

RESISTÊNCIA DE INSETOS A PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS



Relevância da implantação de estratégias pró-ativas para o manejo da resistência

Samuel Martinelli

Engenheiro Agrônomo, M. S., Doutorando em Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
smartine@esalq.usp.br

Celso Omoto

Engenheiro Agrônomo, M. S., Pb. D., Professor da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo
celomoto@esalq.usp.br

Imagens cedidas pelos autores

1. Introdução

As plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos foram resultantes da combinação dos conhecimentos e avanços tecnológicos da engenharia genética e da moderna biotecnologia, e podem ser consideradas como uma tática adicional de controle em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) em diversos agroecossistemas. Neste contexto, tem sido crescente a utilização de plantas GM que possuem a inserção de genes que codificam a produção de toxinas com ação inseticida, os quais foram obtidos a partir da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*). Entretanto, a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos também inclui a possibilidade de uso de genes de outras espécies de plantas para produção de lectinas e inibidores de proteinases (Loc et al. 2002; Ceci et al. 2003), ou ainda a utilização de genes de animais para expressão de neurohormônios (Fitches et al. 2002) e inibidores enzimáticos (Cristeller et al. 2002). Além disso, outras estratégias moleculares alternativas estão sendo direcionadas para o melhor entendimento da base molecular dos mecanismos endógenos de resistência, os quais as plantas manifestam em resposta ao ataque de vários insetos herbívoros (Gatehouse 2002; Ferry 2004). Entretanto, a aplicação prática atual da biotecnologia de plantas na proteção de cultivos tem se concentrado no uso de plantas GM

resistentes a insetos como o algodão e o milho que expressam proteínas inseticidas de *Bt*.

As experiências com o uso de plantas GM resistentes a insetos têm permitido a identificação de benefícios diretos proporcionados por esta tecnologia aos agricultores e meio ambiente. Na China, o algodão *Bt* tem sido cultivado desde 1997 e atualmente responde por 50% da área total cultivada com algodão naquele país. O uso da tecnologia do algodão *Bt* proporcionou uma redução de 78.000 toneladas na quantidade de inseticidas utilizados em 2001, e em algumas províncias chinesas foi verificado uma redução de 20 para 7 aplicações de inseticidas por safra de algodão (Wu et al. 2005). Conseqüentemente, houve o registro de diminuição em até 75% nos casos de intoxicação de produtores rurais por inseticidas (Pray et al. 2002; Toenniessen et al. 2003; Hossain et al. 2004). Além disso, na região Noroeste da China foi observada a reversão do quadro de resistência a inseticidas como lambda-cialotrina (piretróide) e endosulfan (ciclodieno), o qual já se encontrava previamente instalado e documentado naquela região (Wu et al. 2005). Na África do Sul o algodão *Bt* tem auxiliado os agricultores na implantação de programas de MIP, o que também tem resultado nas reduções de uso de inseticidas, índices de intoxicação de trabalhadores por defensivos, e custo de produção da cultura (Thirtle et. 2003). Entretanto, a redução no uso de inseticidas promovida pelo uso de plantas GM

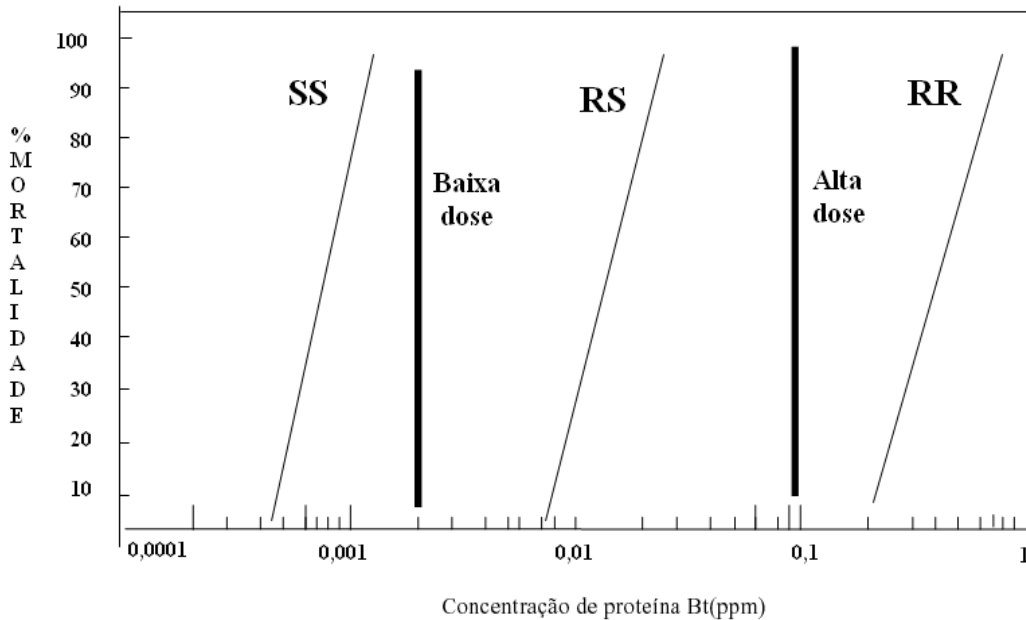


Figura 1. Respostas de indivíduos homocigotos suscetíveis (SS), resistentes (RR) e heterocigotos (RS) mediante uso de baixa dose e alta dose (Modificado de Gould, 1998)

resistentes apresenta repercussões positivas em outros aspectos relacionados à obtenção, distribuição e uso destes defensivos agrícolas. Por exemplo, foi observada a diminuição na taxa de exploração de matérias primas utilizadas na fabricação de inseticidas, e por conseqüência reduções significativas na poluição provocada por rejeitos industriais, além de reduções nos custos empresariais e ambientais decorrentes do transporte e armazenamento de inseticidas. Por fim, as plantas GM resistentes a insetos colaboram para que se diminua a produção e o acúmulo de embalagens de agrotóxicos, as quais muitas vezes não possuem um destino seguro no meio ambiente.

Todavia, devido à expressão contínua das toxinas inseticidas ao longo do período de desenvolvimento, as plantas *Bt* exercem uma elevada pressão de seleção sobre as populações de insetos praga que são alvos do controle. Assim, a preservação da suscetibilidade nas populações de insetos a toxinas presentes nas culturas *Bt* está dependente da adoção de programas adequados de liberação e manejo destas plantas no ambiente. Estas medidas têm o objetivo de retardar ao máximo a evolução da resistência nos insetos a toxi-

nas de *B. thuringiensis*. Com a evolução da resistência, existe a possibilidade de perda desta tecnologia no MIP. Além disso, existe a chance de que ocorram restrições ao uso de biopesticidas formulados à base de *Bt* e o aumento no uso de inseticidas sintéticos no controle de pragas. Este acréscimo no uso de inseticidas representaria um retrocesso no desenvolvimento e emprego de práticas agrícolas compatíveis com a preservação do meio ambiente e dos recursos naturais. Deste modo, diante dos benefícios ao meio ambiente e das conseqüências associadas ao desenvolvimento da resistência, a normatização do processo de registro, liberação e manejo das plantas GM tem sido regulamentada por órgãos de proteção ambiental. Por exemplo, nos EUA a Agência de Proteção Ambiental (EPA) monitora de modo bastante programático a regulamentação e a situação dos plantios de plantas GM.

