

Bacillus thuringiensis no Manejo Integrado de Pragas

Do uso convencional em Pulverização à Biotecnologia

Ricardo Antonio. Polanczyk

Engenheiro Agrônomo, Doutorando – Programa de Pós Graduação em Entomologia (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ -USP).

rapolanc@esalq.usp.br

Samuel Martinelli

Engenheiro Agrônomo, Doutorando – Programa de Pós Graduação em Entomologia (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ -USP).

smartinc@esalq.usp.br

Celso Omoto

Engenheiro Agrônomo, Prof. Dr. Depto Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ-USP).

celomoto@esalq.usp.br

Sérgio Batista Alves

Engenheiro Agrônomo, Prof. Dr. Depto Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ-USP).

sebalves@esalq.usp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

1. Introdução

A exploração agrícola intensiva, necessária para atender à crescente demanda interna por alimentos, aumento do volume de exportações agrícolas e necessidade por produtos como fibras, tem como fator limitante o impacto negativo nos ecossistemas. De acordo com Tilman et al. (2001), diante da continuidade dos impactos ambientais globais provocados pela agricultura, 10⁹ hectares de ecossistemas naturais serão convertidos em sistemas agrícolas até o ano de 2050. Do mesmo modo, os agroquímicos, utilizados para o controle de pragas agrícolas são muitas vezes responsáveis por contaminações do meio ambiente e intoxicações de produtores rurais. Portanto, é importante o desenvolvimento e implementação de táticas de controle de pragas menos agressivas, que estejam de acordo com as premissas do Manejo Integrado de Pragas, e que, ao mesmo tempo, proporcionem o retorno econômico ao agricultor.

Neste sentido, o controle biológico é uma importante estratégia que, através da liberação, incremento e conservação de insetos parasitoides, predadores e microrganismos, impede que os insetos-praga atinjam níveis populacionais capazes de causar dano econômico. Indiretamente, diminui o impacto dos agroquímicos sobre o meio ambiente, pois minimiza ou torna desnecessário o seu uso. Entre os microrganismos com potencial para serem empregados no controle biológico

destaca-se o entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Esta bactéria é capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela sua atividade tóxica. As suas toxinas, após a ingestão, solubilização e ativação no intestino do inseto, unem-se às células do epitélio, formando poros e desestabilizando os gradientes osmótico e iônico, fazendo com que este cesse a alimentação, morrendo por inanição ou septicemia (Priest, 2000; Glare & O'Callaghan, 2000). Para que a patologia de *Bt* ocorra é necessário que o intestino do inseto permita a eficiente solubilização do cristal e que proteases ativem as protoxinas resultantes desta solubilização. Estas etapas são essenciais para que a toxina passe pela membrana peritrofica e se ligue aos receptores presentes na parede do intestino médio do inseto. Em função da variabilidade genética, entre os insetos há diferenças específicas e não específicas com relação à especificidade dos receptores das toxinas de *Bt*. A especificidade do receptor assume papel vital na defesa do organismo contra esta ação inseticida, juntamente com a solubilização do cristal e ativação da toxina. A ausência de necessidade de solubilizar o cristal e ativar as toxinas produzidas pelas plantas transgênicas pode influenciar a suscetibilidade dos organismos-alvos e não-alvos de controle. A morte do inseto, no caso de produtos à base de *Bt* é uma interação da ação da toxina e dos esporos; o primeiro fator leva à formação de poros no tecido epitelial,

causando desequilíbrio osmótico e iônico e a segunda causa septicemia devido à germinação dos esporos, proporcionada pela redução do pH intestinal devido à ação das toxinas. No caso de plantas-*Bt*, a causa da morte é somente a toxina.

As primeiras tentativas de utilização de *Bt* no controle de pragas foram feitas na Europa durante a década de 30. Devido aos êxitos iniciais, a produção deste patógeno começou na França em 1938. Nos EUA, o interesse por este patógeno aumentou após 1950, principalmente para o controle de lepidópteros (Lambert & Peferoen, 1992; Beegle & Yamamoto, 1992).

Deve-se salientar que a pressão da opinião pública quanto à saúde humana e preservação do meio ambiente incentivou a utilização de produtos microbianos, principalmente em hortaliças e frutíferas com alto valor comercial. Em 1970 foi lançado no mercado o Dipel (*Bt kurstaki*) que provou ser 20 a 200 vezes mais potente que outros isolados desta bactéria (Beegle & Yamamoto, 1992). Este produto, atualmente, é utilizado para o controle de mais de 167 lepidópteros-praga (Glare & O'Callaghan, 2000). Além disso, em 1976 foi caracterizado um isolado eficaz para o controle de insetos da ordem Diptera, denominado *Bt israelensis* e em 1983 outro letal para coleópteros denominado de *Bt tenebrionis*. O sucesso do uso de *Bt* no mundo só não é maior até agora, em função da existência de inseticidas químicos baratos que podem substituí-lo no controle de lepidópteros.

Além de ser utilizado como bioinseticida, a partir da metade da década de 1980, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas com a incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *Bt* em plantas de fumo e tomate (Dias, 1992). Segundo Ely (1993), mais de 50 espécies de plantas sofreram transformações deste tipo com resultados satisfatórios. Formas truncadas dos genes que codificam proteínas inseticidas de *Bt* na sua forma ativa foram introduzidas e expressas com sucesso em plantas de fumo (Vaeck et al., 1987) e algodão (Perlak et al., 1990). Koziel

et al. (1993), através da inserção de uma versão modificada do gene truncado *cry1Ab*, conseguiram a expressão da proteína Cry1Ab em altos níveis em plantas de milho e, em testes de campo, foi verificada a proteção contra o consumo foliar e perfuração de colmos por *Ostrinia nubilalis*, uma importante praga da cultura do milho nos EUA.

De acordo com Clive (2002), estima-se que foram ocupados cerca de 58,7 milhões de hectares com culturas transgênicas no ano de 2002, com um aumento de 11,6% em relação ao ano anterior (Figura 1). A Índia, o maior produtor mundial de algodão, comercializou algodão-*Bt* pela primeira vez em 2002. Também, foi verificado um aumento da área pré-comercial de algodão-*Bt* na Colômbia e em Honduras. O EUA foi o país com maior área plantada, cerca de 39 milhões de hectares (66%), seguido pela Argentina (23%), Canadá (6%) e China (4%). A China apresentou o maior incremento anual (40%) entre 2001 e 2002 na área plantada com algodão-*Bt*, ocupando 51% da área cultivada com esta espécie. Em termos mundiais, o milho geneticamente modificado ocupou 12,4 milhões de hectares (com aumento de 9% em relação à área de 2001), seguido pelo algodão e canola com 6,8 e 3 milhões de hectares, respectivamente (Figura 2).

