



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0720390-0 A2



(22) Data de Depósito: 26/12/2007
(43) Data da Publicação: 14/01/2014
(RPI 2245)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/82

(54) Título: MÉTODO PARA REDUZIR O
DESENVOLVIMENTO DE PRAGAS RESISTENTES EM
UM CAMPO DE CULTURAS TRANSGÊNICAS
RESISTENTES A PRAGA E MÉTODO DE MANEJO DE
RESISTÊNCIA DE PRAGAS EM UM TERRENO DE
CULTURAS RESISTENTES A PRAGA

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2006 US 60/871,671

(73) Titular(es): Pioneer Hi-Bred International, Inc.

(72) Inventor(es): Daniel J. Cosgrove, Paula M. Davis, Robert C.
Iwig

(74) Procurador(es): Ana Cristina Müller Wegmann

(86) Pedido Internacional: PCT US2007088829 de
26/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/080166de
03/07/2008

MÉTODO PARA REDUZIR O DESENVOLVIMENTO DE PRAGAS RESISTENTES EM UM CAMPO DE CULTURAS TRANSGÊNICAS RESISTENTES A PRAGA E MÉTODO DE MANEJO DE RESISTÊNCIA DE PRAGAS EM UM TERRENO DE CULTURAS RESISTENTES A PRAGA

5

REFERÊNCIA PARA PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade do Pedido Provisório Norte-Americano No. 60/871.671, depositado em 22 de dezembro de 2006, cujo conteúdo é incorporado por referência, na sua

10

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a métodos de manejo de desenvolvimento de parasitas resistentes.

15

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Insetos, nematóides, artrópodes e afins destroem anualmente um número estimado de 15% das culturas agrícolas nos Estados Unidos e ainda mais do que nos países em desenvolvimento. Anualmente, essas pragas causam mais de 100 bilhões de dólares em danos às culturas dos EUA sozinho. Além disso, a competição com ervas daninhas e plantas parasitas e saprófitas representam perdas de produtividade em potencial ainda maiores.

20

25

Alguns destes danos ocorrem no solo quando patógenos de plantas, insetos e outras pragas suportadas no solo atacam as sementes após o plantio. Na produção de milho, por exemplo, grande parte do dano é causada por lagartas de raiz (*rootworms*), insetos-praga que se alimentam em, ou danificam, de outra forma raízes da planta, e por lagartas de corte

30

(cutworms), broca de milho europeu, e outras pragas que se alimentam em, ou danificam, as partes da planta acima do solo. A descrição geral do tipo e mecanismos de ataque de pragas em culturas agrícolas é fornecida por, e.g., Metcalf (1962), in
5 *Destructive and Useful Insects*, 4th ed. (McGraw-Hill Book Co., NY); e Agrios (1988), in *Plant Pathology*, 3d ed. (Academic Press, NY).

Em uma batalha sazonal em curso, os agricultores devem aplicar bilhões de galões de pesticidas sintéticos para
10 combater estas pragas. No entanto, pesticidas sintéticos colocam muitos problemas. Eles são caros, custando aos agricultores americanos sozinhos quase 8 bilhões de dólares por ano. Eles forçam o aparecimento de pragas resistentes ao inseticida, e que podem prejudicar o ambiente.

15 Devido à preocupação com o impacto dos pesticidas sobre a saúde pública e a saúde do meio ambiente, importantes esforços têm sido feitos para encontrar maneiras de reduzir a quantidade de pesticidas químicos que são utilizados. Recentemente, grande parte deste esforço tem-se centrado sobre o desenvolvimento de
20 plantas transgênicas que são projetadas para expressar agentes tóxicos para insetos derivados de microrganismos. Por exemplo, Patente US No. 5877012 para Estruch et al. divulga a clonagem e expressão de proteínas a partir de organismos, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clavibacter* e *Rhizobium* em plantas para
25 se obter plantas transgênicas com resistência a pragas, tais como lagartas de rosca, lagartas militares, várias brocas e outras pragas. Publicação WO/EP97/07089 por Privalle et al. ensina a transformação de monocotiledôneas, tais como o milho, com uma sequência de DNA recombinante codificando peroxidase
30 para a proteção da planta contra a alimentação de brocas de

milho, lagartas de espiga e lagartas de corte. Jansens *et al.* (1997) *Crop Sci.*, 37(5): 1616-1624, relataram a produção de milho transgênico contendo um gene que codifica para uma proteína cristalina de *Bt* que controlava ambas as gerações de brocas do milho europeu (ECB). Patente US nos 5625136 e 5859336 para Koziel *et al.* informou que a transformação do milho com um gene de *Bt* que codifica para uma δ -endotoxina provém uma melhor resistência do milho transgênico ao ECB. Um relatório completo das triagens de campo de milhos transgênicos que expressam uma proteína inseticida de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) foi fornecida por Armstrong *et al.*, em *Crop Science*, 35(2) :550-557 (1995).

Uma abordagem ecologicamente amigável para controlar pragas é a utilização de proteínas cristalizadas pesticidas derivadas da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), vulgarmente designadas por "proteínas Cry" ou "peptídeo Cry". As proteínas Cry são moléculas de proteínas globulares que acumulam como protoxinas na forma cristalina durante a fase tardia da esporulação de *Bt*. Após o manejo pela praga, os cristais são solubilizados para liberar protoxinas no meio alcalino do intestino médio das larvas. Protoxinas (~ 130 kDa) são convertidas em fragmentos tóxicos (~ 66 kDa da região N terminal) por proteases do intestino. Muitas dessas proteínas são muito tóxicas para insetos-alvo específicos, mas inofensivas para as plantas e outros organismos não-alvo. Algumas proteínas Cry foram expressas de forma recombinante em plantas cultivadas para fornecer plantas transgênicas resistentes à praga. Entre essas, algodão e milho *Bt*-transgênicos têm sido amplamente cultivados.

Um grande número de proteínas Cry foi isolado, caracterizado e classificado com base em homologia de sequência de aminoácidos (Crickmore et al., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 807-813). Este sistema de classificação oferece um mecanismo sistemático para nomear e categorizar proteínas Cry recém-descobertas. A classificação Cry1 é a mais conhecida e contém o maior número de genes *cry*, que atualmente totaliza mais de 130.

Um biótipo ocidental da vaquinha (*western corn rootworm*, WCRW), que deposita seus ovos em soja e possivelmente outras culturas, é agora capaz de causar danos significativos para o milho de primeiro ano (ou seja, o milho que não tenha seguido sistematicamente milho). Esse biotipo é comumente chamado de vaquinha de primeiro ano ou vaquinha rotação-resistente. Milho de primeiro ano também pode ser suscetível a lesão de vaquinha quando os ovos permanecem no solo por mais de um ano. Nesta situação, os ovos depositados no ponto permanecem latentes durante todo o ano seguinte e, então, eclodem no próximo ano, quando o milho pode voltar a ser plantado em um ciclo de rotação de dois anos. Essa atividade da vaquinha é denominada sistema radicular diapausa prorrogada e é comumente associada à vaquinha do norte (*northern corn rootworm*, NCRW), especialmente na região noroeste do cinturão do milho (*Corn Belt*).