Até o momento não há nenhum relato de evolução de resistência de qualquer praga às toxinas de *Bt* no campo a partir da exposição a plantas GM resistentes a insetos. Em diferentes países, os resultados das estratégias de manejo da resistência podem ser conferidos nos dados de programas de monitoramento da

suscetibilidade de populações de insetos praga às proteínas inseticidas de *Bt*. Com base nestes estudos, pode-se dizer que no período de 1995-2003 não foi registrado aumento na freqüência de resistência às toxinas inseticidas provocada pela exposição às culturas *Bt* comercialmente utilizadas (Tabashnik et al. 2003; Bourguet 2004; Carrière et al. 2005).

Diante do exposto, pode-se concluir que a adoção da tecnologia de plantas GM em programas de MIP exige o estabelecimento de estratégias para o manejo

pró-ativo da resistência de insetos. O manejo da resistência de insetos pode ser definido como o conjunto de práticas que devem ser adotadas com o objetivo de reduzir o potencial para a evolução da resistência na população da praga. Neste sentido, programas de monitoramento da suscetibilidade das pragas-alvo são indispensáveis para que se acompanhe o desempenho das estratégias de manejo para o retardamento da evolução da resistência.

2. Potencial para Evolução da Resistência a Toxinas de *Bacillus thuringiensis* em Plantas GM

A bactéria *B. thuringiensis* é um microrganismo de solo, gram-positiva, que foi inicialmente isolada no Japão por Ishiwata e descrita por Berliner em 1915. Este patógeno apresenta a capacidade de formar cristais contendo endotoxinas, as quais são proteínas com ação inseticida, durante a fase de esporulação do seu ciclo de desenvolvimento. No entanto, sabe-se que proteínas inseticidas da fase vegetativa (VIP) também são produzidas antes da esporulação.

Os cristais de diferentes linhagens de *Bt* podem conter uma série

Tabela 1 - Sobrevivência de linhagens de insetos selecionadas em laboratório em plantas *Bt* comercialmente cultivadas (Modificado de Tabashnik et al., 2003)

Cultua <i>Bt</i>	Toxina de <i>Bt</i>	Inseto	Linhagem	RR ^a	Sobrevivência na cultura <i>Bt</i> (%) ^b	Referência
Milho	Cry1Ab ou Cry1Ac	<i>O. nubilalis</i>	KS-Sc	70	0	Huang et al., 2002
Algodão	Cry1Ac	<i>H. armigera</i>	Cry1Ac-sel	13	25	Fan et al., 2000
			BX	57	58	Akhurst et al., 2003
			<i>H. virescens</i>	YDHD2	10.000	0
		<i>P. gossipyella</i>	AZP-R	3.100	45	Morin et al., 2003
			APHIS-96-R	> 100	37	Liu et al., 1999
Batata	Cry3A	<i>L. decemlineata</i>	Bt-R	> 400	0	Wierenga et al., 1996

^a RR (Razão de Resistência) = CL₅₀ da linhagem resistente / CL₅₀ da linhagem suscetível

^b (Sobrevivência na cultura *Bt* / Sobrevivência numa variedade não *Bt* da mesma cultura) X 100. Para as linhagens YDHD2 a sobrevivência foi 0% no algodão *Bt* e no algodão não *Bt*.

de diferentes proteínas que possuem ação inseticida (ICP) as quais são tóxicas para diferentes grupos de insetos. Entre estas toxinas destacam-se as conhecidas proteínas Cry ou δ -endotoxinas. Entretanto, o histórico de uso de *B. thuringiensis* no controle de pragas não é recente, pois na França já no fim de 1930 foi comercializado o Sporeine, o qual era um produto formulado à base de *Bt*. Segundo EPA, existiam 182 produtos registrados à base de *Bt* em 1995. Todavia, devido à baixa estabilidade em condições de campo, baixa eficiência no controle de espécies de insetos consideradas crípticas e reduzido espectro de ação (Ferré & Van Rie 2002), até 1999 menos de 2% do total comercializado em inseticidas podia ser atribuído a vendas de produtos à base de *Bt*. Em 1987, pela primeira vez genes de *Bt* responsáveis pela produção de proteínas inseticidas foram introduzidos e expressos em plantas de fumo. Após alguns anos os cientistas obtiveram plantas que expressavam de modo efetivo os genes de *Bt*. Deste modo, em 1996 tornou-se possível a utilização comercial de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos as quais eram eficientes no controle de pragas. Entretanto, o potencial de evolução de resistência

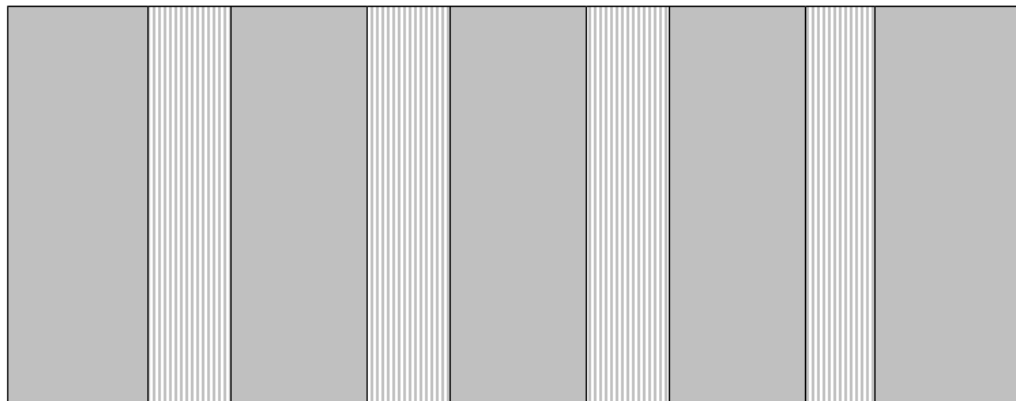
de populações de insetos às toxinas de *Bt* é uma das principais ameaças e limitações ao emprego sustentável de plantas geneticamente modificadas para o controle de pragas agrícolas.

Em condições de campo, têm-se relatos da resistência da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), para biopesticidas formulados à base de *Bt*. Neste caso, foram detectados altos níveis de resistência à toxina Cry1Ab em populações de *P. xylostella* originárias das Filipinas, Havaí, Flórida e Ásia (Tabashnik 1990, 1994). Na população da praga coletada no Havaí foi também detectada resistência cruzada entre as toxinas Cry1Ab e Cry1F. Este foi o primeiro e até o momento ainda representa o único caso de resistência de insetos a biopesticidas formulados à base de *Bt* em condições de campo (Ferré & Van Rie 2002).