2. Vantagens e Limitações

O emprego de biopesticidas à base de *Bt* é altamente desejável em programas de controle de insetos devi-

do à sua alta especificidade e rápida degradação do ambiente. No entanto, de acordo com Vaeck et al. (1987), independentemente das vantagens do uso de inseticidas à base de toxinas produzidas pela bactéria *Bt*, o emprego destes produtos em escala comercial é limitado em função da instabilidade do cristal protéico em campo, devido à ação da luz ultravioleta e do seu alto custo de produção. Em relação ao efeito destas toxinas sobre insetos benéficos, Glare & O'Callaghan (2000) relatam estudos realizados sobre o efeito de várias subespécies e produtos à base de *Bt* sobre 9 ordens de predadores, distribuídos em 25 famílias. Em relação aos parasitóides, os mesmos autores enumeram uma série de trabalhos realizados com Diptera (Tachinidae) e Hymenoptera (Aphelinidae, Braconidae, Chalcididae, Encyrtidae, Eulophidae, Eupelmidae, Ichneumonidae, Pteromalidae, Scelionidae e Trichogrammatidae). Em ambos os casos, embora os estudos tenham mostrado alguma variação nos resultados, os produtos formulados com *Bt* e suas subespécies apresentam pouco ou nenhum efeito sobre estes inimigos naturais.

Os benefícios potenciais do uso de plantas geneticamente modificadas como, por exemplo, milho-*Bt*, não se limitam apenas à redução na aplicação de inseticidas de largo espectro. Estudos mostram a diminuição dos níveis de micotoxinas nos grãos destas plantas (Munkvold et al., 1999).

De acordo com Obrycki et al. (2001), os riscos ou limitações no uso das plantas geneticamente mo-

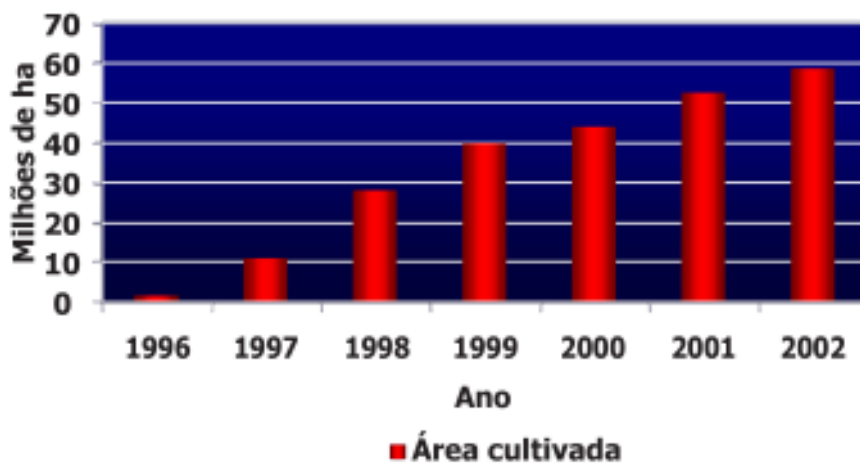


Figura 1. Adoção mundial de plantas geneticamente modificadas (GM)

dificadas podem ser agrupados em três categorias: troca de material genético entre as plantas geneticamente modificadas e espécies selvagens aparentadas por meio da dispersão de grãos de pólen; a seleção de indivíduos resistentes na população do inseto-alvo de controle e o impacto da tecnologia sobre outros insetos e organismos não-alvos do controle. Com relação à troca de material genético, segundo Ellstrand et al. (1999), as plantas domesticadas e utilizadas em sistemas agrícolas não podem ser consideradas como indivíduos evolutivamente separados de seus parentes selvagens. Dentre as 13 mais importantes espécies utilizadas para a produção de alimentos, 90% destas formam híbridos com seus parentes selvagens em algum local dentro de sua área de distribuição agrícola. Deste modo, os centros de origem das espécies seriam os locais mais suscetíveis a tal fenômeno. A taxa de fluxo gênico neste caso tende a ser extremamente variável e as suas consequências evolutivas dependem de sua magnitude. A consequência evolutiva mais clara do fluxo gênico é a sua tendência em homogeneizar a composição genética das populações. A taxa de fluxo gênico pode ser efetivamente zero entre plantas com incompatibilidade de cruzamento que estejam isoladas espacialmente ou que não apresentem sobreposição de suas épocas de florescimento. Porém, os autores chamam a atenção em particular para os agroecossistemas. Em tais casos, o plantio concentrado de uma espécie de interesse econômico pode permitir que outras espécies (ex: plantas daninhas) sofram hibridização e introgressão de genes vindos do campo de produção agrícola. Assim, o fluxo gênico entre as plantas domesticadas e seus parentes selvagens apresenta potencialmente duas consequências danosas: o aumento da capacidade de invasão de ambientes por algumas espécies e o aumento do risco de extinção destes parentes selvagens. De acordo com Wolfenbarger & Phifer (2000), modificações genéticas através do melhoramento genético, convencional ou através de engenharia

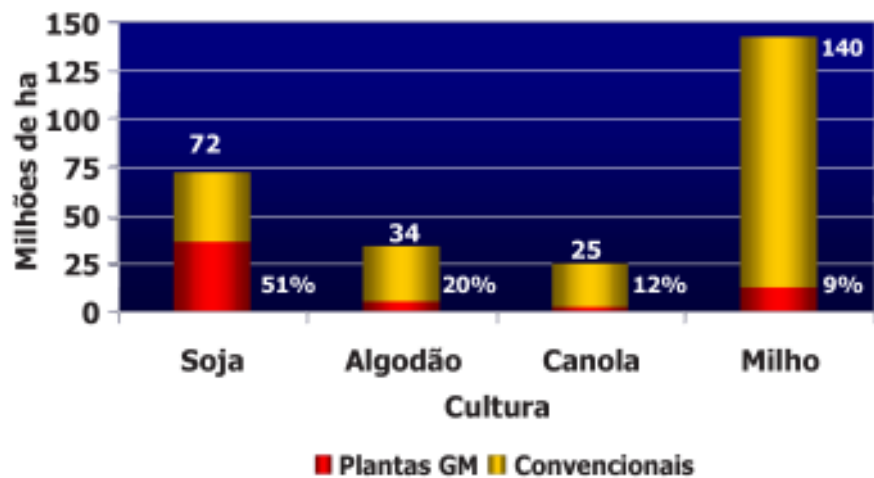


Figura 2. Taxa de adoção mundial das principais culturas GM em 2002

genética, de uma espécie cultivada, ou não, podem produzir mudanças e promover a habilidade de um organismo se tornar invasor de diferentes ecossistemas. Deste modo, a transferência de pólen de plantas de milho-*Bt* para plantas selvagens aparentadas é uma preocupação decorrente da adoção desta tecnologia (Bergelson et al., 1998). No entanto, esta transferência é limitada a regiões do México e América Central onde ocorrem plantas do grupo dos teosíntos (Ellstrand et al., 1999).

