



EVOLUÇÃO E MANEJO DA RESISTÊNCIA DE INSETOS

“O conhecimento nos permite contornar muitos problemas, mas muitas vezes, apenas nos possibilita adiar o inevitável, transferindo para algum ponto futuro os acontecimentos que buscamos com todo empenho evitar – Vilmar Machado”

Este artigo apresenta alguns aspectos relacionados à evolução e ao manejo da resistência do ponto de vista da biologia evolutiva. Aqui são abordados os mecanismos biológicos envolvidos no processo de adaptação dos insetos-praga aos agentes de controle e, também, como o conhecimento destes se reflete nas estratégias utilizadas para reduzir a velocidade de evolução da resistência às plantas transgênicas.

1.1 Introdução

A resistência aos inseticidas é um fenômeno mundial e as estimativas atuais indicam que mais de 500 espécies de artrópodes desenvolveram resistência a um ou mais pesticidas (Georghiou & Lagunes-Tejeda, 1991). A resistência também foi observada para uma variedade de produtos naturais e reguladores do crescimento de insetos. Dentre o que aprendemos com a utilização de inseticidas químicos foi que a capacidade de resposta adaptativa dos insetos é quase inevitável e ocorre relativamente rápido. Para muitos esse fenômeno parece ser surpreendente, mas não devemos esquecer que uma das características mais relevantes dos organismos vivos é sua capacidade de evoluir continuamente.

O processo de evolução ocorre de forma “automática” - sem a influência de forças externas ou de um agente direcionador para compreender como as mudanças evolutivas acontecem, precisamos analisar aspectos básicos da biologia dos seres vivos os quais influen-

ciam a evolução da diversidade biológica possibilitando a adaptação aos diferentes ambientes e também respostas específicas a pressões seletivas mais diretas, como a predadores, parasitas ou a agentes de controle desenvolvidos pela espécie humana, como antibióticos ou inseticidas químicos.

Nossa relação com insetos-praga, bactérias e vírus, mesmo que pareça estranha para alguns, pode ser analisada como um processo de co-evolução. Nossas respostas, nesse processo, são frutos da aplicação do conhecimento científico enquanto o que observamos, através da evolução da resistência, não é. Indiferentes aos nossos esforços, populações de insetos se reproduzem passando de uma geração para outra as informações genéticas. Esse processo de reprodução não é aleatório: em cada geração alguns indivíduos deixarão mais descendentes que outros; o sucesso na passagem dos genes para as próximas gerações está associado à presença de características genéticas que contribuam para a reprodução e a sobrevivência às condições ambientais vigentes.

A descrição acima pode ser simples, mas nos possibilita ter uma idéia geral do processo de evolução da resistência aos antibióticos e inseticidas químicos. Para uma compreensão mais apurada do processo podemos fazer, no mínimo, duas perguntas relevantes. Quais as características importantes do material genético passado de uma geração para outra no processo de evolução? Porque a sobrevivência e a reprodução não são aleatórias?

As respostas para estas perguntas

Vilmar Machado

Biólogo (UNISINOS) e Mestre e Doutor em Genética e Biologia Molecular (UFRGS)

Lidia Mariana Fiúza

Engenheira Agrônoma (UPF), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS), Doutora em Ciências Agrônomicas (ENSAM-Montpellier) e Pós-Doutora em Biotecnologia Vegetal (CIRAD-Montpellier).

nos permitirão compreender, em linhas gerais, a evolução da resistência aos inseticidas e antibióticos, e também analisar as possibilidades de evolução da resistência às plantas geneticamente modificadas com genes de *B. thuringiensis*, denominadas *plantas-Bt*. Além disso, ajudarão a compreender os procedimentos utilizados nas estratégias de manejo da evolução da resistência.

1.2 Diversidade genética nas populações e evolução da resistência

A evolução de respostas adaptativas ocorre pelo efeito de seleção natural sobre a variação genética existente nas populações. A aplicação repetida de inseticidas do mesmo grupo químico e modelo de ação favoreceram variantes genéticas específicas nas populações alvos levando à substituição dos indivíduos susceptíveis pelos indivíduos resistentes. O gene para resistência que aumenta em frequência numa população pode se espalhar para outras populações através do fluxo gênico.

As diferenças genéticas entre os indivíduos de uma população são consideradas a matéria prima da evolução, existindo uma relação entre valor adaptativo médio de uma população e os níveis de variabilidade que ela apresenta. Segundo o teorema fundamental de Fisher (1930), a taxa de mudança evolutiva é proporcional à diversidade genética existente nas populações.