Além disso, a maioria dos países, incluindo os Estados Unidos, exige requerimentos de registro extensos necessários quando culturas transgênicas são usadas de forma a minimizar o desenvolvimento de parasitas resistentes, e, assim, prolongam a vida útil de bioinseticidas conhecidos. Um dos exemplos mais comuns de um refúgio é onde numa determinada cultura, 80% das sementes transgênicas plantadas pode conter um evento que mata

uma praga-alvo (tais como WCRW), mas 20% das sementes transgênicas não devem conter esse evento. O objetivo dessa estratégia de refúgio é impedir a pragas alvo de desenvolver resistência a um determinado biopesticida produzido pela cultura transgênica. Porque os insetos-alvo que atinjam a maturidade em 80% da área serão provavelmente transgênicos resistentes ao biopesticida usado lá, o refúgio permite desenvolver insetos adultos WCRW que não são resistentes ao biopesticida utilizado nas sementes transgênicas. Como resultado, os insetos não-resistentes cruzam com os insetos resistentes e, devido ao fato de que o gene resistente ser tipicamente recessivo elimina-se grande parte da resistência na próxima geração de insetos. O problema desta estratégia é que o refúgio, a fim de se produzir insetos suscetíveis, deve ter algumas das culturas plantadas sendo sensíveis às pragas, reduzindo assim a produtividade.

Como indicado acima, uma preocupação é que ECB, WCRW, ou outras pragas resistentes surgirão. Uma estratégia para combater o desenvolvimento de resistência é a de selecionar um evento de milho recombinante que expressa altos níveis da proteína inseticida tais que uma ou algumas mordidas de uma planta milho transgênico provocaria, pelo menos, cessação total da alimentação e posterior morte da praga, mesmo se a praga é heterozigótica para a resistência característica (ou seja, a praga é o resultado do acasalamento de uma praga resistente com uma praga não-resistente).

Outra estratégia seria a de combinar uma segunda proteína inseticida específica para ECB ou WCRW sob a forma de um evento recombinante na mesma planta ou em uma planta adjacente, por exemplo, outra proteína Cry inseticida ou, em alternativa,

outra proteína recombinante, tais como uma lipídio acil hidrolase ou inseticida variante desta. Ver, por exemplo, WO 01/49834. Preferencialmente, a segunda toxina ou complexo de toxinas teria um modo de ação diferente da primeira toxina, e de preferência, se receptores estiverem envolvidos na toxicidade do inseto com a proteína recombinante, os receptores para cada uma das duas ou mais proteínas inseticidas em uma mesma planta ou numa planta adjacente seriam diferentes, para que se uma mudança de função de um receptor ou uma perda de função de um receptor se desenvolvesse como a causa da resistência a uma proteína inseticida particular, então ela não deveria e provavelmente não iria afetar a atividade inseticida da toxina restante que ligaria-se a um receptor diferente do receptor causador da perda de função de uma das duas proteínas inseticidas clonadas em uma planta. Assim, o primeiro um ou mais transgenes e o segundo um ou mais transgenes são inseticidas preferenciais ao mesmo inseto-alvo e se ligam sem competição a diferentes sítios na membrana intestinal do inseto-alvo.

Outra estratégia ainda seria combinar um pesticida químico com uma proteína pesticida expressa em uma planta transgênica. Este poder vir a assumir a forma de um tratamento químico de sementes recombinantes que permitiria a dispersão em uma zona em torno da raiz de uma quantidade pesticida controle de pesticidas químicos, que protegem os tecidos da raiz de infestação de pragas-alvo, por tanto tempo quanto o produto químico persista, ou o tecido da raiz se mantenha dentro da zona de dispersão do pesticida no solo.

Outra alternativa para as formas convencionais de aplicação de pesticidas é o tratamento de sementes de plantas

com pesticidas. O uso de fungicidas e nematicidas para proteger as sementes, raízes jovens, brotos do ataque após o plantio e germinação, bem como a utilização de baixos níveis de inseticidas para a proteção, por exemplo, de sementes de milho
5 contra larva-arame, têm sido utilizadas há algum tempo. Tratamento de sementes com pesticidas tem a vantagem de proporcionar a proteção das sementes, enquanto minimiza a quantidade de pesticida necessária e limita a quantidade de contato com o pesticida e o número de diferentes aplicações
10 necessárias para se alcançar o controle de pragas no campo.

Outros exemplos de controle de pragas através da aplicação de inseticidas diretamente em sementes plantadas são fornecidos, por exemplo, Patente US No. 5696144, que divulga que ECB causou menos danos de alimentação em milho cultivado a
15 partir de sementes tratadas com o composto 1-arilpirazole a uma taxa de 500 g por quintal de sementes do que em plantas controle crescidas a partir de sementes não tratadas. Além disso, Patente US No. 5876739 para Turnblad et al. (e a patente para o pedido original, Patente US No. 5849320) divulga um
20 método de controle de insetos nascidos no solo que envolve o tratamento das sementes com um revestimento contendo um ou mais ligantes poliméricos e um inseticida. Esta referência fornece uma lista de inseticidas que se identificam como candidatos para serem utilizados neste revestimento e também nomeia um
25 número de potenciais insetos-alvo.

Embora os desenvolvimentos recentes da engenharia genética de plantas têm melhorado a capacidade de proteger as plantas de pragas sem usar pesticidas químicos, e enquanto tais técnicas, tais como o tratamento de sementes com pesticidas têm reduzido
30 os efeitos nocivos dos pesticidas no ambiente, muitos problemas

subsistentes limitam o êxito da aplicação destes métodos em reais condições de campo.

Manejo de insetos resistentes (do inglês, IRM) é o termo usado para descrever práticas destinadas a reduzir o potencial de insetos-praga de se tornar resistentes a um pesticida. Manutenção de *Bt* IRM é de grande importância devido à ameaça que os insetos resistentes representam para o futuro uso de *Bt* protetores plantas-incorporados e tecnologia *Bt* como um todo. Estratégias IRM específicas, tais como a estratégia de dose elevada / refúgio estruturado, mitigam a resistência de insetos a proteínas *Bt* específicas produzidas em milho, algodão e batata. No entanto, essas estratégias resultam em terrenos de culturas de milho deixadas suscetíveis a uma ou mais pragas, a fim de garantir que insetos não resistentes se desenvolvam e tornem-se disponíveis para acasalamento com qualquer parasita resistente produzido em culturas protegidas. Assim, da perspectiva de um agricultor / produtor, é altamente desejável se ter um refúgio tão pequeno quanto possível, e ainda gerir resistência de insetos, a fim de que o maior rendimento seja obtido, enquanto ainda se mantém a eficácia do método antiparasitas utilizado, quer *Bt*, químicos, outro método, ou combinações dos mesmos.