O impacto das plantas geneticamente modificadas sobre a entomofauna benéfica começou a receber grande atenção após a publicação de Losey et al. (1999) na revista Nature. Este estudo mostrou que o pólen do milho transgênico expressando toxinas de *Bt* causou mortalidade de cerca de 50% das lagartas da borboleta monarca (*Danaus plexippus*) (Lepidoptera: Nymphalidae), quatro dias após a ingestão. Porém, este trabalho foi bastante criticado, principalmente, por não relatar precisamente a quantidade de toxina utilizada nos bioensaios. Outros estudos, como os realizados por Leong et al. (1992) e Hansen & Obrycki (1999) indicam que este inseto pode ser afetado pelo milho-*Bt*, porém os níveis de mortalidade são bastante inferiores aos verificados por Losey et al., (1999). Glare & O'Callaghan (2000) ressaltam que o comportamento do inseto, migração a partir de áreas com esta toxina, poderia reduzir o efeito da toxina sobre esta espécie.

Deve-se ressaltar que o impacto das plantas geneticamente modificadas sobre os organismos não-alvos do controle pode ser avaliado através de estudos toxicológicos e/ou ecológicos (Obrycki et al., 2001). Nos estudos toxicológicos, o parâmetro avaliado é a mortalidade dos herbívoros e dos consumidores de pólen quando expostos às toxinas de *Bt* como realizado por Losey et al. (1999). Por sua vez, nos estudos ecológicos são observados os efeitos da utilização destas plantas sobre os demais níveis tróficos constituintes de uma cadeia alimentar (herbívoros predadores e parasitóides). Ainda existem questionamentos quanto ao impacto das toxinas presentes em plantas de milho-*Bt* sobre insetos polinizadores de outras plantas. Vandenberg (1990) detectou valores significativos de mortalidade de abelhas domesticadas quando expostas à solução de *Bt tenebrionis*, o qual é considerado específico para coleópteros. Ainda, segundo Obrycki et al. (2001), os efeitos das plantas de milho-*Bt* também deveriam ser avaliados sobre decompositores presentes no solo (ex: Collembola) e outros predadores vertebrados. Estes últimos estudos se justificam já que algumas espécies de pássaros e morcegos são predadoras de lepidópteros que frequentemente ocorrem em campos de milho.

Em relação ao efeito de plantas transgênicas sobre inimigos naturais, de acordo com Orr & Landis

(1997), o número de predadores e o parasitismo de massas de ovos de *O. nubilalis* não foram adversamente afetados por plantas de milho-Bt expressando Cry1A(b). Entre os predadores foram avaliados adultos e ninfas do percevejo predador *Orius insidiosus*, bem como adultos e larvas de coccinelídeos e crisopídeos.

Pilcher et al. (1997) conduziram estudos em laboratório e campo para determinar os efeitos de milho-Bt expressando Cry1A(b) sobre insetos predadores. No laboratório, não foi verificado qualquer efeito detrimental agudo sobre o desenvolvimento pré-imaginal e sobrevivência de *Coleomegilla maculata*, *O. insidiosus* e *Chrysoperla carnea*. No campo, em estudo realizado por dois anos consecutivos, não foram observados efeitos adversos sobre a abundância de predadores de *O. nubilalis* (coccinelídeos, crisopídeos e antocorídeos) quando comparadas a áreas de milho não geneticamente modificado. Ainda, os números de predadores observados antes, durante e após a liberação dos grãos de pólen pelas plantas de milho-Bt sugerem que movimento dos inimigos naturais no campo não foi afetado por este tipo de pólen.

Os efeitos de presas alimentadas com milho-Bt sobre a mortalidade e desenvolvimento de larvas do predador *C. carnea* foram estudadas em condições de laboratório por Hilbeck et al. (1998a). O predador foi criado com lagartas de *O. nubilalis*, e *Spodoptera littoralis* alimentadas com milho contendo a toxina Cry1A(b). Foi observado prolongamento no período larval de crisopídeos criadas continuamente com presas que foram alimentadas com o milho geneticamente modificado foi significativamente maior comparada com a testemunha, baixo valor nutricional. Ainda, foi observado prolongamento no período larval de crisopídeos criados com lagartas de *O. nubilalis* alimentadas com milho geneticamente modificado. Este efeito pode ser atribuído à exposição à toxina inseticida em conjunto com o uso de presas de baixo valor nutricional.

O desenvolvimento e mortalidade de formas larvais do predador *Orius majusculus* criadas sobre tripes *Anapobthrips obscurus*, alimentados com milho geneticamente modificado expressando a d-endotoxina Cry1A(b), foi estudado por Zwahlen et al. (2000). A atividade inseticida das plantas de milho Bt foi comprovada através de bioensaios utilizando-se lagartas de *O. nubilalis*. Não houve diferença significativa na mortalidade e no desenvolvimento das formas imaturas do predador criadas em *A. obscurus* alimentados com milho transgênico expressando a toxina Cry1A(b), quando comparados à testemunha criada com tripes não expostos à proteína inseticida de *B. thuringiensis*. Os resultados obtidos não evidenciaram efeitos letais ou subletais nos indivíduos de *O. majusculus* no modelo de interação tritrófica (milho Bt – herbívoro – predador) elaborado pelos autores. Segundo os autores, a resposta de *O. majusculus* alimentados com tripes expostos à Cry1A(b) pode ser explicada pela insensibilidade deste percevejo à toxina ou pela baixa quantidade de proteína inseticida ingerida pelos tripes que se alimentaram do milho Bt.