A diversidade genética é a base para respostas às mudanças ambientais. A importância do estudo da variabilidade pode ser compreendida pela quantidade de trabalhos sobre o tema, em especial procurando identificar os fatores envolvidos na sua manutenção. Nos trabalhos com populações naturais, a preocupação com a existência da diversidade genética aparece de formas variadas. Para programas de conservação e manejo da vida silvestre, um dos temas centrais é a manutenção da variabilidade genética em ambientes fragmentados, pois é consenso que a persistência futura das populações pode depender da preservação de componentes específicos da diversidade genética (Gilpin & Sólue, 1986; Meffe & Carroll, 1997). Em programas de manejo e controle de pragas e vetores, essa preocupação está associada, por um lado, à busca por linhagens de agentes de controle que sejam específicas a uma determinada praga (Potting et al. 1997; Vink et al., 2003) e por outro, à identificação de

variantes resistentes aos agentes de controle nas espécies consideradas pragas ou vetores de doenças (Ofuya & Credland, 1995; Winder et al. 1997; Guirao et al. 1997; Nicol et al. 1998; Szalanski et al. 1999; 2000; Oliveira et al. 2001; Birungi & Munstermann, 2002). A importância e as implicações de existência de variação genética nas populações naturais de pragas e vetores foram salientadas por Diehl & Bush (1984) em seu trabalho sobre "biotopes". Segundo os autores, o não reconhecimento desse fator pode frustrar ou dificultar programas de manejo e controle biológico de pragas. Para Newman et al. (1998), a diversidade genética nas populações é um dos elementos que contribuem para reduzir a eficiência de programas de controle químico e/ou biológico. Essa também é uma preocupação considerada por programas envolvidos no desenvolvimento de variedades de plantas resistentes a insetos-praga (Sardesai, 2000; Heinrichs, 2001).

A importância da variabilidade genética para programas de manejo e controle de pragas tem sido discutida por décadas, mas seu estudo tornou-se possível apenas com o desenvolvimento de marcadores baseados na análise de DNA. A aplicação desses marcadores tornou-se uma ferramenta importante para o estudo da dinâmica e dos fatores que influenciam populações naturais (Edwards, 1993; Smith & Wayne, 1996; Schierwater & Desale, 1998). Estudos detalhados sobre a importância da variabilidade genética em insetos-praga ou vetores são recentes e entre eles destacam-se: Winder et al. (1997); Guirao et al. (1997); Nicol et al. (1998); Szalanski et al. (1999); Downie (2000); Geurgas et al. (2000; 2002); Appleby & Credland (2003).

Estudos recentes têm registrado variação intra-específica na susceptibilidade de agentes de controle químico e/ou biológico em várias espécies, como por exemplo, *Microctonus aethiopoies*, *Schizaphis graminium* e *Spodoptera frugiperda*. Em *Microctonus aethiopoies* (Hymenoptera: Braconidae), um parasitóide utilizado em programas de controle de biológico de pragas, foram identificadas linhagens (biotipos) adaptadas a hospedeiros diferentes, analisando-se a variação intra-específica no gene para Citocromo Oxidase I (Vink et al., 2003). Uma das dificuldades no controle de *Schizaphis graminium* (Hemiptera: Aphididae), uma das mais importantes pragas de cereais do mundo, é a

existência de linhagens diferentes ao longo da sua área de distribuição. Para esse inseto estão sendo realizados estudos visando selecionar marcadores moleculares específicos para identificar as diferentes linhagens e, desta forma, melhorar as condições de controle utilizando agentes específicos para cada uma (Aikhionbare & Mayo, 2000; Lopes da Silva et al., 2004). Em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), uma praga de várias culturas importantes, lagartas coletadas em hospedeiros diferentes apresentaram diferenças significativas na susceptibilidade a determinados inseticidas e a endotoxinas de *B. thuringiensis* (Adamczyk, et al., 1997).

Exemplos mais interessantes da diversidade genética em insetos-praga ocorre em *Bemisia tabaci*, considerada por muitos a principal praga agrícola do mundo, tendo sido registrada sua ocorrência em mais de 600 espécies de plantas e, até o momento, são conhecidos mais de 20 biotipos (Oliveira et al., 2001; Omondi et al., 2005; Carabali et al., 2005). No Brasil, esse inseto é conhecido como mosca-branca e os prejuízos causados decorrem da atividade de sucção de seiva, injeção de toxinas e pela transmissão de vírus de plantas. A variabilidade genética intra-específica e a diversidade de hospedeiros estão entre os grandes desafios para o controle desse inseto (Perring, 2001).

Os parágrafos acima reforçam a idéia de que é preciso levar em conta a diversidade genética existentes nas populações dos insetos-alvo em programas de manejo e controle. Vários estudos demonstram que essa variabilidade também está presente nos mecanismos biológicos que possibilitam a ação das toxinas de *B. thuringiensis*.

A resistência às toxinas de *B. thuringiensis* pode envolver: a não ativação da toxina, a imobilização da toxina na membrana peritrófica, sua incapacidade de ligar-se aos receptores da membrana, sua incapacidade de criar poros na membrana do epitélio e sua baixa eficiência pelo rápido reparo dos danos causados por ela às células afetadas (Ferre & Van Rie, 2002; Griffiths & Aroian, 2005; Baxter et al. 2008).