As estratégias IRM mais freqüentemente utilizadas atualmente são uma dose elevada e a plantação de um refúgio (uma parte do total da área plantada com sementes não-*Bt*), como é comumente-acreditado que isso irá atrasar o desenvolvimento da resistência dos insetos a culturas *Bt* pela manutenção da suscetibilidade do inseto. A estratégia de dose mais elevada / refúgio assume que a resistência ao *Bt* é recessiva e é conferida por um único locus com dois alelos, resultando em

três genótipos: homozigotos suscetíveis (SS), heterozigotos (RS), e homozigotos resistentes (RR). Ele também pressupõe que haverá uma baixa frequência inicial do alelo resistente e que haverá um extenso acasalamento aleatório entre adultos resistentes e suscetíveis. Sob circunstâncias ideais, apenas raros indivíduos RR irão sobreviver a uma dose elevada de *Bt* produzida pela cultura. Ambas os indivíduos SS e RS serão suscetíveis à toxina *Bt*. Um refúgio estruturado não-*Bt* é uma porção do campo ou conjunto de campos de um agricultor que prevê a produção de espécies de insetos sensíveis (SS) que podem copular aleatoriamente com os raros insetos resistente (RR) sobreviventes a *Bt* para a produção de culturas suscetíveis RS heterozigotas que irão ser mortas pela cultura *Bt*. Isto irá remover alelos resistentes (R) das populações de inseto e atrasar a evolução da resistência. MON810 e *Bt11* são produtos que se acredita ser de "dose elevada" atualmente à disposição.

A estratégia de dose mais elevada / refúgio é a estratégia preferida atualmente para IRM. Estratégias de dose não-alta são atualmente utilizadas em uma estratégia IRM aumentando o tamanho do refúgio. O refúgio é aumentado, porque a falta de uma dose elevada pode permitir a sobrevivência de resistentes parciais (ou seja, insetos heterozigotos com um alelo de resistência), aumentando a frequência dos genes de resistência em uma população de insetos. Por esta razão, muitos pesquisadores e grupos de peritos IRM têm concordado em que dose não elevada de expressão *Bt* apresenta um risco substancial de resistência em relação à dose elevada de expressão (Roush 1994, Gould 1998, Onstad & Gould 1998, SAP 1998, ILSI 1998, UCS 1998, SAP 2001). No entanto, essas estratégias de dose não elevada são normalmente inaceitáveis para o agricultor, uma vez

que o maior tamanho do refúgio resulta em novas perdas de rendimento.

Atualmente, o tamanho, localização e manejo do refúgio são considerados críticas para o sucesso da estratégia de alta dose / refúgio estruturado para mitigar a resistência de inseto as proteínas *Bt* produzidas no milho, algodão e batata. Refúgios estruturados são geralmente necessários para incluir todas as plantas não *Bt* hospedeiras susceptíveis para uma praga-alvo que são plantadas e geridas por pessoas. Estes refúgios poderiam ser plantados para oferecer refúgios, ao mesmo tempo em que as culturas *Bt* estão disponíveis para as pestes ou nos momentos em que as culturas *Bt* não estão disponíveis. Os problemas com esses tipos de refúgios incluem a garantia do cumprimento dos requisitos por agricultores individuais. Devido à diminuição da produtividade em áreas de plantação refúgio, alguns agricultores optam por se afastar dos requisitos do refúgio, e outros não seguem os requisitos de tamanho e / ou colocação. Estas questões de não-cumprimento resultam tanto em ausência de refúgio ou em refúgios menos eficazes, e um correspondente aumento no desenvolvimento de pragas resistentes.

Broca de milho Européia (do inglês, ECB)

ECB é uma das principais pragas do milho ao longo da maior parte dos Estados Unidos. A praga tem 1-4 gerações por ano, com univoltina (isto é, uma geração por ano) em populações do extremo norte (isto é, todo o North Dakota, norte do South Dakota, no norte de Minnesota, e norte de Wisconsin), bivoltine (ou seja, duas gerações por ano) a maioria das populações em todo o Cinturão do Milho (*Corn Belt*), e multivoltina (3-4 gerações) as populações do Sul (Mason et al. 1996). Um resumo

dos principais aspectos da biologia do ECB que se relacionem com a IRM é apresentado abaixo:

Movimento Larval

Larvas ECB são capazes de significativa circulação planta-a-
5 planta nos campos de milho. Pesquisas conduzidas em milho não-transgênico demonstraram que a grande maioria das larvas não se move mais do que duas plantas consecutivas dentro da fileira (Ross & Ostlie 1990). No entanto, no milho transgênico, dados não publicados (usado no trabalho de modelagem) de F.
10 Gould (citados em Onstad & Gould 1998) indicam que aproximadamente 98% dos neonatos suscetíveis a ECB se afastam das plantas contendo *Bt*. Em estudo de múltiplos-anos recente de Hellmich (1996, 1997, 1998) tentou-se quantificar a extensão do movimento larval planta-a-planta.

15 Observou-se que a 4ª larva instar era capaz de circular em até seis plantas de milho dentro de uma linha e seis plantas de milho através das linhas a partir de um ponto de libertação. O movimento dentro de uma linha era muito mais provável do que movimento através da linha (não é surpreendente, devido ao fato
20 de que as plantas que estão na fila são mais susceptíveis de ser "tocadas" em oposição aquelas através das linhas). Na verdade, a grande maioria dos movimentos através das fileiras foi limitada a uma planta. Este tipo de informação tem implicações óbvias para ótimo desenho do refúgio. O
25 deslocamento das larvas ao longo dos milhos *Bt* e não-*Bt* podem ser expostos a doses sub-letais de proteína, aumentando a probabilidade de resistência (Mallet & Porter 1992). Dada a amplitude do movimento do ECB larval entre plantas, a crença predominante é que sementes mistas são uma opção de refúgio
30 inferior (Mallet & Porter 1992, SAP 1998, Onstad & Gould 1998).

Movimento Adulto

Informações sobre o movimento de adultos ECB (pós-eclosão pupal) é necessário para se determinar as orientações de proximidade adequadas para refúgios. Refúgios devem ser estabelecidos dentro da gama de vôo de adultos recentemente emergidos para ajudar a garantir o potencial de acasalamento aleatório. Um amplo projeto, múltiplo-ano para investigar dispersão de adultos ECB foi realizado pela Universidade de Nebraska (Hunt et al. 1997, 1998a). Os resultados de marcação e recaptura desses estudos (com os adultos recém-emergidos, pré-acasalados) mostrou que a maioria dos adultos ECB não se dispersa longe dos seus sítios de emergência. A percentagem recapturada era muito baixa (<1%) e a maioria dos que foram recapturados foram capturados dentro de 1500 pés do sítio de lançamento. Poucas mariposas foram capturadas fora dos 2000 pés. Estes resultados têm conduzido especificamente às recomendações e orientações para proximidade e implantação de refúgio.