Por outro lado, há vários casos caracterizados de evolução da resistência de insetos a toxinas de *Bt* em condições de laboratório (Tabela 1). No entanto, a capacidade das linhagens resistentes em sobreviver à exposição a proteínas ou formulações de *Bt* em dieta artificial ou em bioensaios com folhas contaminadas não garante necessariamente a so-

brevivência das larvas sobre as plantas *Bt* (Tabela 1) Existem algumas hipóteses que podem nos auxiliar no entendimento destes resultados. Por exemplo, a maior exposição dos insetos às toxinas em testes nos quais se utiliza diretamente as plantas *Bt*, ou a presença de concentrações mais elevadas das toxinas nas plantas GM. Além disso, são também consideradas as possíveis interações de componentes químicos da planta e as toxinas de *Bt*, e a produção da forma ativa da toxina inseticida ao invés da protoxina. Vale lembrar que a protoxina é a forma não ativada das δ -endotoxinas, e que tem sido o agente de mortalidade muitas vezes testado nos bioensaios em condições de laboratório. Por último, há ainda a hipótese de que diferenças no conjunto de toxinas produzidas pelas plantas em comparação àquelas testadas no ambiente de laboratório poderiam ser responsáveis pela diminuição da sobrevivência das linhagens resistentes de insetos quando expostas às plantas *Bt*.

As toxinas Cry ou δ -endotoxinas possuem um mecanismo de ação que envolve uma série de etapas intimamente relacionadas com a ingestão dos cristais protéicos que são digeridos e solubilizados em faixas específicas de pH do intestino



Área com plantas Bt



Área com plantas não Bt



Figura 2. Disposição esquemática da área de refúgio na forma de faixas alternadas de plantas geneticamente modificadas e plantas convencionais. As dimensões das áreas a serem intercaladas deverão ser determinadas em função da bioecologia da praga alvo.

médio dos insetos e com a posterior liberação das protoxinas. As protoxinas são processadas por proteases do intestino médio dos insetos, originando um fragmento resistente a ação de proteases que, por sua vez, é considerado a toxina inseticida na sua forma ativada. A toxina atravessa então a membrana peritrófica e liga-se a receptores específicos localizados na membrana ciliada das células do intestino médio. A ligação que é seguida do encaixe parcial das toxinas na membrana leva à formação de poros, lise celular e eventualmente à morte do inseto por inanição ou septicemia. (Ferre & Van Rie 2002). Por exemplo, os insetos da ordem Lepidoptera são particularmente sensíveis a proteínas Cry1. A solubilização do cristal protéico libera a protoxina de peso molecular de 130-KDa, a qual é ativada por proteases no intestino médio, o que origina a forma truncada e ativa da proteína inseticida a qual tem por alvo a membrana ciliada das células do intestino médio (Bravo et al. 1992). A ligação da proteína inseticida nos receptores específicos do intestino médio provoca a alteração na conformação da toxina, o que permite a inserção de canais de íons ou poros na membrana ciliada que acarretam o desequilíbrio iônico no intestino médio do inseto (Gill et al. 1992). Entretanto, admite-se que com produção pelas plantas GM das toxi-

nas de *Bt* na sua forma ativa, existe uma limitação nas possibilidades de alterações nas etapas que compreendem o mecanismo de ação das proteínas de *Bt*. Isto porque nesta condição há uma sensível redução no número de pontos na rota de ação destas proteínas, os quais poderiam ser alterados conferindo resistência a insetos (Gould 1998).

Os estudos com relação a mecanismos de resistência a proteínas inseticidas de *Bt* têm sido bastante explorados pelo menos nos últimos 10 anos. Até o momento, foram identificados receptores da toxina Cry1 pertencentes a família das caderinas e aminopeptidases N (Darboux et al. 2002). O envolvimento de caderinas na resistência de proteínas Cry1Ab já foi observada em larvas de *Manduca sexta* (Vadilamudi et al. 1993; 1995) e *Ostrinia nubilalis* (Flanagan et al. 2005). Por sua vez, o envolvimento de caderinas e à toxina Cry1Ac já foi verificado em *Heliothis virescens* (Gahan et al. 2001) e *Pectinophora gossypiella* (Morin et al. 2003). Além disso, já foram identificados outros mecanismos de resistência de insetos a toxinas de *Bt*, como, por exemplo, alterações na atividade proteolítica de extratos do intestino médio que afetam o processo de ativação das protoxinas (Oppert 1999; Huang et al. 1999; Li et al. 2005) e inclusive a reposição de células danificadas do intestino mé-

dio dos insetos pela ação de células tronco (Martinez-Ramirez & Real 1999). Recentemente, foi reportada a evidência de uma associação entre resistência a toxinas de *Bt* e o aumento da resposta do sistema imunológico de *Ephestia kuebniella* (Rahaman et al. 2004) e *Helicoverpa armigera* (Ma et al. 2005).

Todavia, a taxa de evolução da resistência é afetada por uma série de fatores genéti-

cos e bioecológicos da praga alvo de controle, além dos fatores operacionais vinculados às características intrínsecas das plantas GM, ao sistema de rotação ou sucessão de culturas e às estratégias de uso e liberação das dessas plantas GM. A seguir serão apresentados os principais pontos para a compreensão da evolução da resistência de insetos a plantas GM.

2.1. Herança da Resistência e Mortalidade de Heterozigotos

A resistência de insetos a inseticidas e a toxinas *Bt* caracteriza-se por ser pré-adaptativa. O conhecimento do padrão de herança da resistência permite a avaliação do potencial risco de evolução no campo. Por exemplo, situações em que a herança da resistência é recessiva, o resultado final é uma baixa sobrevivência dos indivíduos heterozigotos porque estes se comportariam fenotipicamente como homozigotos suscetíveis. Por outro lado, a dominância da resistência resultaria numa alta sobrevivência dos indivíduos heterozigotos no campo, os quais se comportariam fenotipicamente como homozigotos resistentes. Assim, a mortalidade dos heterozigotos é um dos pontos fundamentais no manejo da resistência, já que de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, os insetos de genótipo heterozigoto são, princi-





Área com plantas Bt 
 Área com plantas não Bt 

Figura 3. Disposição esquemática da área de refúgio na forma áreas adjacentes de plantas geneticamente modificadas e plantas convencionais. As dimensões das áreas adjacentes e distâncias máximas entre estas áreas também deverão ser determinadas em função da capacidade de dispersão da praga alvo.

palmente no início do processo de seleção, os principais carregadores dos alelos de resistência. Portanto, uma das estratégias para retardar a evolução da resistência tem sido a expressão da toxina em altas concentrações na planta GM para garantir uma elevada mortalidade de heterozigotos. A premissa básica para o sucesso desta estratégia é a recessividade do caráter resistência.