Al-Deeb & Wilde (2003) não identificaram diferenças significativas entre parcelas com milho Bt Cry3Bb1 e o isogênico, com relação ao número de insetos não alvos de controle coletados em armadilhas do tipo alçapão. As inspeções visuais de adultos e formas imaturas de *C. maculata*, *O. insidiosus* e *Hippodamia* convergens também não mostraram diferenças significativas entre os materiais testados. Segundo Al-Deeb et al. (2001), não houve diferença significativa entre o número de adultos e ninfas de *O. insidiosus* em plantas milho Bt expressando a toxina Cry1A(b) e milho convencional em condições de campo, em duas localidades estudadas. Ainda os autores conduziram teste em laboratório para avaliar os efeitos de estilo-estigmas de milho-Bt na mortalidade de formas imaturas de *O. insidiosus*. Os resultados

mostraram que quando criados continuamente sobre estilo-estigmas de milho convencional ou milho Bt as ninfas deste percevejo predador apresentaram 100% de mortalidade, sugerindo que estes insetos sofreram com insuficiência nutricional nesta dieta. Porém, não houve diferença significativa na mortalidade das ninfas do percevejo quando alimentadas com estilo-estigmas de milho-Bt ou convencional e ovos de *O. nubilalis* em dias alternados.

Segundo Barton & Dracup et al. (2000), as práticas agrícolas têm causado impactos ambientais nos ecossistemas. Deste modo, os riscos e benefícios em potencial da adoção da tecnologia de plantas geneticamente modificadas devem ser ponderados tomando-se como referencial os impactos ambientais decorridos dos sistemas atuais de produção agrícola. Porém, os riscos ao ambiente das plantas geneticamente modificadas devem ser avaliados antes de sua liberação para o plantio comercial, e posteriormente as áreas ocupadas com estas culturas devem ser monitoradas. Portanto, conforme apontado por Fernandes & Martinelli (2000), os estudos com plantas transgênicas resistentes a insetos em áreas extensas com o objetivo de se determinar quais são as espécies indicadoras de impacto ambiental destas plantas em um determinado sistema devem ser priorizados. Ainda há a necessidade de se padronizar métodos de avaliação e interpretação de resultados, possibilitando a avaliação destas plantas por todo o Brasil. Deste modo, estes resultados poderiam ser levados a público promovendo uma ampla discussão sobre o tema.

Não obstante, a evolução da resistência às toxinas presentes nas plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos é uma das principais preocupações para a liberação comercial destas plantas. De acordo com Heckel (1997) a partir do momento em que ocorrer a liberação para plantio em áreas extensas, as toxinas de Bt representarão um importante fator de mortalidade para as populações dos insetos-alvos. Esta alta pressão de seleção pode conduzir à evolução da resistência a estas

toxinas inseticidas nas populações dos insetos expostos. Existem várias conseqüências negativas no desenvolvimento de resistência às toxinas de *Bt*. Além da perda das plantas transgênicas que expressam tais toxinas como opção no controle de insetos, há o risco de que o uso de formulações comerciais de inseticidas à base de *Bt* não seja mais viável para a aplicação em lavouras de milho ou em outras culturas. Os produtores orgânicos perderiam uma importante opção para o manejo de pragas, o qual é certificado para o seu sistema de produção. Além disso, as possibilidades de substituição destes produtos de origem biológica por outros são mínimas. O aumento da utilização de inseticidas sintéticos também é outra conseqüência em potencial do desenvolvimento da resistência às toxinas de *Bt* (EPA, 1998).

3. Evolução da Resistência a Produtos à Base de *Bt* e Plantas Geneticamente Modificadas

A resistência é um fenômeno pré-adaptativo que se desenvolve por seleção de indivíduos raros que podem sobreviver à aplicação de um inseticida a uma determinada dose. Um grande número de fatores genéticos, bio-ecológicos e operacionais influenciam a taxa de evolução da resistência. Os fatores genéticos incluem a variabilidade natural nas populações, número de genes envolvidos na manifestação da resistência e sua freqüência inicial na população (Georghiou & Taylor, 1977), a herança da característica (ex: grau de dominância) e custo adaptativo associado à resistência (Van Rie & Ferré, 2000). O potencial das populações de insetos em desenvolver resistência aos produtos formulados com *Bt* utilizados no controle de pragas é uma das principais ameaças ao emprego desta estratégia de controle de pragas agrícolas. A evolução da resistência dos insetos para inseticidas químicos é bastante comum, com mais de 500 espécies sendo resistentes a um ou vários inseticidas. Já para os bioinseticidas é comparati-

vamente mais rara, principalmente devido ao fato de que estes são pouco utilizados, se compararmos com a área tratada com inseticidas químicos em todo mundo.

Há dois modos de estudar a influência da variabilidade em populações naturais sobre a resistência a *Bt*. A primeira envolve o estudo das diferenças na suscetibilidade entre e dentro de populações. Trabalhos neste sentido foram desenvolvidos por van Frankenhuyzen et al. (1995) e Huang et al. (1997) para *Choristoneura fumiferana* e *O. nubilalis*, respectivamente. Outra estimativa da variabilidade para genes de resistência em populações naturais é medir a herdabilidade (b^2) em experimentos laboratoriais a partir de uma amostra da população. Este índice representa a proporção da variação fenotípica de um determinado caráter responsável pela variação genética. Tabashnik (1994a) estimou o b^2 para 8 espécies de insetos, com valor relativamente alto para *Plodia interpunctella*, mostrando abaixa variação fenotípica e alta variação genética aditiva deste inseto.

A estimativa indireta da freqüência dos alelos de resistência é fornecida por experimentos laboratoriais que obtiveram êxito em selecionar populações resistentes a *Bt* (Van Rie & Ferré, 2000). Nestes casos, pelo menos uma cópia do alelo de resistência deve estar presente para o início da seleção. Em experimentos com lepidópteros (Gould et al., 1992; 1995), a freqüência de alelos de resistência nas populações testadas foi relativamente alta (de 1 a 5×10^{-3}).

Quanto à herança da resistência, McGaughey (1985, 1988) mostraram que para *P. interpunctella* a herança é autossômica de parcialmente a completamente recessiva. O mesmo foi verificado para *Plutella xylostella* por Tabashnik et al. (1992) e Tang et al. (1997). Em outro trabalho com este mesmo inseto, (Ferré et al., 1991) verificaram que a suscetibilidade da progênie F1 depende do sexo do inseto no cruzamento parental, ainda que a ligação com o sexo tenha sido eliminada com base na razão sexual 1:1 dos sobreviventes da F1 a várias doses da Cry1Ab.