Comportamento de acasalamento

Além dos padrões de circulação dos adultos ECB, o comportamento de acasalamento é uma consideração importante para assegurar acasalamento ao acaso entre mariposas potencialmente sensíveis e resistentes. Em particular, é importante se determinar onde as fêmeas recém-emergidas acasalam (ou seja, perto do local da emergência ou após alguma dispersão). Está bem estabelecido que muitos ECB aproveitam os sítios de agregação (geralmente agrupamentos das plantas daninhas ou gramíneas), perto de campos de milho para acasalamento. Fêmeas geralmente acasalam na segunda noite após eclosão pupal (Mason et al. 1996). Um estudo recente sugere que

é possível manipular as agregações locais para aumentar a probabilidade de cruzamento ao acaso entre ECB potencialmente sensíveis e resistentes (Hellmich et al. 1998). Outro estudo recente (estudos de marcação / recaptura com ECB recém-eclodidos) realizado pela Universidade de Nebraska revelou que
5 relativamente poucas fêmeas não acasaladas saíram dos campos de milho a partir do qual surgiram como adultos (Hunt et al. 1998b). Isso foi especialmente verdadeiro nos campos de milho irrigados (isto é, atrativos). Além disso, uma percentagem
10 relativamente elevada de fêmeas capturadas perto do ponto de lançamento (dentro de 10 pés) tinha acasalado. Este trabalho sugere que as fêmeas acasalam muito perto do ponto de emergência e que os refúgios podem precisar ser colocados muito perto dos campos *Bt* (ou como refúgios no campo) para maximizar
15 a probabilidade de acasalamento ao acaso.

Em termos de comportamento masculino no acasalamento, um estudo realizado por Showers et al. (2001) olhou para a dispersão masculina para localizar companheiras. O estudo foi realizado utilizando técnicas de marcação-recaptura com
20 armadilhas de ferormônio-iscados colocadas a 200, 800, 3200 e 6400m de um ponto de libertação. Os resultados mostraram que os machos em busca de companheiras foram capturados com mais frequência nas armadilhas colocadas a 200m a partir do sítio de liberação. No entanto, números significativos também foram
25 capturados a 800m ou superior a partir do sítio de liberação (Showers et al. 2001). Semelhante à Hunt et al., este trabalho sugere que os refúgios podem precisar ser colocados relativamente perto dos campos *Bt* para maximizar o acasalamento ao acaso.

Comportamento de Oviposição

O comportamento de oviposição de ECB (postura de ovos) também é importante para a concepção do refúgio. Por exemplo, se uma postura dentro de campo milho não é aleatória, certos tipos de refúgio (isto é, em linhas de campo) podem não ser eficazes. Após o acasalamento, que ocorre principalmente nos locais de agregação, as fêmeas deslocam-se para encontrar milhos hospedeiros aptos para a oviposição. A maioria das fêmeas irá pôr ovos em campos de milho perto dos sítios de agregação, desde que sejam milhos hospedeiros aceitáveis. As desovas começam após o acasalamento e ocorrem principalmente durante a noite. Os ovos são estabelecidos em grupos de até sessenta ovos (um ou mais grupos são depositados por noite) (Mason et al. 1996).

Sabe-se que as fêmeas preferem geralmente campos de milho mais altos e mais vigorosos para a oviposição (Beck 1987). Isto tem implicações para a concepção do refúgio. Para evitar potencial discriminação de hospedeiro dentre as fêmeas ovipositoras, o milho híbrido não *Bt* selecionado para refúgio deve ser semelhante ao milho híbrido *Bt* em termos de crescimento, maturidade, rendimento e práticas de manejo (ou seja, data de plantação, manejo de plantas daninhas, e de irrigação). Deve-se notar que a investigação não demonstrou nenhuma diferença significativa nas preferências de oviposição entre milho *Bt* e não-*Bt* (derivado da mesma linhagem), quando as características fenológicas e de manejo são semelhantes (Landis & Orr 1997, Hellmich et al. 1999). Dentro de um campo de milho adequado para postura de ovos, pensa-se que a oviposição seja aleatória e não restrita as linhas de fronteira perto dos locais de agregação (Shelton et al. 1986, Calvin 1998).

Gama de Hospedeiro

ECB é uma praga polífaga que infesta sabidamente mais de 200 espécies de plantas. Entre as plantas hospedeiras do ECB estão um número de espécies de plantas daninhas comuns, o que

5 levou alguns a especular que pode ser possível que as ervas daninhas sirvam como um refúgio de ECB para milho *Bt*, um conceito comumente referido como "refúgio desestruturado". Em resposta a isso, uma série de projetos de investigação recentes têm investigado a viabilidade de ervas daninhas como refúgio.

10 Estudos conduzidos pela Hellmich (1996, 1997, 1998) demonstraram que as plantas daninhas são capazes de produzir ECB, embora os números eram variáveis e demasiado inconsistente para ser uma fonte confiável do refúgio ECB. Esta conclusão foi também atingida pelo SAP Subpanel em IRM de 1998. Além de

15 plantas daninhas, um número de culturas de grãos (por exemplo, trigo, sorgo, aveia) tem sido investigado como um potencial refúgio de ECB para o milho *Bt* (Hellmich 1996, 1997, 1998, Mason et al. 1998). Nestes estudos, culturas de grãos pequenos geralmente produziram menos ECB do que milho (milho pipoca ou

20 de campo) e foram considerados, portanto, improváveis para produzir insetos adultos suscetíveis o suficiente para ser um refúgio aceitável. Portanto, com base no atual estado da técnica, uma melhoria em relação ao IRM ECB é necessária.

25 **Lagarta de Espiga de Milho (do inglês, CEW)**

Tal como acontece com ECB, o SAP de 1998 identificou um conjunto de domínios de investigação que necessitam de mais trabalhos com CEW. Além de aumentar o conhecimento quanto ao movimento de larvas / adultos, comportamento de acasalamento e

30 comportamento de oviposição, uma melhor compreensão da

circulação entre milho / algodão e migração de longa distância, também é necessária (SAP 1998). Investigações adicionais relativas à biologia de CEW têm ocorrido desde 1998. Estes dados foram apresentados como parte dos relatórios anuais de
5 investigação exigida como condição para a matrícula de tais culturas *Bt* antes que o uso comercial seja permitido. A Agência analisou estes dados e concluiu que as informações adicionais seriam úteis para melhorias de longo prazo eficazes das estratégias IRM para mitigar a resistência de CEW.

10 Gama de Hospedeiro e Movimento em Milho e Algodão

CEW é um inseto polífaga (3-4 gerações por ano), que se alimentam de um número de grãos e hortaliças, além de ervas daninhas e outros hospedeiros selvagens. Normalmente, pensa-se que CEW se alimenta de hospedeiros selvagens e / ou milho por
15 duas gerações (primeira geração, em fase de verticilo de milho, segunda geração, em fase de espiga milho). Depois da senescência do milho, CEW move-se para outros hospedeiros, notavelmente, algodão, por mais 2-3 gerações adicionais. Ao utilizar múltiplos anfitriões dentro do mesmo período
20 vegetativo, CEW apresenta um desafio ao manejo de resistência *Bt* uma vez que existe o potencial para dupla exposição à proteína *Bt* em ambos os milho *Bt* e algodão *Bt* (potencialmente até cinco gerações de exposição em algumas regiões).