2.2. Aspectos Bioecológicos da Praga-Alvo

O conhecimento da bioecologia da praga alvo de controle da planta GM é fundamental para a elaboração e refinamento das estratégias de manejo da resistência de insetos a toxinas das plantas GM. Deste modo, a passo inicial é a correta definição de quais pragas serão o alvo do controle proporcionado por determinada planta GM resistente a insetos. Em seguida, deve ser levantada uma série de aspectos básicos da bioecologia do inseto por meio da revisão da literatura e de experimentos específicos. Estas pesquisas, quando conduzidas de modo correto, podem aumentar a confiabilidade nas estratégias de manejo e a capacidade efetiva de

que seja retardada a evolução da resistência. Os aspectos bioecológicos relevantes na composição das estratégias de manejo da resistência envolvem, por exemplo, o conhecimento da faixa efetiva de movimento das larvas da praga entre as plantas da cultura, assim como a capacidade de dispersão dos adultos. Não obstante, devem ser reunidas informações sobre o hábito alimentar e a efetividade com que hospedeiros alternativos são utilizados pela praga para a alimentação e ou para abrigo. Neste aspecto, é de grande importância a obtenção de dados da utilização não apenas dos hospedeiros cultivados, mas também, das plantas hospedeiras selvagens. De modo adicional, esforços devem ser direcionados para a compreensão do comportamento de cópula e oviposição dos insetos (Gould 1998). Por sua vez, também deve ser considerada a variedade de sistemas de produção em que a cultura GM será utilizada e as particularidades locais e regionais devem ser consideradas por afetarem diretamente aspectos como a dinâmica populacional da praga.

No estado do Arizona (EUA), a área de algodão transgênico entre

1997 e 1999 representou mais de 50% da área total plantada com algodão. Deste modo, a alta pressão de seleção exercida pelas plantas transgênicas e a ausência de hospedeiros alternativos aumentará consideravelmente a probabilidade de evolução de resistência em populações de lagarta rosada (*P. gossypiella*) à toxina Cry1Ac (Carrière et al. 2001).

No Brasil um bom exemplo destas relações que envolvem os insetos-praga e as plantas cultivadas é o plantio das culturas de algodão e milho em áreas adjacentes ou em sucessão de culturas. As culturas de algodão e milho apresentam insetos pragas em comum, destacando-se *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Certamente, haverá um impacto deste padrão de exploração da atividade agrícola sobre o delineamento das estratégias de manejo da resistência de *S. frugiperda* a toxinas presentes em plantas GM resistentes a insetos.

2.3. Dose e Número de Toxinas Inseticidas Expressas na Planta GM

A dose e o número de toxinas utilizadas no controle de insetos influem diretamente na mortalidade dos indivíduos heterozigotos e na probabilidade de que sejam selecionados indivíduos resistentes. Como mencionado anteriormente, a mortalidade de insetos heterozigotos é um dos pontos mais importantes que devem ser considerados na tentativa de se retardar a evolução da resistência. A utilização de altas doses para o manejo da resistência a inseticidas sempre foi limitada por problemas práticos. Por exemplo, o aumento da dose de um inseticida torna o controle químico ainda mais caro e impraticável comercialmente. Além disso, o uso de altas doses pode acarretar elevada mortalidade de agentes de controle biológico e insetos não-alvos de controle contrariando os fundamentos do MIP, além de colocar em risco a saúde de trabalhadores rurais e dos consumidores pela elevação do nível de resíduos químicos nos alimentos.

Entretanto, a expressão de

toxinas inseticidas de *Bt* nas plantas GM tornou possível a utilização de altas doses como parte integrante do manejo da resistência. Considera-se como alta dose, a expressão de toxinas inseticidas de *Bt* em doses 25x superiores para matar 99% de uma população da praga suscetível de referência (U.S. EPA/USDA 1999). Porém, ainda não existe consenso sobre os limites de mortalidade na população de insetos para que uma planta GM seja considerada como capaz de proporcionar o efeito de alta dose da toxina inseticida na praga alvo de controle.

Com relação ao binômio dose da toxina e mortalidade da praga alvo de controle, as diferenças existentes na eficiência do controle entre os diferentes eventos de milho e algodão *Bt*, a avaliação da atividade inseticida da planta *Bt* ao longo do seu desenvolvimento e a expressão de toxinas inseticidas nos diferentes tecidos vegetais, são pontos importantíssimos e que devem ser rigorosamente avaliados diante da elaboração de programas para o manejo da resistência de insetos a plantas GM.

Como exemplo, tem-se o complexo de pragas que ataca a cultura do algodão na Austrália. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga importante em algumas culturas na Ásia atacando também a cultura do algodão na Austrália. No entanto, a toxina inseticida Cry1Ac, expressa no algodão *Bt* Ingard®, é cerca de 30 vezes menos tóxica para *H. armigera* do que para *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) que tem sido a praga alvo nos EUA. Resultados de pesquisa mostram que a atividade inseticida nas plantas do algodão *Bt* Ingard diminui com a maturação das plantas e alguns indivíduos de *H. armigera* são capazes de completar seu desenvolvimento nas fases mais tardias da cultura. Esta sobrevivência diferencial dos insetos deve ser entendida como parte de um processo de seleção e apresenta-se como um sério risco para a sustentabilidade desta tecnologia por facilitar o desenvolvimento da resistência na população da praga.

Nos EUA por sua vez são comercializados híbridos de milho *Bt*

apresentando a expressão da toxina Cry1Ab os quais são registrados para o controle de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). Estudos mostram que estes eventos de milho *Bt* apresentam mais de 90% de controle das infestações iniciais de *O. nubilalis*. No entanto, existem diferença entre os eventos de milho *Bt* que expressam a toxina Cry1Ab em seus tecidos com relação no nível de controle das infestações de *O. nubilalis* que ocorrem próximas ao final do período de desenvolvimento das plantas de milho. Por exemplo, os híbridos de milho contendo o evento 176 expressam grandes quantidades da proteína inseticidas Cry1Ab nos tecidos verdes e nos grãos de pólen, porém baixos níveis nos tecidos reprodutivos (Kozziel et al. 1993). Além disso, pesquisas mostraram que o evento 176 apresenta redução na expressão da toxina inseticida no tecido verde próximo a senescência das plantas (Fearing et al. 1997; Ostlie et al. 1997). Siegfried et al. (2001) verificaram a sobrevivência e danos causados pela segunda geração de *O. nubilalis* nas espigas de milho. Foi observado que as lagartas que sobreviveram quando presentes nas plantas *Bt* haviam sido expostas a doses subletais de Cry1Ab. Portanto, há alta probabilidade de ocorrência de aumento da pressão de seleção para a resistência. Isso porque nestas situações a concentração de toxina inseticida presente nas plantas era menor que a necessária para matar os indivíduos heterozigotos. Deste modo, o evento de milho *Bt* 176 foi retirado do mercado norte-americano por representar um risco considerável à rápida evolução da resistência à toxina Cry1Ab. Como discutido anteriormente, a mortalidade de heterozigotos é um dos pontos críticos no sucesso das estratégias de manejo da resistência a plantas GM. Admitindo-se uma planta de algodão ou milho *Bt* que não atenda às premissas da definição de alta dose, os insetos heterozigotos poderiam sobreviver na área *Bt* e aumentarem a frequência dos genes de resistência na população.