Já para *H. virescens* os trabalhos demonstraram que os resultados dependem da linhagem do inseto estudada. Por exemplo: para a linhagem SEL a herança mostrou-se autossômica, incompletamente dominante, e controlado por vários fatores genéticos (Sims et al., 1991).

Em relação ao número de genes envolvidos na resistência, para *P. xylostella* há trabalhos que indicam a ocorrência de mais de um gene envolvido (Tang et al., 1997). Porém, segundo Glare & O'Callaghan (2000), a resistência deste inseto para Cry1Ab mostra-se recessiva controlada principalmente por um único alelo autossômico e recessivo, embora isto não seja sempre atribuído ao mesmo "loci". Tabashnik et al. (1997) relatou que populações do Hawai e Pensilvânia dividem um "locus" em que uma mutação recessiva associada com a reduzida ligação ao receptor confere resistência extremamente alta a 4 toxinas de *Bt*. Entretanto, outra população, das Filipinas, mostrou um controle "multilocus", de espectro mais reduzido, e para algumas toxinas de *Bt*, a herança genética não é recessiva e não está associada com a redução da ligação ao receptor. Já para *Heliothis virescens* é provável que um gene principal parcialmente recessivo confere resistência a várias toxinas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Fa, causando modificações no receptor (Gould et al., 1995; Lee et al., 1995).

Embora a resistência em laboratório seja obtida em poucas gerações em alguns insetos, ela é na maioria dos casos instável, reduzindo logo após a diminuição da pressão de seleção, como foi observado por Tabashnik et al. (1994) e Tang et al. (1997) para *P. xylostella*. O custo adaptativo associado à evolução da resistência é a causa mais provável da instabilidade da resistência em *P. xylostella*. Groeters et al. (1994) mostraram tal redução no custo adaptativo, sendo que após 5 gerações, a eclosão das lagartas e fecundidade foram reduzidos em 10% na linhagem resistente em comparação com a suscetível. A compreensão desta instabilidade pode indicar porque a

Tabela 1 - Relatos de desenvolvimento de resistência a produtos à base de *Bacillus thuringiensis* ou toxinas em laboratório (modificado de Glare & O'Callaghan, 2000 e Tabashnik et al., 2003).

Inseto	Subespécie	Nível de resistência	Toxina(s)	Resistência cruzada
<i>Choristoneura fumiferana</i>	<i>sotto</i>	3,8 x	-	-
<i>Cryomela scripta</i>	-	acima 5.000 x	Cry3Aa	Cry1Ba
	<i>tenebrionis</i>	59 x	Cry3	-
<i>Ephestia cautella</i>	<i>kurstaki</i>	7 x	-	-
<i>Homeoecostoma electellum</i>	<i>kurstaki</i>	1,7 x		-
<i>Heliothis armigera</i>	Cry1Ac	13 - 57 x		-
<i>H. virescens</i>	<i>kurstaki</i> HD-1	mais de 24 x	Cry1	-
	<i>kurstaki</i> HD-1	12- 69 x	Cry1Ab	-
	-	50 - 53 x	Cry1Ac	Cry1Ab, Cry2A
	-	10.000 x	Cry1Ac	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1F, Cry1B, Cry1C e Cry2A
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Cry3A	acima 100 e 400 x		
<i>Ostrinia nubilalis</i>	-	baixo nível	Cry1Ab	
	<i>kurstaki</i>	acima 73 x	-	-
<i>Pectinophora gossypiella</i>	-	3.100	Cry1Ac	-
<i>Plodia interpunctella</i>	<i>kurstaki</i>	acima de 250 x	-	-
	<i>kurstaki</i> (Dipel)	acima 250 x	-	<i>thuringiensis kurstaki</i> (menos HD-1) e <i>galleriae</i>
	<i>kurstaki</i> (Dipel)	acima de 25 x	-	-
	<i>kurstaki</i> (Dipel)	acima 106 x	Cry1Ab	-
		cerca de 875 x	Cry1Ab	-
	<i>kurstaki</i>	140 x	-	-
	<i>aizawai</i>	28 - 61 x	-	-
	<i>entomocidus</i>	21 x	-	-
<i>Plutella xylostella</i>	<i>kurstaki</i>	15 - 66 x	-	-
	-	22 - 62 x	Cry1C, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F e Cry2	Cry1F, Cry1J
	Cry1C	12.400		-
	Cry1Ac	300 - acima de 6.800 x		-
<i>Spodoptera exigua</i>	<i>kurstaki</i>	1-2 x	-	-
		850 x	Cry1C	Cry1Ab, Cry1C, Cry1E/Cry1C, Cry1H e Cry2A
<i>S. frugiperda</i>	<i>kurstaki</i>	4,9 x	-	-
<i>S. littoralis</i>	<i>aizawai</i>	mais de 500 x	Cry1C	Cry1D, Cry1E e Cry1Ab
<i>Trichoplusia ni</i>		31 x	Cry1Ab	Cry1Aa ou Cry1Ac
	<i>kurstaki</i> + <i>aizawai</i>	15 x	-	-
	<i>kurstaki</i> HD-1	307 x	-	-
	<i>aizawai</i> HD-112 e HD-133	28 e 97 x	HD-1, 198, 133 e HD-1, 112 e 198	-
	<i>entomocidus</i> HD-198	32 x	HD-1, 112 e 133	-
	<i>kurstaki</i> + <i>aizawai</i>	164 e 62-100 x	<i>entomocidus</i>	-

Tabela 2 - Relatos de possível desenvolvimento de resistência de insetos para *Bacillus thuringiensis* em campo (Glare & O'Callaghan, 2000).

Inseto	Subespécie	Nível de resistência	Toxina(s)
<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>kurstaki</i>	-	
<i>Heliothis virescens</i>	MVP II	Tolerante	Cry1Ac
<i>Plodia interpunctella</i>	<i>kurstaki</i>	Baixo	
<i>Plutella xylostella</i>	<i>kurstaki</i>	25 - 426 x	Cry1Ab
	<i>aizawai</i>	3 - 20 x	Cry1Ac
<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>kurstaki</i>	1,48 x	

evolução da resistência ao *Bt* é tão rara e pode auxiliar na elaboração de estratégias para incrementar a utilização deste bioinseticida (Tabashnik et al., 1994).