Comportamento durante invernada

25 CEW são conhecidos por passar o inverno em fase pupal. Embora se saiba que CEW migra em direção ao norte durante a época de crescimento para as regiões de cultivo de milho (ou seja, os cinturões de milho (*Corn Belt*) do U.S e Canadá), tipicamente CEW não são capazes de passar o inverno nestas
30 regiões. Pelo contrário, CEW são conhecidos por passar o

inverno no sul do país, muitas vezes em campos de algodão. Pensa-se que as práticas de cultivo, temperatura, umidade, todas representam algum papel na sobrevivência de CEW durante o inverno (Caprio & Benedict 1996).

5 O período invernal é uma consideração importante para insetos IRM-resistentes que devem sobreviver ao inverno para passar os seus genes de resistência às gerações futuras. No Corn Belt, por exemplo, CEW incapaz de passar o inverno não deve representar uma ameaça de resistência. Dado que diferentes
10 estratégias de refúgio podem ser desenvolvidas com base em onde CEW é uma ameaça de resistência, dados de amostragem precisos podem contribuir para prever com precisão as áreas adequadas de CEW durante o inverno.

Movimentação e Migração de Adultos

15 CEW é conhecido por ser uma praga altamente móvel, capaz de significativa movimentação de longa distância. Estudos de marcação / recaptura têm mostrado que mariposas CEW são capazes de dispersar distâncias variando de 0,5 km (0,3 mi.) a 160 km (99 mi.); Algumas migrações de até 750 km (466 mi.), também
20 foram anotadas (Caprio & Bento 1996). O padrão geral de migração é um movimento em direção ao norte, seguindo os padrões predominantes dos ventos, com mariposas originárias em sítios de invernada no sul se deslocando para regiões de cultivo de milho no norte dos EUA e Canadá.

25 Tem-se assumido que a migração de CEW procede progressivamente em direção ao norte ao longo do decurso da temporada de crescimento. No entanto, as observações feitas pelo Dr. Fred Gould (NC State University) indicam que CEW pode também mover-se das regiões de cultivo de milho em direção ao
30 sul, de volta as regiões de algodão do Sul (descrito em

observações feitas no Workshop da EPA / USDA em 1999 sobre manejo de Resistência a Milho *Bt* em algodão, Memphis, TN, 26/8/99). Se isso for verdade, o resultado pode ser exposição adicional de CEW a culturas *Bt*. Além disso, os pressupostos relativos à invernada de CEW podem necessitar de ser revisitados - mariposas que se pensava serem incapazes de sobreviver ao inverno (e, portanto, não eram uma ameaça de resistência) podem no entanto se deslocarem para sul, até encontrar sítios adequados para passar o inverno.

A maioria dos movimentos de vôo de CEW é local, e não migratórios. Mariposas *Heliothine* movem-se principalmente à noite, com mariposas pós-eclosão voando normalmente distâncias curtas e inferiores a 200 m (Caprio & Benedict 1996). No entanto, como foi indicado pela SAP 1998, investigações adicionais seriam úteis, particularmente no que se refere à CEW e desenho de refúgio ótimo. Por outro lado, dado os movimentos de longa distância típicos de CEW e a falta de alta dose em híbridos de milho *Bt*, a SAP 2000 constatou que a colocação do refúgio para essa praga é de menor importância do que para outras pragas (por exemplo, ECB) (PEA 2001).

Comportamento de acasalamento / Oviposição

O Dr. Michael Caprio (entomólogo, Mississippi State University), indicou que existe um acasalamento localizado significativo entre as fêmeas (ou seja, dentro de 600 metros (1969 pés) da eclosão pupal), normalmente com machos que apareceram nas proximidades ou moveram-se antes da eclosão das fêmeas (Caprio 1999). Fêmeas CEW normalmente depositam os ovos isoladamente nos hospedeiros. Um recente estudo (realizado em campos de algodão) constatou que 20% dos ovos encontrados a partir de fêmeas CEW liberadas estavam dentro de 50-100 m (164-

328 ft) do ponto de libertação, indicando alguma oviposição localizada. No entanto, os machos mostraram-se capazes de se movimentar por mais de 350 m (1148 pés) para copular com as fêmeas (Caprio 2000). Estes dados indicam que, em termos de
5 CEW, refúgios podem não ter de ser incorporados ou estar imediatamente adjacentes a um campo *Bt* para serem eficazes (embora os dados não excluam estas opções). Investigações adicionais com comportamento de acasalamento e oviposição iram fornecer informações úteis para IRM de CEW.

10 Movimento Larval

Larvas CEW, especialmente depois de ínstaes, são capazes de movimento de planta para planta. Na recomendação do SAP (1998), a EPA eliminou a mistura de sementes como uma opção viável de refúgio de algodão *Bt* para CEW. Assim, uma estratégia
15 para melhorar IRM de CEW também é necessária.

Brocas de Milho do Sudoeste (do inglês SWCB)

Alguns dados da biologia das pragas SWCB foram fornecidos à EPA como parte dos relatórios anuais de investigação exigida
20 como uma condição de inscrição. No entanto, ainda há relativamente pouca informação disponível. A SAP de 1998 notou a relativa falta de informação para SWCB, concluindo que uma pesquisa crítica é necessária para a SWCB, incluindo: movimento de curto-prazo, migração de longa distância, acasalamento e
25 comportamento em relação à circulação (ou seja, saber se o acasalamento ocorre antes ou depois da migração). Devido a isso, no atual estado da técnica, desconhece-se se as estratégias concebidas para IRM de ECB (outra peste perfurante de milho) também irão funcionar otimamente para SWCB.

SWCB é uma praga de milho econômica em algumas áreas (por exemplo, Kansas PB, SE Colorado, Norte do Texas, Oklahoma ocidental) e pode exigir manejo regular. Como ECB, SWCB tem 2/4 gerações e comportamento alimentar semelhante. A primeira
5 geração de larvas se alimenta no tecido verticilo antes de perfurar túneis nos caules antes da pupação, enquanto as gerações futuras se alimentam de tecido de espiga antes de perfurar túneis nos caules. Fêmeas geralmente acasalam na noite de emergência e podem depositar 250-350 ovos (Davis 2000).