O mecanismo mais comum envolvendo a resistência às toxinas de *B. thuringiensis* é a redução na capacidade de ligação aos receptores nas microvilosidades do intestino médio dos insetos (Ferre et al., 1991; 2003; Pigott & Ellar, 2007; Wang et al., 2007; Rodrigo-

Simón et al., 2008). Modificações nos genes que codificam os receptores para as proteínas Cry foram encontradas em várias espécies. Mutações nos receptores para proteína Cry1A estão envolvidas na resistência em *Heliothis virescens* (Gahan et al., 2001), *Pectinophora gossypiella* (Morin et al., 2003), *Helicoverpa armigera* (Xu et al., 2005; Luo et al., 2006) e *P. xylostella* (Ballester et al., 1999). Em *C. elegans* foram identificados quatro genes diferentes para resistência à toxina (Griffitts et al., 2005). Além disso, foram descritos mecanismos de resistência a *B. thuringiensis* envolvendo genes diferentes em *H. virescens*, *P. xylostella* (Jurat-Fuentes & Adang, 2006) e *P. interpunctella* (Herrero et al., 2001). Em *H. virescens* em cada 1000 insetos 1,5 é portador do gene para resistência a *B. thuringiensis* (Gould et al., 1995; 1997).

As informações acima demonstram claramente a presença de genes para resistência às toxinas de *B. thuringiensis* em populações de várias espécies mesmo que em baixa frequência. É preciso destacar que até o momento não foi registrada nenhuma população natural resistente a essas toxinas. O que é necessário para que estes genes aumentem em frequência nas populações naturais? A resposta simples é: que as aplicações das toxinas *B. thuringiensis* tornem-se numa pressão de seleção constante e intensa.

1.3 Fluxo gênico

Estudos sobre a estrutura genética de populações têm demonstrado, ao longo do tempo, que as espécies raramente são constituídas por populações únicas e panmíticas; pelo contrário, diferenças genéticas são encontradas entre as populações. Essas diferenças são componentes importantes da diversidade genética da espécie. Em geral, a troca de genes ocorre com maior probabilidade entre populações próximas geograficamente do que entre populações mais distantes, sendo influenciada pela estrutura geográfica e espacial das populações. Portanto, o estudo da estrutura genética das populações é um componente importante de programas de manejo e controle de pragas, pois podem fornecer informações sobre níveis de variabilidade genética, graus de diferenciação entre as populações e padrões de fluxo gênico. Além disso, pode possibilitar o monitoramento das mu-

danças na frequência de genes específicos.

A caracterização genética das espécies alvo, ao longo de sua área de distribuição, é um dos fatores que podem contribuir para o sucesso de programas de controle biológico (Hoelmer & Kirk, 2005). O fluxo gênico é um componente importante para as estratégias de manejo da evolução da resistência e seus efeitos podem ter reflexos em pequena e grande escala.

Em pequena escala (populações locais) espera-se que ele contribua para diluição da resistência levando ao cruzamento entre insetos resistentes e não resistentes. Sua intensidade tem efeitos na taxa de aumento da frequência dos genes para resistência. A capacidade de dispersão de um inseto praga é relevante para definição do tamanho e distribuição das áreas de refúgio, uma vez que estas são os locais para manutenção de indivíduos susceptíveis possibilitando o fluxo de genes não-resistentes para grupos de indivíduos resistentes nas áreas de *plantas-Bt* (Vacher et al., 2006).

Em grande escala, o fluxo gênico pode determinar a possibilidade dos genes para resistência se espalharem ao longo da área de distribuição geográfica da espécie. Esse fenômeno influencia a velocidade em que uma adaptação que surge numa população local pode se espalhar.

Os possíveis impactos do fluxo gênico na evolução da resistência torna fundamental dispor de estudos precisos sobre a estrutura genética das populações de insetos-praga visando estimar seu impacto em populações locais e também em longas distâncias. Especialmente no caso de pragas com ampla área de distribuição que atacam culturas diferentes.

Estudos de estrutura genética têm potencial para responder questões relevantes para o manejo destas espécies, como por exemplo: os insetos que atacam plantas diferentes formam linhagens distintas? Qual o grau de diferenciação genética entre as linhagens? Quando as linhagens ocorrem na mesma área, os cruzamentos são aleatórios ou não? Qual a capacidade de dispersão a longas distâncias? A reprodução ocorre an-

tes ou depois da dispersão dos insetos?