Apesar da estratégia de alta dose

e adoção de áreas de refúgio ser uma das mais utilizadas e com excelentes resultados principalmente nos EUA, o manejo da resistência pode também ser elaborado para plantas GM que expressão em seus tecidos as toxinas inseticidas em baixa dose. Entretanto, por não atingir a alta dose, estas plantas poderiam permitir a seleção e conseqüentemente a sobrevivência de indivíduos parcialmente resistentes (ex: insetos heterozigotos com apenas um alelo de resistência) e, portanto, levando ao aumento da frequência de resistência na população da praga. Assim, as plantas GM expressando toxinas de *Bt* em baixa dose podem representar um risco considerável para a sustentabilidade de culturas GM quando comparadas à expressão em alta dose, caso os agentes de controle natural da praga não atuem de modo sinérgico com as plantas GM.

3. Estratégias para o Manejo da Resistência a Toxinas em Plantas GM

Os programas de manejo da resistência apresentam os objetivos principais de evitar, retardar, ou mesmo, reverter a evolução da resistência. As estratégias para o manejo da resistência de insetos praga a plantas *Bt* podem ser divididas nas seguintes categorias:

* Uso de plantas com altas doses das toxinas *Bt* juntamente com plantio de áreas de refúgio

* Uso de plantas com mais de um gene de *Bt*

* Uso simultâneo de diferentes toxinas de *Bt* em diversos híbridos ou variedades comerciais de plantas GM

* Uso de plantas com baixo nível de expressão dos genes responsáveis pela produção das toxinas inseticidas

* Uso de plantas com expressão dos genes *Bt* direcionada para determinados tecidos ou estádios fenológicos

3.1. Alta Dose e Áreas de Refúgio

Esta estratégia baseia-se na utilização de plantas geneticamente

modificadas que expressam toxinas de *Bt* em altas doses nos seus tecidos e o plantio e manutenção de áreas de refúgio. A obtenção de plantas *Bt* com altas doses de toxinas nos tecidos apenas tornou-se uma alternativa no manejo da resistência no início da década de 90. Nesta época, foi demonstrado que a partir de alterações específicas na seqüência de DNA dos genes de *Bt* foi possível obter aumentos significativos na produção e acúmulo de toxinas inseticidas nos tecidos da planta GM. Desde modo, em teoria restariam nas áreas cultivadas com as plantas *Bt* apenas uma pequena quantidade de insetos heterozigotos, além dos indivíduos homozigotos resistentes que são bastante raros no início da evolução da resistência. Por esta razão, pode-se dizer que as plantas *Bt* com altas doses das proteínas inseticidas permitem que a resistência seja considerada funcionalmente recessiva (Figura 1). Nos EUA todos os híbridos de milho *Bt* disponíveis ao agricultor expressam as toxinas inseticidas em alta dose para o controle de *O. nubilalis*. Já no caso do algodão *Bt*, os cultivares disponíveis provavelmente produzem o efeito de alta dose para *H. virescens* e *P. gossypiella*, enquanto que nenhum dos eventos disponíveis atinge os requerimentos de alta dose no controle de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae).

Por sua vez, as áreas de refúgio devem ser suficientemente atrativas para a oviposição da praga alvo do controle, e deste modo servirem como um reservatório de insetos suscetíveis. Para que a estratégia da alta dose e áreas de refúgios funcione, os insetos da área de refúgio devem migrar para a área cultivada com plantas *Bt*. Por consequência, se a frequência inicial do alelo de resistência for baixa tem-se que a maioria dos insetos será homozigoto suscetível. Logo, espera-se que os raros indivíduos homozigotos resistentes acabem na maioria das vezes por acasalar com indivíduos homozigotos suscetíveis advindos das áreas de refúgio. Portanto, a geração subsequente será composta novamente em sua maioria por indivíduos

os heterozigotos que serão suscetíveis devido à expressão das toxinas de *Bt* em alta dose. Para que a área de refúgio funcione de modo efetivo, admite-se que o número de insetos homozigotos suscetíveis deva ultrapassar a soma do número de heterozigotos e homozigotos resistentes em uma proporção maior ou igual a 500:1 (EPA 1998).

Entretanto, o sucesso da estratégia da alta dose associada a áreas de refúgio depende da satisfação de uma série de premissas envolvendo questões operacionais da plantas GM e bioecológicas da praga alvo do controle, tais como:

- * As plantas devem produzir as toxinas inseticidas em doses 25x o necessário para matar 99% dos insetos suscetíveis.

- * A frequência inicial dos genes de resistência deve ser baixa

- * O padrão de herança da resistência deve ser recessivo

- * O acasalamento deve ser aleatório entre os indivíduos homozigotos resistentes e suscetíveis.

- * O refúgio deve estar localizado de modo a assegurar o acasalamento aleatório entre os insetos presentes nas áreas com plantas GM e na área de refúgio.

- * Deve haver sincronia na emergência de insetos adultos entre as duas áreas. Possíveis diferenças no tempo de desenvolvimento podem comprometer o acasalamento aleatório entre os indivíduos resistentes e os suscetíveis.

A disposição das áreas de refúgio é um dos pontos de grande discussão para o manejo da resistência. As possibilidades envolvem a disposição do refúgio internamente à área *Bt* na forma de faixas de plantio (Figura 2), ou estruturado externamente às áreas de plantas *Bt* (Figura 3), ou ainda através da mistura de sementes GM e convencionais. Deve-se salientar que a disposição do refúgio está intimamente relacionada com a bioecologia da praga alvo de controle da planta *Bt*. Nas espécies de insetos nas quais as larvas não se dispersam entre as plan-