A alteração da atividade proteolítica (ativação da toxina) foi verificada em *P. interpunctella* para *Bt entomocidus* e *Bt kurstaki* (Johnson et al., 1990; Oppert et al., 1997). Em trabalho semelhante realizado por Van Rie et al. (1990), foi observada a redução de 50 vezes na afinidade da toxina pelo receptor. Porém, os autores não verificaram alteração no número de receptores presentes para Cry1Ab na linhagem resistente. Estes dados indicam que a resistência, neste caso, é devida a alterações no receptor de Cry1Ab, pois o mesmo decréscimo de afinidade não foi observado para Cry1Ca, que possui 3 vezes mais receptores que a outra toxina. Este elevado número de receptores pode explicar a alta suscetibilidade da linhagem selecionada para Cry1Ca. Para *H. virescens* foi verificado por Lee et al. (1995) que a ligação da toxina Cry1Aa ao receptor foi drasticamente reduzida, mas o mesmo não foi verificado para Cry1Ab e Cry1Ac. Porém, as toxinas do grupo Cry1A dividem os mesmos receptores nesta espécie de inseto, portanto Cry1Ac e Cry1Ab também se ligam ao receptor de Cry1Aa. Consequentemente foi considerada a hipótese que o receptor alterado para Cry1Aa causa resistência ao 3 subclasses de Cry1A (Van Rie & Ferré, 2000).

Exemplos de Resistência de Insetos a produtos à base de *Bacillus thuringiensis*:

1) Em laboratório

Existem vários relatos de evolução da resistência a *Bt* em laboratório

(Tabela 1). Para a maioria das espécies testadas a resistência evoluiu rapidamente para *Bt kurstaki*, *Bt entomocidus* e *Bt tenebrionis* ou *Bt aizawai*. Quando a diferença entre as populações suscetíveis e resistentes é menor que 10, não fica claro se a população desenvolveu resistência, propriamente dita, ou se existe tolerância entre subgrupos ou genótipos da espécie em questão (Glare & O'Callaghan, 2000).

O primeiro exemplo de resistência em laboratório ocorreu com *Musca domestica* ao *Bt thuringiensis*, provavelmente envolvendo b-exotoxina. De modo semelhante, trabalhos mostraram uma evolução de resistência de 10 da mesma toxina para *Drosophila melanogaster* em 30 gerações (Harvey & Howell, 1964; Wilson & Burns, 1968; Carlberg & Lindstrom, 1987).

A partir do primeiro relato de resistência de *Plodia interpunctella* a d-endotoxina (McGaughey & Beeman, 1988), vários relatos de desenvolvimento de resistência em laboratório foram feitos. Em alguns casos os estudos envolvem a suspensão esporo + cristal enquanto que em outros casos apenas toxina(s). Em alguns casos níveis elevados de resistência foram obtidos em apenas algumas gerações usando-se alta pressão de seleção, como por exemplo: *P. interpunctella* para *Bt kurstaki* e *P. xylostella* para *Bt aizawai* Cry1C, de 3 e 6 gerações respectivamente (Glare & O'Callaghan, 2000).

2) Em campo

Embora alguns trabalhos realizados em laboratório com alta pressão de seleção de *Bt* sobre *P. xylostella* (traça-das-crucíferas) [sic] não tenha sido verificado alteração significativa na suscetibilidade

(Devriendt & Martouret, 1976), este inseto foi o primeiro a mostrar evolução de resistência para *Bt* em campo (Tabashnik et al., 1997), sendo, até o momento, o único exemplo em que foi verificada a evolução da resistência em campo de um inseto para *Bt*, embora para outras espécies de lepidópteros (Tabela 1) tenha sido sugerido esta possibilidade, porém pouca diferença na suscetibilidade foi verificada entre as populações de campo (resistente) e a de referência em laboratório (suscetível). Segundo Glare & O'Callaghan (2000), outros relatos de resistência deste inseto a produtos à base de *Bt* foram feitos em vários países como Tailândia, Havaí, Japão, Coreia, China, EUA e América Central.

A espécie influencia a probabilidade de evolução da resistência devido à variabilidade genética na população e à possibilidade de encontrar o inóculo. Por exemplo, o hábito migratório e polígrafo de *Helicoverpa punctigera* leva à diluição de qualquer população resistente devido ao cruzamento de indivíduos resistentes com suscetíveis, entretanto, *P. xylostella* é um inseto com mobilidade limitada, não ocorrendo à diluição da resistência, pelo cruzamento com insetos suscetíveis vindos de outras áreas (Glare & O'Callaghan, 2000).

A incidência de resistência cruzada é geralmente baixa, mas foi verificada para várias toxinas (Tabela 1). Esta parece estar ligada a composição da toxina do isolado utilizado. McGaughey & Johnson (1994) realizam um estudo detalhado abordando a resistência para as toxinas individualmente após a seleção para resistência aos isolados *Bt kurstaki* (HD-1), *Bt aizawai* (HD-112 e 133) e *Bt entomocidus* (HD-198). Para *P. interpunctella*, HD-1 resultou em resistência para Cry1Ab e Cry1Ac, mas não para Cry1Aa, Cry1B, Cry1C e Cry2A. Resistência para HD-133 e HD-198 resultou em resistência a uma maior gama de toxinas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C e Cry2A. Os autores sugeriram que o espectro relativamente limitado de resistência às

diferentes toxinas em *Bt kurstaki* indicou que a resistência cruzada a outras subespécies era menos provável de ocorrer, portanto produtos baseados em *Bt kurstaki* deveriam ser utilizados primeiro. A resistência de *Heliothis virescens* é normalmente relatada à toxina Cry1Ac, porém existem relatos de resistência para outras toxinas como: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1F e Cry2A (Gould et al., 1992).

4. Manejo da Resistência

Os programas de manejo da resistência apresentam 3 objetivos principais: evitar, retardar e reverter a evolução da resistência (Croft, 1990). Estes objetivos são os mesmos para o manejo da resistência a produtos à base de *Bt* sendo muitas táticas baseadas nos princípios mostrados para plantas geneticamente modificadas. No caso das plantas *Bt* são preconizadas várias estratégias, tais como plantas com altas doses das toxinas associadas a áreas de refúgio, misturas de plantas com diferentes toxinas, mosaicos de plantas geneticamente modificadas, combinações de toxinas com diferentes modos de ação, ou a combinação de plantas expressando baixas doses das toxinas e controle complementar das pragas pelos inimigos naturais e a expressão das toxinas em determinados tecidos ou em um período de ataque mais intenso da praga (Neppl, 2000).