1.4 Efeito de seleção e evolução da resistência

A seleção natural pode ser definida como diferenças na taxa de reprodução e/ou sobrevivência entre indivíduos com características distintas. De uma maneira mais simples, os indivíduos com as melhores respostas aos problemas de sobrevivência e reprodução deixam mais genes para as próximas gerações. O efeito da seleção natural sobre as populações aumenta a frequência dos alelos com resposta “positiva”, gerando uma mudança adaptativa. De acordo com a hipótese da rainha vermelha (Van Valen, 1973) é preciso evoluir (adaptar-se) continuamente para não ser “superado” pelos seus competidores.

A capacidade de evoluir é uma característica dos organismos vivos, mesmo que no processo ocorram extinções de muitas linhagens, mas a “vida” no planeta Terra tem mantido sua capacidade de encontrar novos caminhos, reinventando a si mesma de diferentes maneiras.

Nossa relação com os insetos-praga é apenas parte do processo e, por maior que seja nosso empenho, não conseguimos superá-las; até hoje apenas nos esforçamos para reduzir seu impacto sobre nossa existência. Essa relação iniciou quando inventamos a agricultura e desde então estamos envolvidos numa corrida ao armamento. Nossas armas envolvem os diferentes métodos de controle, com destaque para a aplicação em massa de produtos químicos sintéticos após a segunda guerra mundial e, mais recentemente, o desenvolvimento das *plantas-Bt*.

A crescente utilização de *B. thuringiensis* como biopesticidas e a ampliação das áreas de plantio com *plantas-Bt* certamente aumentam a pressão de seleção desse agente sobre as populações alvo.

O primeiro formulado comercial de *B. thuringiensis* surgiu na França, em 1938 e sua introdução nos Estados Unidos ocorreu em 1950. Desde então essa bactéria vem sendo utilizada amplamente para controle de pragas (Sayyed e Wright, 2002). Em 1996, foram comercializados e plantados *algodão-Bt* e *milho-Bt* em milhares de hectares nos Estados Unidos (Gould, 1998). A partir de então, foram produzidas outras plan-

tas com genes *B. thuringiensis*, e a área plantada foi ampliada, estendendo-se para outros continentes. Em 2002 foram plantados, no mundo, 14 milhões de hectares apenas de *algodão-Bt* e *milho-Bt* (James, 2002; Bourguet et al., 2005).

A expressão das toxinas de *B. thuringiensis* nas plantas transgênicas é considerada um dos maiores avanços no uso de biopesticidas. Segundo James (2007), as lavouras de *plantas-Bt* aumentaram anualmente, atingindo 114,3 milhões de hectares no mundo, em 2007.

As informações disponíveis indicam claramente que as condições para evolução da resistência contra as toxinas de *B. thuringiensis* existem, ou seja, as populações apresentam genes para resistência (mesmo que em frequência baixa) e a pressão de seleção aumenta anualmente.

Cientes desta situação os profissionais da área de manejo e controle de pragas colocaram em prática o que chamamos de manejo da resistência, isto é, um conjunto de procedimentos que tem por objetivo retardar ao máximo o surgimento de populações resistentes em campo.

1.5 Manejo da Evolução da Resistência

Uma população se torna resistente quando a maioria dos insetos susceptíveis ao método de controle utilizado foi removida. A maior taxa de cruzamentos entre insetos portadores do gene para resistência tornará o controle mais difícil a cada geração.

No intuito de eliminar ou retardar o aumento na frequência dos genes para resistência às toxinas de *B. thuringiensis* em populações de insetos-alvo, foram desenvolvidas várias estratégias de manejo da evolução da resistência. A finalidade destas estratégias é reduzir a pressão de seleção, diminuindo a velocidade de crescimento da população de insetos resistentes.

A estratégia mais utilizada no manejo da resistência é denominada de altas doses/refúgio estruturado e fundamenta-se em modelos teóricos e testes experimentais realizados em pequena escala (Georghiou & Taylor, 1977; 1999; Gould, 1998; Peck et al., 1999; Caprio, 2001; Onstad et al., 2002; Liu & Tabashnik, 1997; Shelton et al., 2000; Wenes et al., 2006).

As premissas dessa estratégia são:

(i) o gene para resistência ocorre em frequência baixa nas populações;

(ii) as quantidades de toxinas de *B. thuringiensis* produzidas pelas plantas são altas o suficiente para eliminação da população os insetos homozigotos não resistentes e os heterozigotos resistentes;

(iii) os indivíduos resistentes (homozigotos) que nascem nas áreas com *plantas-Bt* cruzam aleatoriamente com os indivíduos não resistentes que nascem nas áreas dos refúgios.

No manejo da resistência, o refúgio é a área na qual não são cultivadas *plantas-Bt* e sua finalidade é manter na população indivíduos susceptíveis às toxinas de *B. thuringiensis*, ou seja, aqueles que não possuem genes para a resistência. Sua contribuição é a produção de insetos adultos susceptíveis às toxinas de *B. thuringiensis* para cruzarem com insetos homozigotos resistentes, “diluindo”, dessa forma, a resistência na população. A dispersão para fora das áreas dos refúgios é necessária para que os cruzamentos aconteçam.