tas no campo, a utilização de mistura de sementes ou linhas de plantio de plantas GM e convencionais seria a forma ideal de disposição de refúgio. Neste caso, é possível se assegurar que a cultura GM possui uma área de refúgio com desenvolvimento fenológico e práticas adicionais aplicadas para controle de pragas seriam exatamente as mesmas nas plantas GM e nas convencionais. Este tipo de disposição para a área de refúgio vem sendo empregado na cultura do algodão *Bt* no Arizona, onde a lagarta rosada, *P. gossypiella*, é a praga alvo de controle. As larvas de *P. gossypiella* apresentam movimento limitado entre plantas de algodão e a dispersão de adultos também é restrita. Além disso, este inseto apresenta uma faixa limitada de plantas hospedeiras. Neste caso, com base em informações sobre a bioecologia de *P. gossypiella*, recomenda-se o plantio de 1 linha de algodão não *Bt* a cada 6 linhas da cultura *Bt*. No entanto, há casos nos quais as larvas se dispersam entre as plantas e acabam por alimentar-se nos diferentes hospedeiros presentes no campo. Nestas situações, a alta mobilidade das formas larvais reduziria a proporção de indivíduos que se desenvolveriam no refúgio. Isso porque indivíduos suscetíveis que se encontram nas plantas convencionais poderiam se dispersar para plantas *Bt* e serem controladas pelas toxinas inseticidas. Além disso, larvas de genótipo heterozigoto que seriam mortas enquanto neonatas poderiam sobreviver ao mover-se para plantas *Bt* em um estágio larval mais desenvolvido. Desta maneira, nas situações em que a praga alvo do controle apresenta nas larvas uma elevada taxa de dispersão entre plantas, tem-se recomendado a adoção de modo preferencial de um refúgio estruturado posicionado externamente à área *Bt*. As áreas destinadas a refúgio devem ser localizadas para otimizar o acasalamento aleatório entre os insetos suscetíveis da área de refúgio e os possíveis resistentes que sobrevivem na área *Bt*. Portanto, a localização da área de refúgio externa é definida em função de informações básicas sobre o movimento dos inse-

tos adultos juntamente com o comportamento reprodutivo e de oviposição da praga.

3.2. Plantas Expressando Duas ou Mais Toxinas de *Bt* - Pirâmides de Genes

A pirâmide de genes é uma das opções dos agricultores para o manejo da resistência de insetos a toxinas de *Bt* (Ferré & Van Rie 2002). Consiste no cultivo de uma planta geneticamente modificada contendo genes que codificam duas ou mais proteínas com ação inseticida. Este tipo de estratégia envolvendo a mistura de agentes de mortalidade pode ser classificado dentro do conjunto de medidas para manejo da resistência pertencentes à clássica estratégia de ataque múltiplo. Por sua vez, as proteínas inseticidas produzidas nestas plantas GM devem ser suficientemente distintas bioquimicamente e com baixo potencial para resistência cruzada. Um bom exemplo da expressão conjunta de duas proteínas inseticidas na mesma planta é o algodão *Bt* de marca registrada Bollgard® II comercializado nos EUA e na Austrália. Estas plantas expressam as toxinas Cry1Ac e Cry2Ab2 as quais possuem mecanismos de ação distintos (Crickmore et al. 1998). Além disso, plantas de algodão combinando as proteínas Cry2Ab2 e Cry1Ac foram capazes de controlar de modo eficiente insetos resistentes à toxina Cry1Ac (Tabashnik et al. 2002). Diversos estudos de simulação com uso modelos matemáticos têm demonstrado que a incorporação de duas toxinas na mesma planta é uma estratégia que permite uma maior durabilidade da tecnologia comparada à liberação sequencial de plantas GM contendo uma toxina, com possibilidades de redução do tamanho das áreas de refúgio (Roush 1998). No entanto, o uso de uma planta GM com duas ou mais proteínas inseticidas deve ser integrada a outras estratégias de manejo da resistência como a manutenção de áreas de refúgio para promover a sustentabilidade do uso das plantas GM.

3.3. Dispor Diferentes Toxinas

em Diferentes Variedades

A disposição de diferentes toxinas em híbridos de uma cultura por companhias concorrentes parece ser um dos prováveis cenários a partir da liberação para o plantio de plantas GM resistentes a insetos. Este padrão de uso levaria à formação de mosaicos mediante a adoção de diferentes plantas GM pelos agricultores. Entretanto, deve-se atentar para o fato de que numa formação de mosaicos, as diferentes áreas com plantas GM não funcionariam como refúgio em comum. Isto não é possível visto que dependendo do nível de expressão das toxinas, não haveria a produção suficiente de insetos suscetíveis em nenhuma destas áreas. Mesmo com plantio de áreas de refúgio, o sistema em mosaico apenas estaria simultaneamente selecionado para a resistência a cada uma das toxinas.

3.4. Uso Plantas com Baixa Dose das Toxinas Inseticidas

A utilização de doses moderadas das toxinas inseticidas é também uma possível estratégia para o manejo da resistência às plantas GM. Neste caso, espera-se a ação conjunta das plantas *Bt* e de inimigos naturais resulte em sucesso no controle de pragas. Entretanto, modelos genéticos mostram que o uso da baixa dose associada ao controle proporcionado por inimigos naturais pode diminuir, aumentar ou não afetar a taxa de incremento na frequência de resistência (Gould 1998). Pesquisas têm mostrado que o resultado desta associação depende dos detalhes envolvidos nas interações ecológicas entre a praga e os inimigos naturais (Johnson & Gould 1992; Johnson 1997; Johnson et al. 1997).

3.5. Expressão Direcionada das Toxinas Inseticidas

Esta estratégia baseia-se na expressão das toxinas inseticidas de modo não constitutivo. Assim, as possibilidades envolvem o uso de promotores que direcionem a expressão das toxinas em um determinado tecido ou estrutura vegetal, ou ainda regulem a produção das proteínas inseticidas em determinados

períodos do ciclo fenológico que são críticos para a proteção da planta. Entretanto, existe há necessidade de que estudos básicos de genética molecular sejam conduzidos para a detecção destas regiões promotoras.

4. O Monitoramento da Resistência às Toxinas de *Bt*

O monitoramento para a verificação de alterações na suscetibilidade dos insetos alvos de controle às toxinas de *Bt* é uma das partes mais importantes dos programas pró-ativos de manejo da resistência de insetos a plantas GM. Através deste tipo de monitoramento, tem sido possível não apenas se avaliar a resultado das estratégias de manejo implementadas em retardar a evolução da resistência e garantir a eficiência das plantas *Bt* no controle de pragas, mas também validar muitos dos parâmetros biológicos utilizados em modelos matemáticos. O passo inicial para os trabalhos de monitoramento é o estabelecimento da resposta natural de populações geograficamente distintas da praga às toxinas de *Bt* através do estabelecimento das linhas básicas de suscetibilidade antes da liberação das culturas GM no campo. Na seqüência deve ser realizado o acompanhamento sistemático da suscetibilidade dos insetos nestas regiões preferencialmente mediante o uso de concentrações diagnósticas ou discriminatórias. No contexto prático, o uso de bioensaios utilizando-se concentrações diagnósticas é o método corrente recomendado pela EPA no monitoramento da suscetibilidade de populações de insetos às toxinas de *Bt* nos EUA. Admite-se que estes bioensaios seriam eficientes para detectar a resistência quando a frequência dos alelos de resistência atingir 1%, o qual é um valor próximo do momento em que são observadas falhas no controle de pragas. (U.S. EPA/USDA 1999). A chance de se detectar larvas resistentes numa cultura *Bt* é função da pressão de seleção exercida sobre a praga, da frequência inicial dos indivíduos resistentes, e do número de amostras