A estratégia empregada nos países com plantio de milho *Bt* onde as pragas apresentam hábito migratório dos adultos e alta mobilidade nas formas larvais tem sido a utilização de plantas expressando altas doses das toxinas associadas às áreas de refúgio. Esta tática começou a ser adotada baseando-se no princípio de que os insetos suscetíveis poderiam migrar para uma área com predominância de insetos resistentes e, por cruzamento, diluir os alelos de resistência na população da praga. Este princípio apenas é válido com a expressão das toxinas de *Bt* em altas doses de modo que a resis-

tência seja funcionalmente recessiva. Deste modo, apenas restariam na área com plantas geneticamente modificadas os indivíduos resistentes. O refúgio pode variar em tamanho e disposição e servir como reservatório de insetos suscetíveis. O sucesso desta estratégia depende das seguintes condições: que o acasalamento seja aleatório entre os indivíduos resistentes e suscetíveis, que os insetos suscetíveis migrem da área de refúgio para a área com as plantas geneticamente modificadas e exista sincronia na emergência de insetos entre as duas áreas.

Outra estratégia possível para a liberação de plantas geneticamente modificadas é a mistura de sementes transgênicas e convencionais na forma de linhas da cultura ou faixas de plantio. Uma área que utilize esta estratégia resulta numa mistura de plantas-*Bt* e convencionais. Deste modo, o refúgio de plantas convencionais seria disposto internamente na área com as plantas transgênicas. Este refúgio interno consistiria no reservatório de suscetibilidade para o fornecimento de indivíduos suscetíveis para acasalamento aleatório com os resistentes que restariam nas plantas geneticamente modificadas. A principal limitação deste método é a taxa de movimento entre plantas nas formas larvais da praga-alvo de controle. Esta tática é indicada para casos específicos nos quais a forma larval da praga que se encontra nas plantas convencionais não se disperse para plantas geneticamente modificadas resistentes causando a morte dos indivíduos suscetíveis.

A mistura de sementes na forma de linhas de plantio com sementes convencionais internamente à área de algodão *Bt* têm sido utilizada com sucesso no Arizona, EUA, para o manejo de lagarta rosada *Pectinophora gossypiella*. Neste caso, a lagarta rosada permanece dentro das maçãs atacadas o que limita o movimento das formas larvais desta espécie entre as plantas garantindo a sobrevivência dos indivíduos suscetíveis. Esta estraté-

gia não seria adequada para o manejo de *S. frugiperda* já que esta espécie apresenta alta mobilidade na sua larval. A técnica do plantio em forma de mosaico envolve áreas com plantas *Bt* expressando diferentes toxinas inseticidas. Deste modo, os insetos estariam sofrendo diferentes pressões de seleção ao longo da faixa de plantio de áreas geneticamente modificadas. No entanto, para que esta estratégia funcione é importante que não ocorra resistência cruzada entre as toxinas empregadas. Além disso, existem críticas quanto à possível eficiência das diferentes áreas *Bt* em atuarem como reservatórios de suscetibilidade recíprocos, o que possibilitaria a imigração de indivíduos suscetíveis entre as diferentes áreas para a diluição dos alelos de resistência.

Outra alternativa viável é a rotação de plantas dispondo diferentes toxinas inseticidas. Assim como no caso do mosaico, a resistência cruzada entre as toxinas pode comprometer a eficácia deste método. As bases teóricas na estratégia da rotação são que o custo adaptativo associado à resistência leva a redução da frequência dos indivíduos suscetíveis e a imigração de indivíduos suscetíveis. (Hoy, 1988).

A expressão da toxina de *Bt* em tecidos e estádio fenológicos adequados específicos é uma estratégia que visa diminuir a pressão de seleção das plantas-*Bt* sobre a população de insetos (Frutos et al., 1999). Esta estratégia é similar ao uso de áreas refúgio e mistura de sementes no sentido que a própria planta pode atuar como refúgio (Mallet & Porter, 1992). As plantas poderiam produzir as toxinas somente quando o nível de dano fosse alcançado ou em determinados tecidos mais propensos ao ataque. No entanto, esta estratégia não funcionaria para pragas que atacam todas as partes da planta. Além disso, esta tática é dependente de estudos avançados em biologia molecular a fim de se encontrar os promotores específicos que seriam responsáveis pelo direcionamento da expressão das toxinas inseticidas.

Embora estudos conduzidos em laboratório relatem a casos de resistência as toxinas de *Bt* e frequência inicial elevada de resistência, nos países que adotam a tecnologia de plantas *Bt* no manejo das pragas os programas de monitoramento não detectaram ainda aumento na frequência de resistência (Tabashnik et. al.,2003). Exemplos de programas de monitoramento estabelecidos e bem sucedidos incluem *O. nubilalis* (Estados Unidos – 6 anos), *P. gossypiella* (Arizona-5 anos), *Helicoverpa armigera* (Nordeste da China-3 anos) e *Helicoverpa zea* (Carolina do Norte-2 anos).

Assim, torna-se fundamental o desenvolvimento de programas de monitoramento como parte dos programas que visem manejar a evolução da resistência. Entretanto, as estratégias para o manejo da resistência somente obtêm o êxito esperado se forem adequadamente implementadas. É importante que o agricultor compreenda estas estratégias, além do monitoramento e assistência técnica para o sucesso destes programas (Neppl, 2000). Ainda são necessários estudos para otimizar os resultados obtidos com as estratégias de manejo da resistência, entre estes, destacam-se as pesquisas voltadas para os hábitos dos insetos (migração e acasalamento) que podem influenciar decisivamente na viabilidade das táticas empregadas. Dificilmente pode-se assegurar o êxito destes programas, pois em campo muitas variáveis são somadas aos modelos propostos e, atualmente, nenhuma das táticas acima descritas são completamente aceitáveis em termos de eficácia.

5. Considerações Finais

O uso das estratégias de manejo implica significativa demanda de mão-de-obra especializada, principalmente no sentido de monitorar a evolução da resistência em áreas cultivadas com plantas geneticamente modificadas expressando toxinas de *Bt*. Geralmente, a assistência técnica disponível aos agricultores limita-se a recomendação de insumos para viabilizar sua ati-

dade agrícola, de maneira que os extensionistas dificilmente atuam como agentes introdutórios de novas tecnologias e conhecedores do seu impacto sobre o meio onde atuam. Além de determinar o impacto das plantas transgênicas sobre o meio ambiente, é necessário também instruir e qualificar tanto o agricultor como o extensionista sobre o potencial desta moderna tática de controle de pragas. A implementação de estratégias de manejo de resistência e programas de monitoramento são fundamentais para a exploração sustentável da tecnologia das plantas *Bt*. Estas atividades são exigentes em mão-de-obra treinada e apoio logístico pelos produtores rurais, órgãos de assistência técnica, grupos de consultores envolvidos com a cultura e das empresas produtoras de sementes geneticamente modificadas.