As dimensões e a distribuição das áreas de refúgio são definidas com base em estudos teóricos e experimentos de campo podendo variar de acordo com a cultura ou praga em questão. A área dos refúgios para *milho-Bt* varia entre 20 e 50%; simulações de computador indicam que áreas menores podem acelerar a evolução da resistência. Para *algodão-Bt*, por outro lado, recomenda-se que 5 a 20% da área de plantio seja destinada ao refúgio (Technology Use Guide, 2007-2008).

São fatores relevantes na definição da área de refúgio: a capacidade de dispersão da praga, sua biologia reprodutiva e seus hábitos alimentares. A distribuição dos refúgios também procura reduzir a possibilidade de cruzamentos entre indivíduos homozigotos para o gene da resistência (Peck et al., 1999; Caprio, 2001; Ives & Andow, 2002; Vacher et al., 2006; Tyutyunov et al., 2007; 2008; Hanur, 2008).

A expressão “doses altas” significa que as plantas vão produzir quantidades das toxinas de *B. thuringiensis* suficientes para eliminar da população os indivíduos que possuem uma única cópia do gene para resistência, ou seja, os heterozigotos. Por definição, “dose alta”, é aquela suficiente para matar mais do que 95% dos insetos heterozigotos (Georghios & Taylor, 1977; Roush,

1994; Gould, 1998).

Essa estratégia torna a resistência uma característica funcionalmente recessiva, uma vez que apenas os portadores de duas cópias do gene sobrevivem às doses de toxina produzida pelas *plantas-Bt* (Tabashnik & Croft, 1982). Nas áreas com *plantas-Bt* sobreviverão apenas os raros portadores de duas cópias do gene para resistência, ou seja, os homozigotos recessivos. Os cruzamentos aleatórios entre os raros indivíduos resistentes nas áreas com *plantas-Bt* e os indivíduos não resistentes dos refúgios, produziria indivíduos susceptíveis que seriam eliminados quando se alimentassem de *plantas-Bt* (Gould, 1998; Vacher et al., 2006).

Na teoria, a estratégia “altas doses/refúgios estruturados” funciona muito bem, ou seja, dentro das premissas ela realmente reduz a velocidade de aumento na frequência do gene para a resistência nas populações aumentando, com isso, o tempo de uso das *plantas-Bt*. O mundo real, porém, tem diversas maneiras de se desviar das aceitações do modelo.

Estudos sobre o padrão de herança da resistência indicam que outros mecanismos genéticos podem ocorrer, como por exemplo, dominância e herança poligênica (Heckel et al., 2007). Além disso, os cruzamentos podem não ocorrer aleatoriamente; para isso, basta que existam diferenças na velocidade de desenvolvimento entre indivíduos resistentes e susceptíveis. A assincronia no desenvolvimento pode determinar uma frequência maior de cruzamentos entre indivíduos resistentes, o que pode acelerar a evolução da resistência (LIU et al., 2000; Medvinsky et al., 2007).

1.6 Considerações

A espécie humana, não tem muitas respostas para explicar como a vida surgiu no planeta Terra, mas ao longo do tempo fez muitas descobertas sobre as forças envolvidas no processo de evolução da biodiversidade e nas mudanças adaptativas nas diferentes linhagens de organismos.

A evolução é um processo complexo, influenciado pela mutação, seleção natural, fluxo gênico, deri-

va genética e sistema de cruzamentos. As interações entre estes fatores são complexas e de difícil compreensão. A construção de modelos para simular o efeito destes fatores permite analisar parcialmente estas interações. Atualmente em muitos casos temos respostas relativamente precisas de como as coisas aconteceram, por exemplo, sobre a evolução da resistência aos inseticidas e/ou antibióticos.

Podemos fazer muitas previsões, porém estas estão envolvidas num mundo de incertezas, determinadas pela presença do acaso ou das interações que nossos modelos não podem estimar, pois são uma simplificação do mundo real.

Muitos pesquisadores acreditam que o surgimento de linhagens resistentes a agentes de controle químico e/ou biológico em populações naturais não é uma questão de “se” vai acontecer, mas sim, “quando” irá ocorrer. Estas preocupações são válidas também para as *plantas-Bt* (Wright et al., 1997; Gould, 1998; Tabashnik & Carrière, 2004; Tabashnik et al., 2004 e 2008; Bourguet et al., 2005).

Quando analisamos um fenômeno biológico do ponto de vista da teoria da evolução, as unidades de tempo devem ser pensadas em perspectivas diferentes; estas envolvem gerações que se sucedem ao longo do tempo. As unidades de tempo envolvem períodos maiores do que aqueles que usamos para datar a história da civilização, ou seja, 50 ou mesmo 100 anos, podem ser pouco relevantes.