10 A pesquisa para investigação dos padrões de circulação de SWCB foi iniciada (Buschman et al. 1999). Neste estudo de marcação / recaptura, as seguintes observações foram feitas em relação à SWCB dos dados de 1999: 1) foram capturados mais machos que fêmeas em grandes distâncias a partir do ponto
15 lançamento (semelhante ao ECB); 2) a maioria das SWCB foram recapturas de 100 pés do local de libertação, embora alguns, também se verificaram em 1200 pés, e 3) os padrões de circulação das mariposas ECB e SWCB parece ser semelhantes em relação à maioria. Perante estes resultados, é provável que
20 esta parte da estratégia IRM (diretrizes de proximidade de refúgio estabelecidas para ECB) também será aplicável aos SWCB. No entanto, os resultados de 1999 foram dificultados pelo baixo número de SWCB disponíveis para os ensaios e os autores indicaram que esse trabalho vai continuar durante a temporada
25 2000.

Investigação para outras pragas secundárias (por exemplo, BCW, FAW, SCSB, outros) também é inexistente e poderia ser útil para regiões específicas em que estes parasitas podem representar uma preocupação adicional. No entanto, a SAP 1998

indicou que CEW e SWCB devem ter a mais alta prioridade para as pesquisas biológicas entre as pragas de milho secundárias.

Com base nestas características e comportamento de pragas agrícolas, a estratégia de refúgio mais comumente utilizada é conhecida como um refúgio "bloco" ou refúgio de "tira". O grupo NF-205 recomendou três opções de posicionamento de refúgio em relação a milho *Bt*: blocos plantados adjacentes aos campos, blocos plantados dentro do campo, ou tiras plantadas dentro dos campos (Ostlie et al. 1997). Em geral, os refúgios podem ser utilizados como blocos externos nas bordas ou cabeceiras de campos ou como tiras dentro do campo de milho *Bt*. A investigação demonstrou que larvas ECB são capazes de passar até seis plantas de milho dentro ou entre as fileiras com a maioria dos movimentos ocorrendo dentro de uma única fileira. Instar ECB posterior (4^a e 5^a) são mais susceptíveis de circular na linha do que entre as linhas (Hellmich 1998). Este é um motivo de preocupação porque as larvas ECB heterozigotas (parcialmente resistente) podem começar a se alimentar de plantas *Bt* e, em seguida, passar para plantas não-*Bt* (se plantadas nas proximidades) para completar o desenvolvimento, frustrando assim a estratégia de alta dose e aumentando o risco de resistência. Por esta razão, a mistura de sementes (refúgio criado pela mistura de sementes na tremonha) não são refúgios normalmente recomendados (Mallet & Porter 1992, Buschman et al. 1997).

Buschman et al. (1997) sugeriram que o refúgio no campo é a estratégia ideal para um programa IRM. Dado que as larvas ECB tendem a se deslocar dentro de linhas, os autores sugerem linhas de milho intactas como um refúgio aceitável. Tiras estreitas (preenchendo uma ou duas caixas de plantas com

sementes de milho não-*Bt*) ou largas (enchendo toda a caixa de planta com sementes não-*Bt*) podem ser usadas como refúgios no campo. Os dados indicam que, tiras no campo podem fornecer a melhor oportunidade para o ECB produzido no milho *Bt* em copular com ECB proveniente de milho não-*Bt*. Uma vez que os dados preliminares sugerem que o refúgio deve ser de 100 linhas do milho *Bt*, Buschman et al. (1997) recomendou alternar tiras de 96 linhas de milho não-*Bt* e 192 linhas de milho *Bt*. Isso resultaria em um refúgio de 33% que está dentro de 100 linhas do milho *Bt*.

Atualmente, tiras no campo (plantadas como linhas completas) devem estender o comprimento total da área e incluir um mínimo de seis linhas cultivadas com milho não *Bt* alternando com um milho híbrido *Bt*. NF-205 tem recomendado plantar seis a 12 linhas de milho não-*Bt*, quando se está implementando estratégia de refúgio de faixa no terreno (NF 205 Suplemento 1998). A SAP 2000 também concordou que, devido à circulação larval, tiras de refúgio maiores são superiores às tiras mais estreitas, embora os tamanhos das caixas de plantio possam restringir os tamanhos da tira para alguns pequenos produtores (PAS 2001). Tiras no campo podem oferecer o maior potencial para garantir acasalamento ao acaso entre adultos suscetíveis e resistentes, pois podem maximizar mistura gênica de adultos. Modelagens indicam que, pelo menos, seis faixas de linhas largas são tão eficazes para o IRM de ECB como blocos adjacentes quando um refúgio de 20% é usado (Onstad & Guse 1999). No entanto, faixas que são apenas duas fileiras de largura podem ser tão eficazes como blocos, mas podem ser mais arriscadas do que tanto blocos ou faixas largas, dada a nossa

compreensão incompleta das diferenças na sobrevivência entre brocas suscetíveis e heterozigotas (Onstad & Gould 1998).

Dadas as preocupações atuais com a circulação de larvas e a necessidade de acasalamento ao acaso, tanto blocos externos, 5 ou tiras no campo (ao longo de todo o campo, pelo menos 6 linhas de largura) são os desenhos de refúgio que podem proporcionar a maior redução no risco de desenvolvimento de resistência. Pesquisas indicam que acasalamento ao acaso é mais provável de ocorrer no campo de tiras. Contudo, tal como 10 referido anteriormente, esta estratégia IRM apresenta problemas tanto da perspectiva de danos às culturas como de cumprimento por parte do agricultor.

Além disso, baseado no conhecimento científico existente, refúgios devem ser localizados atualmente de modo que o 15 potencial de acasalamento aleatório entre mariposas suscetíveis (provenientes do refúgio) com possíveis sobreviventes resistentes (provenientes do campo *Bt*) é maximizado. Portanto, o comportamento de voo de uma praga é uma variável crítica a se considerar quando se fala de proximidade de refúgio. Refúgios 20 plantados como externas devem ser blocos adjacentes ou nas proximidades do campo de milho *Bt* (Onstad & Gould 1998, Ostlie et al. 1997b). NF-205 recomendou inicialmente que os refúgios devem ser plantados dentro de secções $\frac{1}{2}$ (320 acres) (NC-205 Suplemento 1998). Posteriormente, a recomendação foi revista 25 para especificar que refúgios de milho não-*Bt* devem ser colocados dentro de $\frac{1}{4}$ milha do campo *Bt* ($\frac{1}{4}$ de milhas seria ainda melhor) (Ortman 1999).

Hunt et al. (1997) concluíram um estudo que sugere que a maioria dos ECB não dispersam muito longe de seus locais de 30 emergência pupal. De acordo com este estudo de marcação-

recaptura, a maioria dos ECB não pode dispersar mais de 1500 a 2000 pés. A maioria (70-98%), dos ECB recapturados foi presa dentro de 1500 pés do ponto de libertação. No entanto, num adendo do estudo de 1997, os autores atentam que a distância de 5 1500 pés não representa necessariamente a distância máxima de dispersão do ECB (Hunt et al. 1998a).

