Bt alimentada com milho Bt ou milho não Bt.

5. DISCUSSÃO

A evolução da resistência em populações de insetos pode ser influenciada pela presença ou ausência de custos adaptativos (Tabashnik, 2005). No presente trabalho, foi observado que a população R demonstrou custos adaptativos representados por maior consumo de alimento e menor eficiência de conversão do alimento ingerido em relação às populações suscetíveis. Tais alterações sugerem que a fisiologia digestiva da população R difere em relação à observada nas populações S.

Considerando que o modo de ação das toxinas Cry presentes no milho Bt é associado ao epitélio do intestino médio (Soberón et al., 2009), alterações no intestino médio têm sido associadas à resistência. Essas alterações possibilitam o consumo de plantas que contenham toxinas Cry pela população R. Por outro lado, tais alterações podem alterar o funcionamento do sistema digestivo e resultarem em redução da eficiência da conversão do alimento em nutrientes.

Apesar da ausência do envolvimento das caderinas (proteínas com função de junção celular no epitélio do intestino médio que são utilizadas como receptores para algumas proteínas Cry) na toxicidade ter sido indicado para as proteínas Cry1F e Cry1Ab (Endo et al., 2018; Zhang et al., 2020), alterações nas caderinas podem conferir resistência a Cry1A.105 e Cry2Ab2, toxinas presentes no milho Bt em estudo (Gao et al., 2019; Hua et al., 2004; Liu et al., 2018; Qiu et al., 2015; Zhang et al., 2005; Zhou et al., 2020). Conseqüentemente, insetos resistentes com alterações nas caderinas podem apresentar alterações nas características e funcionamento do intestino médio que implicam em alterações na utilização do alimento.

Alterações na composição de aminoácidos em aminopeptidases, fosfatases alcalinas (enzimas digestivas) (Arenas et al., 2010; Herrero et al., 2005; Jakka et al., 2016, Jurat-Fuentes et al., 2011; Pardo-Lopez et al., 2012, Qiu et al., 2017, Soberón et al., 2009, Wang et al., 2017) e transportadores do tipo ABCC2 (enzimas detoxificadoras) (Gahan et al., 2010; Baxter et al., 2011; Tabashnik et al., 2011) têm sido relatadas em populações de insetos resistentes a proteínas Cry. Novamente, alterações qualitativas ou quantitativas (Silva et al., 2018) dessas proteínas com ação fisiológica elementares no processo digestivo podem ser responsáveis pelo custo adaptativo observado na utilização de alimento observado na população resistente.

Outra possibilidade para justificar o custo adaptativo observado na população resistente é o aumento do gasto energético para reposição de células danificadas em insetos resistentes (Castagnola e Jurat-Fuentes, 2016). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem essa possibilidade, visto que para reparar os danos celulares causados por toxinas Cry às células do epitélio, o inseto resistente precisaria ingerir maior quantidade de alimento que não seria utilizado para conversão em peso, mas sim para o reparo celular.

A detoxificação por meio de hidrólise excessiva das proteínas Cry mediada por proteases digestivas é outro mecanismo relacionado com a resistência (Li et al., 2004). Porém, não é certo se no presente caso que exista esse aumento de atividade detoxificante por meio de proteases presentes em insetos resistentes sobre as toxinas Cry. Se esse fosse o caso, não seria esperada uma redução tão drástica na ECI nem um consumo tão elevado de alimento em um ambiente com a atividade de proteases elevada visto que um sistema proteolítico mais potente auxiliaria e não atrapalharia o processo digestivo. Porém, apesar de não parecer relacionada, essa sugestão requer investigações em função da especificidade das proteases.

Em função da existência de custos adaptativos associados à resistência de *S. frugiperda* ao milho Bt existirem, a perda das características de resistência pode ocorrer quando o agente de seleção da população for removido (Bernardi et al., 2017). Tal fato foi observado no presente estudo, visto que a população R^{PS} derivou da população R em um ambiente de criação sem a presença do agente de seleção por gerações consecutivas.

A ausência do fator de seleção não alterou consideravelmente o desempenho larval da população R, embora haja diferença significativa em três parâmetros (RCR, ECI e período larval). Sabe-se que lagartas de *S. frugiperda* podem apresentar resistência induzida a, por exemplo, moléculas antinutritivas como inibidores de proteases (Oliveira et al., 2013). Porém, lagartas do gênero *Spodoptera* resistentes a formulações de *B. thuringiensis* mantêm ativados os mecanismos de defesa como genes de resposta a patógenos mesmo na ausência do agente de seleção (Hernandez-Martinez et al., 2010). Desse modo, as semelhanças do custo adaptativo observadas na população R alimentada com milho Bt e milho não Bt sugerem que os

mecanismos associados à resistência são ativos mesmo na ausência do fator de seleção.