coletadas. Por sua vez o monitoramento através do uso da técnica de "F₂ Screen" é particularmente interessante para a detecção de alelos recessivos raros na população de insetos. Através desta técnica é possível a detecção de alterações na suscetibilidade das populações de insetos a partir de um número menor de insetos coletados no campo. Admite-se que este método apresenta uma sensibilidade aproximadamente 10 vezes maior que a utilização de bioensaios com concentrações diagnósticas com uma geração obtida a partir da coleta de parentais no campo (Andow & Alstad 1998). Assim, o "F₂ Screen" é composto por quatro procedimentos: inicialmente fêmeas adultas e fecundadas devem ser coletadas no campo e no laboratório devem ser estabelecidas diferentes linhagens a partir de uma mesma fêmea trazida do campo. Em seguida, os indivíduos resultantes da geração F₁ devem ser criados e reproduzidos dentro de sua respectiva linhagem. As larvas neonatas da geração F₂ devem ser utilizadas em bioensaios para se verificar a suscetibilidade dos indivíduos a toxinas de *Bt*. Por fim, os dados de mortalidade dos insetos das diferentes linhagens devem ser analisados estatisticamente. O "F₂ Screen" é considerado um dos únicos procedimentos disponíveis que permite que sejam detectados alelos raros e recessivos em uma população de insetos.

As áreas nas quais serão realizadas as coletas para acompanhamento da suscetibilidade dos insetos não deverão ser apenas vinculadas aos níveis de adoção de culturas GM pelos agricultores. As definições destas áreas deverão considerar os diferentes regimes de seleção que os insetos estarão sendo expostos, também considerando, por exemplo, a diversidade de culturas e o sistema de produção. Deste modo, áreas com maior pressão de seleção sobre a população da praga deverão ser criteriosamente amostradas.

5. O Manejo da Resistência de Insetos a Plantas GM no Brasil

O Brasil recentemente regulamentou e normatizou os procedimentos para liberação experimental e comercial de plantas GM por intermédio da Lei de Biossegurança. Certamente, a primeira geração desses organismos será composta basicamente por plantas (milho e algodão) resistentes a insetos expressando toxinas inseticidas de *Bt*. O monitoramento da suscetibilidade pragas a toxinas de *Bt* no Brasil representa um enorme desafio na tentativa de conciliar as necessidades práticas e as exigências técnicas de um programa pró-ativo de manejo da resistência em um ambiente agrícola altamente diversificado.

Inicialmente, há necessidade de se coletar e organizar os dados, não apenas da eficiência agrônômica, mas que possibilitem a caracterização toxicológica desses eventos de plantas GM resistentes a insetos. Além disso, é necessária uma boa revisão dos aspectos bioecológicos das pragas chave alvos de controle e novas pesquisas que preencham as lacunas existentes. Sem dúvida, há necessidade de que sejam definidas quais informações são prioritárias, para que dessa forma não exista um atraso nos processos de liberação comercial das plantas GM.

É também de fundamental importância o conhecimento dos diferentes agroecossistemas no Brasil. Este será uma difícil tarefa para todos envolvidos no MIP. Isto porque nas condições brasileiras as diferentes culturas têm sido exploradas de modo intensivo e numa grande variedade dando origem a um considerável número de composições de mosaicos de plantas e sistemas de produção. E justamente este cenário que tem proporcionado periodicamente a inclusão de novas pragas nas diferentes culturas. Entretanto, as pragas chaves da cultura podem ser apontadas e selecionadas para os estudos de bioecologia destes insetos. Assim, há algumas espécies de insetos que certamente deverão ser alvos de estudos avançados envolvendo movimento de larvas, adultos, comportamento de cópula e oviposição, migração e fluxo gênico, plantas hospedeiras alternativas etc. Por

exemplo, *S. frugiperda* merece destaque devido à sua importância nas culturas de milho e algodão. Portanto, há necessidade de se considerar as estratégias de liberação de milho *Bt* na elaboração de plano de manejo de resistência em algodão *Bt*, e vice-versa. Sem dúvida, ainda são necessários avanços no estabelecimento de linhas básicas de suscetibilidade de pragas às diferentes toxinas de *Bt* no Brasil, bem com a validação de métodos de bioensaio para os programas de monitoramento da resistência.

Devido ao grande potencial de uso da tecnologia de plantas *Bt* no Brasil, há necessidade de elaboração de programas pró-ativos para o manejo da resistência às toxinas de *Bt*. Neste ponto, as Universidades, Instituições de Pesquisa, Empresas Estaduais e Privadas e Órgãos de Regulação devem atuar conjuntamente para que todas as informações necessárias sejam geradas do modo mais idôneo e responsável, afim de que seja depositada a confiança da sociedade como um todo nas estratégias de manejo da resistência. O acompanhamento da eficiência das estratégias de manejo por Laboratórios, Agências ou Órgãos Públicos credenciados é uma das alternativas que podem ser consideradas num plano nacional que regulamentaria a adoção de culturas *Bt*. As áreas de refúgio têm sido fundamentais para o retardamento da evolução da resistência. Sendo assim, este é um dos pontos que merece atenção para os programas de educação e conscientização da sociedade sobre a necessidade da manutenção de áreas de refúgio. Ainda, há necessidade de se pensar em planos de mitigação, caso sejam detectados aumentos nos níveis de resistência em determinadas populações de insetos.

6. Literatura citada

- Andow, D. A.; Alstad, D. N. 1998. The F₂ Screen for rare resistance alleles. *Journal of Economic Entomology*, 91: 572-578.
- Bourguet, D. 2004. Resistance to