Outro projeto de marcação-recaptura de ECB foi dedicado à circulação do ECB emergente dentro de campo (em particular fêmeas não acasaladas) (Hunt et al. 1998b). Relativamente 10 poucas fêmeas não acasaladas foram recapturadas (10 durante todo o experimento), no entanto, a maioria destas foi encontrada dentro de 85 pés do ponto de libertação. Isto sugere que as fêmeas não acasaladas podem não dispersar muito longe do ponto de eclosão pupal (isto é especialmente verdade no campo 15 irrigado). Além disso, uma percentagem relativamente elevada de fêmeas acasaladas (31%) em campos irrigados foi capturada dentro de 10 pés do ponto de libertação, sugerindo que o acasalamento ocorreu muito próximo ao ponto de emergência. Ambas estas observações indicam que muitas fêmeas ECB 20 emergentes não podem dispersar fora da sua área de origem. No que diz respeito ao manejo da resistência e proximidade de refúgio, estes resultados sugerem que refúgios deverão ser colocados na proximidade de campos de milho *Bt* (ou como refúgios no campo) para aumentar a chance de acasalamento ao 25 acaso (em especial para as áreas irrigadas).

Em termos de dispersão de ECB do sexo masculino, outro estudo de marcação e recaptura de Showers et al. (2001) mostrou que os machos que dispersam em busca de parceiras podem deslocar-se a distâncias significativas (> 800m). No entanto, 30 uma maior percentagem de machos foi capturada em distâncias

próximas (200m) do ponto de libertação. Com base nesta pesquisa, os autores sugerem que, em termos de circulação de machos, as orientações de proximidade dos refúgios atuais de $\frac{1}{2}$ milha, devem ser suficientes para garantir acasalamento entre
5 mariposas suscetíveis e quaisquer sobreviventes resistentes do campo *Bt*.

Embora seja claro que a dispersão de ECB diminui ainda mais a partir de pontos de emergência pupal, o comportamento da dispersão quantitativa ECB não foi totalmente determinado. No
10 entanto, em termos de posicionamento ótimo de refúgio, sob as normas atualmente aceitas, é considerado crítico que a proximidade do refúgio seja selecionada para maximizar o potencial de acasalamento aleatório. Baseado em dados de Hunt et al., quão mais perto o refúgio está do milho *Bt*, menor o
15 risco de resistência. Uma vez que o maior número de ECB foi capturado dentro dos 1.500 pés do campo e que a maioria das fêmeas deve copular dentro dos dez pés do campo, colocar os refúgios o mais perto possível dos campos *Bt* deve aumentar a probabilidade de acasalamento ao acaso e diminuir o risco de
20 resistência. Atualmente, a exigência de proximidade de milho *Bt* é de $\frac{1}{2}$ milhas ($\frac{1}{4}$ milha em áreas onde inseticidas têm sido historicamente utilizado para tratar do ECB e do SWCB) (carta EPA para milho *Bt* registrados, 31/1/00). O SAP 2000 concordou com essa orientação, afirmando que o refúgio deve ser
25 localizado a não mais do que meia milha (se possível dentro de $\frac{1}{4}$ de milhas) a partir do campo de milho *Bt* (SAP 2001).

Evidentemente, cada uma destas opções de refúgio (blocos, tiras, e semelhantes) apresenta desafios adicionais na sua execução. Como observado anteriormente, esses métodos deixam
30 porções do campo de um agricultor suscetíveis à infestação por

insetos, a fim de assegurar que espécies de insetos sensíveis se desenvolvam e estejam disponíveis para acasalar com quaisquer pragas resistentes no campo. Isso resulta em uma perda substancial de rendimento, como atualmente tais refúgios
5 devem abranger pelo menos 20% do campo. Devido à diminuição da produtividade associada à porção de refúgio das culturas transgênicas resistentes a pragas, existem também problemas com o cumprimento por parte do agricultor para com os requisitos de refúgio como se referiu anteriormente.

10

Refúgio Temporal e Espacial

A utilização de mosaicos temporais e espaciais tem recebido alguma atenção como estratégias alternativas para refúgios estruturados para se atrasar resistência. Um refúgio
15 temporal, em teoria, poderia manipular o ciclo de vida do ECB, tendo a porção das culturas *Bt* plantadas numa altura em que seria mais atrativo ao ECB. Por exemplo, campos de milho *Bt* seriam plantados várias semanas antes do milho convencional. Por se esperar que ECB ponha ovos preferencialmente em plantas
20 de milho mais altas, a esperança é que os milhos *Bt* serão infestados, em vez dos milhos convencionais, mais curtos e menos atraentes. No entanto, há indicações de peritos no campo que, refúgios temporais são uma alternativa inferior aos refúgios estruturados (SAP 1998). A investigação demonstrou que
25 a data de plantio não pode ser usada para prever com precisão e manipular taxas de oviposição de ECB (Calvin et al. 1997, Rice et al. 1997, Ostlie et al. 1997b, Calvin 1998). Efeitos climáticos locais na fenologia de milho fazem da data de plantio uma variável difícil de manipular para gerir ECB.
30 Estudos adicionais terão de ser conduzidas no âmbito de um

vasto leque de condições para responder plenamente esta pergunta. Além disso, um mosaico temporal pode levar a um acasalamento não aleatório, onde mariposas Bt resistentes da cultura acasalam umas com as outras porque o seu tempo de desenvolvimento difere do das mariposas suscetíveis emergentes do refúgio (Gould 1994).

Mosaicos espaciais envolvem o plantio de dois eventos distintos de milho Bt, com diferentes modos de ação. A idéia é que a populações de insetos será exposta a várias proteínas, reduzindo a probabilidade de resistência a qualquer uma das proteínas. No entanto, atualmente, produtos registrados expressam apenas uma proteína e as principais pragas de milho (ECB, CEW, SWCB) geralmente permanecem na mesma planta em todos os estágios de alimentação larval, insetos individuais serão expostos a apenas uma das proteínas. Na ausência de refúgios estruturados produzindo insetos suscetíveis, a resistência ainda pode ter o potencial de se desenvolver em tal sistema, como teria em uma monocultura de proteína única. Como resultado, a visão aceita atualmente ensina afastada dos tipos de estratégias de refúgio divulgadas aqui.

Sabe-se que, durante o período vegetativo CEW move-se em direção ao norte a partir dos sítios de invernada do sul para as regiões de crescimento de milho, no Cinturão do Milho (Corn Belt). No entanto, as observações de migração norte-sul de CEW (a partir de regiões de cultivo de milho para regiões produtoras de algodão), foram anotadas. Embora mais pesquisas sejam necessárias para a confirmação, este fenômeno pode resultar em exposição adicional a culturas de milho Bt e aumentar a pressão seletiva para resistência de CEW. Este efeito é agravado pelo fato de que nem o algodão Bt ou qualquer

evento de milho *Bt* registrado contém uma dose elevada para CEW. Como tal, pode ser necessário se considerar outras medidas de mitigação CEW.