As constantes pesquisas por novas toxinas e/ou a produção de plantas com capacidade de expressar mais do que uma toxina é um indicativo de nossa consciência de que as *plantas-Bt* cultivadas atualmente podem ser sucessos temporários.

No momento, nossa melhor alternativa é continuar aplicando as estratégias de manejo da evolução da resistência e aprimorar as pesquisas por novos métodos para reduzir os impactos das pragas sobre a produção de alimentos.

Devemos ter em mente, porém, que essa relação evolutiva só poderá terminar com a extinção de um dos envolvidos, mas dada à dinâmica do processo evolutivo, podemos afirmar que novas relações irão surgir.

1.7 Referências

- Adamczyk, J.; Holloway, J.W.; Leonard, B.R. & Graves, J.B. 1997. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant host to selected insecticides and transgenic Bt cotton. *The Journal of Cotton Science*, 1: 21-28.
- Aikhionbare, F.O. & Mayo, Z.B. 2000. Mitochondrial DNA sequences of greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Biomolecular Engineering*, 16:199-205.
- Appleby, J.H. And Credland, P.F. 2003. Variation in responses to susceptible and resistant cowpeas among West African populations of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 489-502.
- Ballester, V., F. Granero, B. E. Tabashnik, T. Malvar, and J. Ferre. 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied Environmental Microbiology*, 65:1413-1419.
- Baxter, S.W.; Zhao, J.Z.; Shelton, A.M.; Vogel, H. & Heckel, D.G. 2008. Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38:125-135
- Birungi, J. & Munstermann, L. E. 2002. Genetic Structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brazil and United States. *Annual Entomology Society Am.*, 95 (1): 125-132.
- Bourguet, D.; Desquilbert, M. & Lemaire, S. 2005. Regulating insect resistance management: the case of non-Bt corn refuges in the US. *Journal of Environmental Management*, 76(3):210-20.
- Caprio, M. A. 2001. Source-sink dynamics between transgenic and non-transgenic habitats and their role in the evolution of resistance. *Journal of Economic Entomology*, 94: 698-705.
- Carabali, A.; Bellotti, A.C.; Montoya-Lerma, J. & Cuellar, M.E. 2005. Adaptation of *Bemisia tabaci* biotype B (Gennadius) to cassava *Manihot esculenta* (Crantz). *Crop Protection*, 24: 643-649.
- Diehl, S. R. & Bush, G. L. 1984. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. *Ann. Rev. Entomol.*, 29: 471-504.
- Downie, D.A. 2000. Patterns of genetic variation in native grape phylloxera on two sympatric host species. *Molecular Ecology*, 9: 505-514.
- Edwards, S. V. 1993. Mitochondrial gene genealogy and gene flow among island and mainland populations of a sedentary songbird, the grey-crowned babbler (*Pomatodromus temporalis*). *Evolution*, 47:1118-1137.
- Ferré, J., and J. Van Rie. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 47:501-533.
- Ferre, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens, and M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5119-5123.
- Fisher, R.A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*, Clarendon Press, Oxford.
- Gahan, L. J., F. Gould, and D. G. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with bit resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293:857-860.
- Georghiou, G.P., Lagunes-Tejeda, A. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. *FAO, Rome*. 318 p.
- Georghiou, G.P., Taylor, C.E., 1977. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology*, 70: 653-658.
- Geurgas, S. R.; Infant-Malachias, M. E. & Azeredo-Spin, A. M. L. 2000. Extreme Mitochondrial DNA Variability and Lack of Genetic Structure in Populations of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) from Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, 93 (5): 1085-1094.
- Gilpin, M. E. & Soulé, M. E. 1986. Minimum viable populations: process of population Extinction. IN: SOULÉ, M. E. (ed). *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Massachusetts.19-

- Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43:701-726.
- Gould, F., A. Anderson, A. Jones, D. Sumerford, D. G. Heckel, J. Lopez, S. Micinski, R. Leonard, and M. Laster. 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3519-3523.
- Gould, F., A. Anderson, A. Reynolds, L. Bumgarner, and W. Moar. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology*, 88:1545-1559.
- Griffitts, J. S., D. L. Huffman, J. L. Whitacre, B. D. Barrows, L. D. Marroquin, R. Muller, J. R. Brown, T. Hennem, J. D. Esko, and R. V. Aroian. 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *Journal of Biology Chemistry*, 278:45594-45602.
- Griffitts, J. S., S. M. Haslam, T. Yang, S. F. Garczynski, B. Mulloy, H. Morris, P. S. Cremer, A. Dell, M. J. Adang, and R. V. Aroian. 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, 307:922-925.
- Guirao, P.; Beitia, F. & Cenis, J. L. 1997. Biotipo determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 87: 587-593.
- Hanur, V. 2008. Bt resistance and monophagous pests: Handling with prudence. *Current Science*, 95 (4): 449-451.
- Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, et al. (2007) The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J Invertebr Pathol.*, 95: 192-197.
- Heinrichs, E.A. 2001. Management of rice insect pests. *Dep of Entomology, Univ of Nebraska*. <http://www.ipmworld.umn.edu/chapters/heinrich.htm>, 14p.
- Herrero, S., Oppert, B. & Ferré, J. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Applied Environmental Microbiology*, 67:1085-1089.
- Hoelmer, K.A. & Kirk, A.A. (2005). Selection arthropod biological control agents against arthropod pest: Can the science improved to decrease the risk of releasing ineffective agents? *Biological Control*: (in press): available online at www.sciencedirect.com
- Ives, A.R., Andow, D.A., 2002. Evolution of resistance to Bt crops: directional selection in structured environments. *Ecology Letters* 5, 792-801.
- James, C. 2002. Global review of commercialized transgenic crops: 2001 (ISAAA Brief No. 26-2001). Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Available on the World Wide Web: http://www.isaaa.org/Publications/briefs/briefs_26.htm.
- James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007. ISAAA Brief No. 37, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, USA.
- Jurat-Fuentes, J.L. & Adang, M.J. (2006) Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J Invertebr Pathol* 92: 166 -171.
- Liu, Y. B., B. E. Tabashnik, L. Masson, B. Escriche, and J. Ferré. 2000. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1Ca to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 93:1-6.
- Liu, Y.-B., and B. E. Tabashnik. 1997. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.*, 264:605-610.
- Liu, Y.-B., and B. E. Tabashnik. 1997. Inheritance of resistance to the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. *Applied Environmental Microbiology*, 63:2218-2223.
- Lopes-Da-Silva, M.; Tonet, G.E.L. & Vieira, L.G.E. 2004. Characterization and genetic relationships among Brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers. *Neotropical Entomology*, 33:43-50.
- Luo, S., Wang, G.; Liang, G., Wu, K.M.; Bai, L., Ren, X. & Guo, Y. .2006. Binding of three Cry1A toxins in resistant and susceptible strains of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: 104-109.
- Medvinsky, A.B., Gonik, M.M., Li, B.-L., Malchow, H., 2007. Beyond Bt resistance of pests in the context of population dynamical complexity. *Ecological Complexity*, 4, 201-211.
- Meffe, G. K. & Carroll, C. R. 1997. GENETICS: Conservation of diversity within species. IN: MEFFE, G. K. & CARROLL, C. R. (ed). *Principles of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Massachusetts.161-213.
- Morin, S., R. W. Biggs, M. S. Sister-son, L. Shriver, C. Eilers-Kirk, D. Higginson, D. Holley, L. J. Gahan, D. G. Heckel, Y. Carrière, T. J. Dennehy, J. K. Brown, and B. E. Tabashnik. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:5004-5009.
- Nicol, D.; Armstrong, K. F.; Wratten, S. D.; Walsh, P.J.; Straw, N. A.; Cameron, C. M.; Lahmann, C. & Frampton, C. M. 1998. Genetic diversity of an introduced pest, the green spruce aphid *Elatobium abietinum* (Hemiptera: Aphididae) in New Zealand and the United Kingdom. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 537-543.
- Ofuya, T. I. & Credland, P. F. 1995. Responses of Three Populations of the Seed Beetle, *Callosobruchus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), to Seed Resistance in Selected Varieties of Cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *J. stored Prod. Res.*, 31: 17-27.
- Oliveira, M. R. V.; Henneberry, T. J. & Anderson, P. 2001. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 20: 709-723.
- Omondi A.B.; Obeng-Ofor, D.; Kyematemani, R.A. & Danquah E.Y. 2005. Host preference and suitability of some selected crops for two biotypes of *Bemisia tabaci* in Ghana. *Entomologia Experimentalis et Applicata*,