- Bacillus thuringiensis* toxins in the European corn borer: what chance for *Bt* maize? *Physiological Entomology*, 29:251-256.
- Bravo, A.; Hendrickx, K.; Jansens, S.; Perfeoen, M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60: 247-263.
- Carrière, Y.; Tabashnik, B. E. 2001. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proceedings of Royal Society of London, Biological Science*, 268: 1475-1480.
- Carrière, Y.; Ellis-Kirk, C.; Kumar, K.; Heuberger, S.; Whitlow, M.; Whitow, M.; Antilla, L.; Dennehy, T. J.; Tabashnik, B. E. 2005. Long-term evaluation of compliance with refuge requirements for Bt cotton. *Pesticide Management Science*, 61: 1519-1523.
- Ceci, L. R.; Volpicella, M.; Rahbe, Y.; Gallerani, R.; Beekwilder, J.; Jongsman, M. A. 2003. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. *Plant Journal*, 33: 557-566.
- Crickmore, N.; Zeigler, Z. R.; Feilelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* encoded by a cryptic gene. *Microbiological Molecular Biology Review*, 62: 807-813.
- Christeller, J. T.; Burgess, E. P. J.; Mett, V.; Gatehouse, H. S.; Markwick, N. P.; Murray, C.; Malone, L. A.; Wright, M. A.; Philip, B. A.; Watt, D. 2002. The expression of a mammalian proteinase inhibitor, bovine spleen trypsin inhibitor in tobacco and its effects on *Helicoverpa armigera* larvae. *Transgenic Research*, 11: 161-173.
- Darboux, I.; Pauchet, Y.; Catella, C.; Silva-Filha, M.H.; Nielsen-leftoux, C.; Charles, J.F.; Pauron, D. 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of biopesticide resistance. *Proceedings of National Academy of Science (USA)*, 99: 5830-5835.
- EPA, U. S. 1998. FIFRA Scientific Advisory Panel, Sub panel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant- Pesticides & Resistance Management.
- Fearing, P. L.; Brown, D.; Vlachos, D.; Meghji, M.; Privalle, L. 1997. Quantitative Analysis of Cry1Ab Expression in Bt Maize Plants, Tissues and Silage, and Stability of Expression over the Generations. *Molecular Breeding*, 3: 169-176.
- Ferré, J.; Van Rie, J. 2002. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47: 501-543.
- Ferry, N.; Edwards, M. G.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R. 2004. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion on Biotechnology*, 15: 1-7.
- Flannagan, R.D.; Yu. C.; Mathis, J.P.; Meyer, T.E.; Shi, X.; Siqueira, H.; Siegfried, B.D. 2005. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 33-40.
- Gahan, L.J.; Gould, F.; Hechel, D.G. 2001. Identifications of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857-860.
- Gatehouse, J. A. 2002. Plant Resistance Towards Insect Herbivores: A Dynamic Interaction. *New Phytology*, 156: 145-169.
- Gill, S.S.; Cowles, E.A.; Pietrantonio, P.V. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*, 37: 615-636.
- Gould, F. 1998. Sustainability of Transgenic Insecticidal Cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701-726.
- Hossain, F.; Pray, C.E.; Lu, Y.; Huang, J.; Fan, C.; Hu, R. 2004. Genetically modified cotton and farmer's health in China. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 10: 293-303.
- Huang, F.; Zhu, K.Y.; Bushman, L.L.; Higgins, R.A.; Oppert, B. 1999. Comparison of midgut proteinases in *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 65:132-169.
- Johnson, M. T.; Gould, F. 1992. Interaction of Genetically Engineered host plant resistance and natural enemies of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in tobacco. *Environmental Entomology*, 21:207-214.
- Johnson, M. T. 1997. Interaction of resistant plants and wasp parasitoids of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 26: 207-214.
- Johnson, M. T.; Gould, F.; Kennedy, G. G. 1997. Effect of natural enemies on fitness of *Heliothis virescens* on resistant host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82: 219-230.
- Koziel, M. G.; Beland, G. L. Bowman, C.; Carozzi, N. B.; Crenshaw, R.; Crossland, L.; Dawson, J.; Desai, N.; Hill, M.; Kadwell, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an protein gene derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 11: 194-200.
- Li, H.; Oppert, B.; Higgins, R.A.; Huang, F.; Bushman, L.L.; Gao, J-R.; Zhu, K.Y. 2005. Characterization of

- cDNA encoding three trypsin-like proteinases and mRNA quantitative analysis in Bt-resistant and -susceptible strain of *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 847-860.
- Loc, N. T.; Tinjuangjun, P.; Gatehouse, A. M. R.; Christou, P.; Gatehouse, J. A. 2002. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants with accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding*, 9: 231-244.
- Ma, G.; Roberts, H.; Sarjan, M.; Featherstone, N.; Lahnstein, J.; Akhurst, R.; Schmidt, O. Is the mature endotoxins Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 729-739.
- Martinez-Ramirez, A.C.; Real, A.D. 1996. Photolytic processing of CryIII toxin and specific binding to brush-border membrane vesicles of *Lepidotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 54:115-122.
- Morin, S. R.; Biggs, W.; Sisterson, M. S.; Shriver, L.; Ellerskirk, C.; Higginson, D.; Holley, D.; Gahan, J. J.; Heckel, D. G.; Carrière, Y.; Dennehy, T. J.; Brown, J. K.; Tabashnik, B. E. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 100: 5004-5009.
- Oppert, B. 1999. Protease interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 42: 1-12.
- Ostlie, K. R.; Hutchinson, W. D.; Hellmich, R. L. 1997. Bt Corn and European Corn Borer. NCR Publication 602, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Pray, C.; Huang, J.; Hu, R.; Rozelle. 2002. Five Years of Bt Cotton in China - the Benefits Continue. *Plant Journal*, 31: 423-430.
- Rahman, M.M.; Roberts, H.L.S.; Sarjan, M.; Asgari, S.; Schmidt, O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in flour moth *Ephesia kuebniella*. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 10: 2696-2699.
- Roush, R.T. 1998. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 353: 1777-1786.
- Siegfried, B. D.; Zoerb, A. C.; Spencer, T. 2001. Development of European corn borer larvae on the Event 176 Bt corn: Influence on survival and fitness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100: 15-20.
- Tabashnik, B. 1994. Evolution to Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39: 47-79.
- Tabashnik, B. E.; Liu, Y.; Malvar, T.; Heckel, D. G.; Masson, L.; Ballester, V.; Granero, F.; Mensua, J. L.; Ferré, J. 1997. Global Variation in the Genetic and Biochemical Basis of Diamondback Moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of National Academy of Science of USA*, 94: 12780-12785.
- Tabashnik, B.; Cushing, N. L.; Finson, N.; Johnson, M. W. 1990. Field Development of Resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond back moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 83: 1671-1676.
- Tabashnik, B. E.; Dennehy, T. J.; Sims, M. A.; Larkin, K.; Head, G. P.; Moar, W. J.; Carrière, Y. 2002. Control of resistant pink bollworm by transgenic cotton with *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 3790-3794.
- Tabashnik, B. E.; Carrière, Y.; Dennehy, T. J.; Morin, Shai; Sisterson, M. S.; Roush, R. T.; Shelton, A. M.; Zhao, J. 2003. Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: Lessons from the Laboratory and Field. *Journal of Economic Entomology*, 96(4): 1031-1038.
- Thirtle, C.; Beyers, L.; Ismael, T.; Piesse, J. 2003. Can GM-technologies help the poor? The impact of Bt cotton in Makhathini Flats, KwaZulu-Natal. *World Development*, 31: 717-732.
- Toenniessen, G. H., J. C. O'Tolle, J. Devries, J. 2003. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 191-198.
- U.S. Environmental Protection Agency and US Department of Agriculture. 1999. Report of EPA/USDA Workshop on Bt Crop Resistance Management in Cotton. Memphis, Tennessee. August 26, 1999. Esther Day, ed. 80p. American Farmland Trust, Center of Agriculture in the Environment (posted at: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>).
- Vadilamudi, R.K.; Ji, T.H.; Bulla, L.A. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. Berl. *Journal of Biological Chemistry*, 268:12334-12340.
- Vadilamudi, R.K.; Weber, E.; Ji, T.H.; Bulla, L.A. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 5090-5494.
- Wu, K.; Mu, W.; Liang, G.; Guo, Y. 2005. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China. *Pest Management Science*, 61:491-498.