No manejo de pragas, a retirada de um agente de controle químico aplicado em pulverização é mais simples do que a retirada de agente de controle expresso constitutivamente em plantas durante todo o ciclo agrícola. Por essa razão, atenção aos procedimentos indicados em Programas de Manejo de Resistência de Insetos a plantas transgênicas deve ser seguidos (Bernardi et al., 2017, Fatoretto et al., 2017, Horikoshi et al., 2016, Santos-Amaya et al., 2016b). Ressalta-se que, apesar da existência de custos adaptativos e da tendência de restabelecimento da suscetibilidade, populações de *S. frugiperda* são formadas em campo e comprometem as tecnologias de manejo de pragas alvos em cultivos transgênicos (Santos-Amaya et al., 2016b).

6. CONCLUSÕES

As lagartas de *S. frugiperda* suscetíveis ao milho Bt, tanto a população S como a R^{PS}, aproveitam melhor o alimento ingerido em relação a lagartas de *S. frugiperda* resistentes ao milho Bt (população R).

O consumo e a utilização de alimento por lagartas de *S. frugiperda* da população R é semelhante quando essas lagartas são alimentadas com milho Bt ou milho não Bt.

A manutenção de seguidas gerações de lagartas de *S. frugiperda* resistentes ao milho Bt em ambiente de criação sem exposição ao milho Bt resultou na perda da resistência dessa população.

REFERÊNCIAS

- Acharya B, Head GP, Price PA, Huang F (2017) Fitness costs and inheritance of Cry2Ab2 resistance in *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Journal Of Invertebrate Pathology** 149:8-14.
- Andow DA, Alstad DN (1998) F2 Screen for Rare Resistance Alleles. **Journal of Economic Entomology** 91:572-578.
- Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I (2010) Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Journal of Biological Chemistry** 285:12497-12503.
- Barros EM, Torres JB, Bueno AF (2010) Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology** 39:996-1001.
- Baxter SW, Badenes-Perez FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N, Kain W, Wang P, Heckel DG, Jiggins CD (2011) Parallel evolution of Bt toxin resistance in Lepidoptera. **Genetics** 189:675-679.
- Bernardi O, Albernaz KC, Valicente FH, Omoto C (2011) Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: Borém A, Almeida GD. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Suprema, Visconde de Rio Branco pp 179-204.
- Bernardi D, Salmeron E, Horikoshi RJ, Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, Omoto C (2015) Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. **PLoS One** 10:e0140130.
- Bernardi O, Bernardi D, Horikoshi RJ, Omoto C (2016) Manejo da Resistência de Insetos a Plantas Bt. **PROMIP–Manejo Integrado de Pragas**, Engenheiro Coelho, SP.
- Bernardi, D, Bernardi O, Horikoshi RJ, Salmeron E, Okuma DM, Farias JR, Nascimento ARB, Omoto C (2017) Selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034x TC1507x NK603 maize technology. **Crop Protection** 94:64-68.
- Blanco CA, Chiaravalle W, Dalla-Rizza M, Farias Jr, García-Degano MF, Gastaminza G, Mota-Sánchez D, Murúa MG, Omoto C, Pieralisi BK, Rodríguez J, Rodríguez-

Maciel JC, Terán-Santofimio H, Terán-Vargas AP, Valencia SJ, Willink E (2016) Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Current Opinion in Insect Science** 15:131–138.

Boaventura D, Bolzan A, Padovez FEO, Okuma D, Omoto C, Nauen R (2019) Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science** 76:47-54.

Carvalho RPL (1970) **Danos, flutuação da população de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) e suscetibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo.**170 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 8:e62268.

Carvalho FP (2017) Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security** 6:48-60.

Carrière Y, Tabashnik B (2001) Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences** 268:1475-1480.

Carrière Y, Ellers-Kirk C, Biggs R, Higginson DM, Dennehy TJ, Tabashnik BE (2004) Effects of gossypol on fitness costs associated with resistance to Bt cotton in pink bollworm. **Journal of Economic Entomology** 97:1710-1718.

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

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

Chong J, Wishart DS, Xia J (2019) Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Current Protocols in Bioinformatics** 68:e86.

CIB - Centro de Informação de Biotecnologia. **Produtos transgênicos aprovados.** 2019. Disponível em: <<https://cib.org.br/produtos-aprovados/>>. Acesso em 27 fev 2019.

Cruz I, Monteiro MAR (2004). Controle biológico da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum*. Embrapa Milho e Sorgo. **Comunicado técnico** 90, Sete Lagoas, MG.

Castagnola A, Jurat-Fuentes JL (2016) Intestinal regeneration as an insect resistance mechanism to entomopathogenic bacteria. **Current Opinion in Insect Science** 15:104-110.