Por fim, não é correto se pensar que as plantas geneticamente modificadas serão a alternativa definitiva para o controle de pragas. O sistema planta-inseto deve ser estudado e avaliada a relação custo x benefício da adoção destas plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos. Deve-se conhecer toda a gama de alternativas existentes e escolher aquela que melhor viabiliza a atividade agrícola, porém levando-se em conta o seu impacto sobre o meio ambiente em comparação às demais alternativas disponíveis para o controle de pragas.

6. Referências

Carlberg, G.; Lindstrom, R. Testing fly resistance to Thuringiense produced by *Bacillus thuringiensis*, serotype H-1. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.49, p.194-197, 1997.

Croft, Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. In: **Pesticide Resistance in Arthropods**. Roush, R. T.; Tabashnik, E. B. (Eds). New York: Chapman & Hall, 1990. p. 277-296.

Devriendt, M.; Martouret, D. Absence of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondblack

moth, *Plutella maculipennis* (Lep.: Hyponomeutidae). **Entomophaga**, v.21, p.189-199, 1976.

Ferré, J.; Real, M.D.; Van Rie, J.; Jansens, S.; Peferoen, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, v.88, p.5119-5123, 1991.

Frutos, R.; Rang, C.; Royer, M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p.227-276, 1999.

Georghiou, G.P.; Taylor, C.E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.70, p.653-658, 1977.

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

Gould, F.; Anderson, A.; Reylonds, A.; Bumgarner, L.; Moar, W.J. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.1445-1559, 1995.

Gould, F.; Martinez Ramirez, A.; Anderson, A.; Ferre, J.; Silva, F.J.; Moar, W.J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, v.89, p.7986-7990, 1992.

Groeters, F.R.; Tabashnik, B.E.; Finson, N.; Johnson, M.W. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondblack moth (*Plutella xylostella*). **Evolution**, v.48, p.197-201, 1994.

Harvey, T.L.; Howell, D.E. Resistance in the house fly to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.7, p.92-100, 1964.

Hoy, M. A.. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. **Philosophical Transactions of the**

Royal Society of London, v. 353, p.1787-95, 1998.

Huang, F.; Higgins, R.A.; Buschman, L.T. Baseline susceptibility and chances in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.1137-1143, 1997.

James, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2002, **ISAAA Briefs**, n. 27: Preview.

Johnson, D.E.; Brokhart, G.L.; Kramer, F.J.; Barnett, B.D.; MacGaughey, W.H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*: comparison of midgut proteases from susceptible and resistant larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.55, p.235-244, 1990.

Lee, M.K.; Rajamoran, F.; Gould, F.; Dean, D.H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A d-endotoxin in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3836-3842, 1995.

Leong, K.L.H.; Yoshimura, M.A.; Kaya, H.K. Low susceptibility of overwintering monarch butterflies to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Pan Pacific Entomology**, v.68, p.66-68, 1992.

Losey, J.E.; Rayor, L.S.; Carter, M.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, v.399, p.214, 1999.

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

MacGaughey, W.H.; Johnson, D. E. Influence of crystal composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross-resistance in Indianmeal moths (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, p.535-540, 1994.

MacGaughey, W.H.; Beeman, R.W. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.81, p.28-33, 1988.

Mallet, J.; Porter, P. Preventing insect adaptation to insect resistant crops: are seed mixtures or refugia the bests strategy? **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 250, p.165-169, 1992.

Neppl, C. C. **Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins**. B.A. Thesis. University of Chicago, 2000.

Oppert, B.; Kramer, K.J.; Johnson, D.; McGaughey, W.H. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.23473-23476, 1997.

Sims, S.R.; Stone, T.B. Genetic basis of tobacco budworm resistance to na engineered *Pseudomonas fluorescens* expressing the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.206-210, 1991.

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

Tabashnik, B.E. Delaying insect adaptation to transgenic plants: seed mixtures and refugia reconsidered. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 255, p.7-12, 1994.

Tabashnik, B.E.; Schwartz, J.M.; Finson, N.; Johnson, M.W. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.85, p.1046-1055, 1992.

Tabashnik, B.E.; Finson, N.; Groeters, R.; Moar, W. J.; Johnson, M.W.; Luo, K.; Adang, M.J. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, v.91, p.4120-4124, 1994.

Tabashnik, B.E. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, v.94, p.3488-3490, 1997.

Tabashnik, B.E.; Liu, Y.; Malvar, T.; Heckel, D.G.; Masson, L.; Ballester, V.; Granero, F.; Mensua, J.L.; Ferre, J. Global variation in the genetic and

biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, v.94, p.12780-12785, 1997.

Tabashnik, B.E.; Carriere, Y.; Dennehy, T.J.; Morin, S.; Sisterson, M.S.; Roush, R.T.; Shelton, A. M.; Zhao, J. Insect resistance to transgenic Bt crops: Lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, v.96, n.4, p.1031-1038, 2003.

Tang, J.D.; Gilboa, S.; Roush, R.T.; Shelton, A.M. Inheritance, stability, and lack-of-fitness costs of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.732-741, 1997.

Tilman, D.; Fargione, J.; Brian, W.; D'antonio, C.; Dobson, A.; Howarth, R.; Schindler, D.; Schlesinger, W. H.; Simberloff, D.; Swackhamer, D. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. **Science**, v.292, p. 281-284, 2001.

Van Frankenhuyzen, N.; Nystrom, C.W.; Tabashnik, B.E. Variation in tolerance to *Bacillus thuringiensis* among and within populations of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in Ontario. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.97-105, 1995.

Van Rie, J.; MacGaughey, W.H.; Johnson, D.E.; Barnett, B.D.; Van Mellaert, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v.247, p.72-74, 1990.

Van Rie, J.; Ferré, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. In: **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. (Charles, J.F.; Delécluse, A.; Nielsen-LeRoux, C. Eds). Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 219-236.

Wilson, B.H.; Burns, E.C. Induction of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a laboratory strain of house flies. **Journal of Economic Entomology**, v.61, p.1747-1748, 1968.