- 115:393–400.
- Onstad, D.W., Guse, C.A., Porter, P., Buschman, L.L., Higgins, R.A., Slanderbeck, P.E., Peairs, F.B., Cronholm, G.B., 2002. Modeling the development of resistance by stalk-boring lepidopteran insects (Crambidae) in areas with transgenic corn and frequent insecticide use. *Journal of Economic Entomology*, 95: 1033–1043.
- Peck, S.L., Gould, F., Ellner, S.P., 1999. Spread of resistance in spatially extended regions of transgenic cotton: implications for management of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) *Journal of Economic Entomology*, 92: 1–16.
- Perring, T. M. 2001. The *Bemisia tabaci* specie complex. *Crop Protection*, 20: 725–737.
- Pigott, C. R., and D. J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology Molecular Biology Review* 71:255–281.
- Potting, R. P. J.; Vet, L. E. M. & Overholt, W. A. 1997. Geographic variation in host selection behaviour and reproductive success in the stem-borer parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Bulletin of Entomological Research*, 87: 515–524.
- Rodrigo-Simón, A., Caccia, S. & Ferre, J. 2008. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin-Binding and Pore-Forming Activity in Brush Border Membrane Vesicles Prepared from Anterior and Posterior Midgut Regions of Lepidopteran Larvae. *Applied And Environmental Microbiology* 74(6): 1710–1716.
- Roush R.T. 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: Can transgenic crops be better than sprays? *Biocontrol Science and Technology*; 4:501–516.
- Sardesai, N., Rajyashri, K.R., Behura, S.K., Nair, S. & Mohan, M. 2001. Genetic, physiological and molecular interactions of rice and its major dipteran pest, gall midge. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 115–131.
- Sayyed, A. H., and D. J. Wright. 2002. Genetic diversity of *B. thuringiensis*: resistance: implications for resistance management. *Pak. J. Biol. Sci.* 5: 1330–1344.
- Schierwater, B. & Desale, R. 1998. *Population Biology, kinship and fingerprinting*. IN: DeSALE, R. & SCHIERWATER, B. (ed). *Molecular approaches to ecology and evolution*. Birkhäuser, Berlin. 1–5.
- Shelton, A. M., J. Z. Zhao, and R. T. Roush. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review Entomology* 47:845–881.
- Smith, T. B. & Wayne, R. K. (ed). 1996. *Molecular Genetic approaches in conservation*. Oxford University Press, New York. 483p.
- Szalanski, A. L.; Roehrdanz, R. L. & TAYLOR, D. B. 2000. Genetic Relationship among *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae) based on rDNA and mtDNA sequences. *Florida Entomologist*, 83 (3): 262–267.
- Szalanski, A. L.; Roehrdanz, R. L.; Taylor, D. B. & Chandler, L. 1999. Genetic variation in geographical population of western and Mexican corn rootworm. *Insect Molecular Biology*, 8 (4): 519–525.
- Tabashnik, B. E., Gassmann, A.J., Crowder, D.W. & Carrière, Y. 2008. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*, 26: 199–202.
- Tabashnik, B.E. & Carrieré, Y. 2004. Bt transgenic crops do not have favorable effects on resistant insects. *Journal of Insect Science*, 4:1–3.
- Tabashnik, B.E., A. Croft, A. 1982. Managing pesticides resistance in crop-arthropod complexes: interactions between biological and operational factors. *Environmental Entomology* 11: 1137–1144.
- Tabashnik, B.E., Gould, F. & Carrieré, Y. 2004. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. *Journal of Evolutionary Biology*, 17:904–912.
- Technology Use Guide, 2007 - 2008. Disponível em: http://www.monsanto.com/monsanto/ag_products/pdf/stewardship/2008tug.pdf.
- Tyutyunov, Yu.V., Zhadanovskaya, E.A., Ardit, R., Medvinsky, A.B., 2007. A spatial model of the development of pest resistance to a transgenic insecticidal crop: European corn borer on Bt maize. *Biophysics* 52, 52–67
- Tyutyunov, Yu.V., Zhadanovskaya, E.A., Bourguey, D., Ardit, R. 2008. Landscape refuges delay resistance of the European corn borer to Bt-maize: A demo-genetic dynamic model. *Theoretical Population Biology* 74(1):138–146
- Vacher et al, 2003. Modelling the spatial configuration of refuges for a sustainable control of pests: a case study of Bt cotton. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 378–387
- Vacher, C.; Bourguet, D.; Desquilbet, M.; Lemarie, S.; Ambec, S. & Hochberg, M.E. 2006. Fees or refuges: which is better for the sustainable management of insect resistance to transgenic Bt corn? *Biology Letters* 2: 198–202
- Van Valen L. 1973: “A New Evolutionary Law”, *Evolutionary Theory* 1, p. 1–30.
- Vink, C.J., Phillips, C.B., Mitchell, A.D., Winder, L.M. & Cane, R.P. 2003. Genetic variation in *Microctonus aethiopicoides* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 28: 251–264.
- Wang, P.; Zhao, J.Z.; Rodrigo-Simón, A.; Kain, W.; Janmaat, A.F.; Shelton, A.M. Ferre, J. & Myers, J. 2007. Mechanism of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in a Greenhouse Population of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4): 1199–1207.
- Wenes, A-L., Bourguet, D., Andow, D.A., Courtin, C., Carré, G., Lorme, P., Sanchez, L. & Augustin, S. 2006. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity* 97, 127–134.
- Winder, L. M.; Goldson, S. L. & Lenney Williams, C. 1997. Genetic variation between two *Microctonus hyperodae* populations imported for control of argentine stem weevil. *Proc 50th N.Z. Plant Protection Conf.* 1997: 333–337.
- Wright, D. J.; Iqbal, M.; Granero, F. And Ferré, J. 1997. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for the field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1814–1819.
- Xu, X., L. Yu, and Y. Wu. 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:948–954.