CTNBio. Conselho Técnico Nacional de Biossegurança (2020) **Commercial Approvals**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>> Acesso em: 20 Jun 2020.

Endo H, Adegawa S, Kikuta S, Sato R (2018) The intracellular region of silkworm cadherin-like protein is not necessary to mediate the toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and Cry1Ab toxins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 94:36-41.

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.

Faretto JC, Michel AP, Silva Filho MC, Silva N (2017) Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrate Pest Management** 8:1-10.

Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG (2010) An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLoS Genetics** 6:e1001248

Gassmann AJ, Carrière Y, Tabashnik BE (2009) Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 54:147-163.

Gao M, Dong S, Hu X, Zhang X, Liu Y, Zhong J, Lu L, Wang Y, Chen L, Liu X (2019) Roles of midgut cadherin from two moths in different *Bacillus thuringiensis* action mechanisms: correlation among toxin binding, cellular toxicity, and synergism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 67:13237-13246.

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

Gouin A, Bretaudeau A, Nam K, Gimenez S, Aury JM, Duvic B, Fournier P (2017). Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. **Scientific Reports** 7:11816.

Hernández-Martínez P, Navarro-Cerrillo G, Caccia S, de Maagd RA, Moar WJ, Ferre J, Escriche B, Herrero S (2010) Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS One** 5:e12795.

Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, Maagd RA (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. **BMC Genomics** 6:96.

Horikoshi RJ, Bernardi D, Bernardi O, Malaquias B, Okuma DM, Miraldo LL, Amaral FSA, Omoto C (2016) Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports** 6:34864.

Hua G, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ (2004) Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry** 279:28051-28056.

Huang F, Ghimire MN, Leonard BR, Wang J, Daves C, Levy R, Cook D, Head GP, Yang Y, Temple J, Ferguson R (2011) F2 screening for resistance to pyramided *Bacillus thuringiensis* maize in Louisiana and Mississippi populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pest management science** 67:1269-1276.

Huang, F (2020). Resistance of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to transgenic *Bacillus thuringiensis* Cry1F corn in the America: lessons and implications for Bt corn IRM in China. **Journal of Insect Science**, no prelo, doi:10.1111/1744-7917.12826

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2018) Global **Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018**: Biotech crops continue to help meet the challenges of increased population and climate change. ISAAA Brief No. 54, Executive Summary. ISAAA: Ithaca, NY.

Jakka SRK, Knight VR, Jurat-Fuentes JL (2014) Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 107:342-351.

Jakka SRK, Gong L, Hasler J, Banerjee R, Sheets JJ, Narva K et al (2016) Field-evolved Mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. **Applied and Environmental Microbiology** 82:1023-1034.

Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning C, Liu C, Wu K, Jackson J, Gould F, Blanco C, Portilla M, Perera O, Adang M (2011) Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS ONE** 6:e17606.

Jurat-Fuentes JL, Crickmore N (2016) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology** 142:5-10.

Kruger M, Van Rensburg JBJ, Van den Berg J (2012) Transgenic Bt maize: farmers' perceptions, refuge compliance and reports of stem borer resistance in South Africa. **Journal of Applied Entomology** 136:38-50.

Li HR, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Zhu KY and Buschman LL (2004) Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:753-762.

Liu L, Boyd S, Kavoussi M, Bulla Jr. LA, Winkler DD (2018) Interaction of fluorescently labeled cadherin G protein-coupled receptor with the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Proteomics and Bioinformatics** 11:104-110.

Machado V, Fiuza LM (2011) Manejo da resistência: na era das plantas transgênicas. **Oecologia Australis** 15:291-302.

Martinelli S, Omoto C (2005) Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. **Biociência** pp 67-77. Disponível em: <http://www.biociencia.com.br/revista/bio34/resistencia_34.pdf>. Acessado em 29 Nov 2020.

Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Peterson JA, Hunt TE (2018). Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology** 26:286-300.

Nascimento ARB, Fresia P, Cônsoli FL, Omoto C (2015) Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics** 16:985.

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018) Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science** 74:1441-1448.

Onstad DW (2008) The role of environment in insect resistance management. In: Onstad DW (Eds.) **Insect Resistance Management: Biology, Economics and Predictions**, Academic Press, pp. 209-26.

Oliveira CFR, Souza TP, Parra JRP, Marangoni S, Silva Filho MC, Macedo MLR (2013) Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology** 165:19-25.

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.

Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2012) *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews** 37:3-22.

Parra JRP (1991) Consumo e utilização de alimento por insetos. In: Panizzi AR, Parra JRP (Eds) **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, p. 9-65.

Paulillo LCM, Lopes AR, Cristofolletti PT, Parra JRP, Terra WR, Silva Filho MC (2000) Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology** 93:892-896.

Qiu L, Hou L, Zhang B, Liu L, Li L, Deng P, Ma W, Wang X, Fabrick JA, Chen L, Lei C (2015) Cadherin is involved in the action of *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Aa in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology** 127:43-53.

Qiu L, Cui S, Liu L, Zhang B, Ma W, Wang X, Lei C, Chen L (2017) Aminopeptidase N1 is involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxicity in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Scientific Reports** 7:45007.

R CORE TEAM (2019). **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 20 Jun 2020.

Roush RT (1997) Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? **Pesticide Science** 51:328-334.

Santos LM, Redaelli LR, Diefenbach LMG, Efrom CFS (2004) Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural** 34: 345-350.

Santos-Amaya OF, Tavares CS, Monteiro HM, Teixeira TP, Guedes RN, Alves AP, Pereira EJ (2016a) Genetic basis of Cry1F resistance in two Brazilian populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Crop Protection** 81:154-162.

Santos-Amaya OF, Tavares CS, Rodrigues JVC, Campos SO, Guedes RNC, Alves AP, Pereira EJG (2016b). Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science** 73:35-43.

Scriber JM, Slansky Jr F (1981) The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology** 26:183-211.

Silva RB, Cruz I, Figueiredo MLC, Pereira AG, Redoan ACM, Costa MA, Pentead-Dias AM (2012) Flutuação populacional de parasitoides de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho (*Zea mays* L.) consorciado com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em sistema de produção orgânico. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** 11:115-119.

Silva IHS, Gómez I, Sánchez J, Castro DM, Valicente FH, Soberón M, Polanczyk RA, Bravo A (2018) Identification of midgut membrane proteins from different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) that bind to Cry1Ac toxin. **PLoS One** 13:e0207789.

Silva-Brandão KL, Horikoshi RJ, Bernardi D, Omoto C, Figueira A, Brandão MM (2017). Transcript expression plasticity as a response to alternative larval host plants in the speciation process of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda*. **BMC Genomics** 18:792.

Simon JY, Ing RT (1984). Microsomal biphenyl hydroxylase of fall armyworm larvae and its induction by allelochemicals and host plants. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology** 78:145-152.

Soberón M, Gill SS, Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences** 66:1332-1349.

Sousa FF, Mendes SM, Santos-Amaya OF, Araújo OG, Oliveira EE, Pereira EJ (2016) Life-history traits of *Spodoptera frugiperda* populations exposed to low-dose Bt maize. **PLoS One** 11:e0156608.

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.

Storer NP, Kubiszak ME, Ed King J, Thompson GD, Santos AC (2012) Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, 110:294-300.

Tabashnik BE, Dennehy TJ, Carrière Y (2005) Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102:15389-15393.

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

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, Huang F, Ghimire MN, Leonard BR, Siegfried BD, Rangasamy M, Yang Y, Wu Y, Gahan LJ, Heckel DG, Bravo A, Soberón M (2011) Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different mechanisms of resistance. **Nature Biotechnology** 29:1128-1131.

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

Valicente FH (2015) Manejo integrado de pragas na cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo. **Circular Técnica** 208, Sete Lagoas, MG.

Vassallo CN, Bunge FF, Signorini AM, Valverde-Garcia P, Rule D, Babcock J (2019). Monitoring the evolution of resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

Noctuidae) to the Cry1F protein in Argentina. **Journal of Economic Entomology** 112:1838-1844.

Waldbauer GP (1968) Consumption and utilization of food. In: Beament JWL, Treherne JE, Wigglesworth VB (Eds) **Advances in Insect Physiology**. Nova York: Academic Press, pp. 142-199.

Wang QQ, Cui L, Wang Li, Liang P, Yuan HZ, Rui CH (2019) Research progress on insecticides resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Chinese Journal of Pesticide Science** 21:401-408.

Wang XY, Du LX, Liu CX, Gong L, Han LZ, Peng YF (2017) RNAi in the striped stem borer, *Chilo suppressalis*, establishes a functional role for aminopeptidase N in Cry1Ab intoxication. **Journal of Invertebrate Pathology** 143:1-10.

Zhang X, Candas M, Griko NB, Rose-Young L, Bulla Jr. LA (2005) Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. **Cell Death and Differentiation** 12:1407-1416.

Zhang J, Jin M, Yang Y, Liu L, Yang Y, Gómez I, Bravo A, Soberón M, Xiao Y, Liu K (2020). The Cadherin protein is not involved in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab or Cry1Fa toxins in *Spodoptera frugiperda*. **Toxins** 12:375.

Zhou H, Hu W, Huang Q, Abouzaid M, Jin H, Sun Y, Qiu L, Zhang W, Lin Y, Ma W (2020) Knockdown of cadherin genes decreases susceptibility of *Chilo suppressalis* larvae to *Bacillus thuringiensis* produced crystal toxins. **Insect Molecular Biology** 29:301-308.