Ao considerar esta questão, a SAP 2000 indicou que o
5 refúgio CEW é mais bem considerado em uma escala regional (em vez de um refúgio estruturado na base de uma fazenda individual), devido aos movimentos de longa distância típicos dessa praga (ou seja, a proximidade de refúgio não é tão importante para CEW). Segundo a SAP, um refúgio de 20% (por
10 exploração) seria suficiente para CEW, desde que a quantidade de milho *Bt* na região não exceda 50% do total da cultura de milho. Se a cultura de milho *Bt* regional for superior a 50%, todavia, mais refúgios estruturados podem ser necessários (SAP 2001). No entanto, o SAP não definiu o que uma "região" deve
15 ser (ou seja, município, estado ou outra divisão).

Com base nos últimos dados de superfície disponíveis para milho *Bt*, é de salientar que uma série de municípios no Cinturão do Milho (Corn Belt) ultrapassa o limiar de 50% reconhecido pela SAP 2000. Devido a isto, pode haver riscos
20 adicionais para a resistência CEW. Estes riscos podem ser atenuados com mais refúgios estruturados em regiões com mais de 50% de milho *Bt*. No entanto, pesquisas adicionais serão provavelmente necessárias para se determinar o risco da circulação norte-sul de CEW por completo e as medidas adequadas
25 de mitigação.

Opções de Refúgio Aceitas-Atualmente

Eventos de Alta Dose; MON 810, BT11, e TC1507 (Campos de Milho)

Regiões sem Algodão que não Borrifam Inseticidas numa Base

5 Regular

Esta região engloba a maior parte do leste do Cinturão de Milho do High Plains. As recomendações originais de refúgio USDA NF-205 incluíram 20-30% de refúgio estruturado não tratado ou um refúgio de 40% que poderia ser tratado com inseticidas não-Bt (Ostlie et al. 1997a). No caso do ECB, a principal praga do milho para a maioria dos os U.S., sabe-se que, em média, menos de 10% dos produtores utilizam tratamentos com inseticidas para controlar esta praga (Centro Nacional para Política de Alimentação e Agricultura, 1999). Uma vez que

15 muitos produtores não tratam regularmente para ECB, NC-205 modificou a sua posição em uma carta ao Dr. Janet Andersen (Diretor, BPPD), em 24 de maio de 1999. Nesta carta, NC-205 altera a sua recomendação para refúgios de 20% de milho não-Bt que podem ser tratados com inseticidas e deverão ser

20 implantados dentro de ½ milha (¼ milha é melhor) do milho Bt. As recomendações específicas da carta foram: 1) o tratamento de refúgios com inseticida deve ser baseado em aferição e aceite dos limiares econômicos, 2) o tratamento deve ser com um produto que não contenha a toxina Bt ou Cry, 3) devem ser

25 mantidos registros dos refúgios tratados e estes devem ser partilhados com o EPA, 4) o impacto potencial dos refúgios pulverizados deve ser acompanhado de perto e avaliado anualmente, e 5) a monitoração de resistência deve ser mais intensa em áreas de risco mais elevado, por exemplo, onde os

30 refúgios são tratados com inseticidas (Ortman 1999).

Dado que a maioria dos produtores não trata tipicamente o milho de campo com inseticidas para controle de ECB, um refúgio de 20%, de um milho não-Bt que pode ser borrifado com inseticidas não-Bt se as densidades de ECB excederem o limiar econômico deve ser viável para o Cinturão do Milho. Refúgios podem ser tratados conforme necessário para controlar insetos lepidópteros brocas de espiga com inseticidas não-Bt, ou outras práticas IPM adequadas. O uso de inseticida deve ser baseado na aferição utilizando-se os limiares econômicos como parte de um programa IPM.

Alguns estudos de laboratório demonstraram que a proteína Cry2Ab isolada e as proteínas Cry2Ab + Cry1Ac, conforme expressas na Bollgard II, produzem uma "alta dose" funcional para o controle da CBW em algodão Bollgard II, TBW e PBW. Estes estudos serão discutidos a baixo. A EPA concluiu previamente que uma dose de Cry1Ac moderada, não-alta, é produzida nas linhagens de Bollgard atuais para controle de CBW e uma dose alta de Cry1Ac é produzida para controlar TBW e PBW (USEPA 1998, 2001).

A tabela a seguir irá ajudar o leitor com as siglas para as pragas. Note que a tabela lista as pragas mais comuns que são alvo das estratégias de resistência a praga transgênica, mas a invenção não se limita apenas a esses parasitas.

Tabela 1

Sigla	Nome Comum	Nome Científico	Cultura
BCW	Lagarta-rosca	<i>Agrotis ipsilon</i> (Hufnagel)	Milho
CBW	Lagarta de capulho de algodão	<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	Algodão
CEW	Lagarta de espiga de milho	<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	Milho

CPB	Besouro de batata do Colorado	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say)	Batata
CSB	Broca comum de espiga	<i>Papaipema nebris</i> (Guenée)	Milho
ECB	Broca de milho europeu	<i>Ostrinia nubilalis</i> (Huebner)	Milho
FAW	Lagarta militar de outono	<i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith)	Milho
PBW	Lagarta rosa de capulho	<i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders)	Algodão
SCSB	Broca de espiga de milho do sul	<i>Diatraea crambidoides</i> (Grote)	Milho
SWCB	Broca de milho do sudoeste	<i>Diatraea grandiosella</i> (Dyar)	Milho
TBW	Lagarta de broto de tabaco	<i>Heliothis virescens</i> (Fabricius)	Algodão

Assim, continua a haver uma necessidade de métodos para manejo de resistência de pragas em um terreno de cultivo de plantas resistentes a pragas. Seria útil se fornecer um método de melhoramento da proteção das plantas, especialmente plantas de milho, de danos causados por alimentação de pragas. Seria particularmente útil se tal método reduzisse a taxa de aplicação requerida de pesticidas químicos convencionais, e também se este limitasse o número de operações de campos separados que foram necessários para o cultivo e plantio das culturas.

RESUMO DA INVENÇÃO

A invenção, portanto, diz respeito a um método de reduzir o desenvolvimento de parasitas resistentes em um campo através da mistura de sementes de uma primeira cultura transgênica resistente a pragas com as sementes de uma segunda cultura transgênica resistente a pragas fornecendo uma mistura de sementes em que a dita primeira das culturas resistentes a pragas, e a dita segunda cultura resistente a pragas são pesticidas para a mesma praga alvo, mas através de diferentes modos de ação pesticida, e plantação da mistura de sementes. As

sementes podem ainda incorporar um gene de resistência a herbicida.

5 A invenção ainda diz respeito a um método de reduzir o desenvolvimento de parasitas resistentes em um campo de culturas transgênicas resistentes a praga em um terreno, misturando-se um primeiro tipo de semente e um segundo tipo de semente para produzir uma mistura de sementes, onde o primeiro tipo de semente é a semente de uma cultura de plantas transgênicas resistentes a pragas compreendendo um primeiro
10 transgene e um segundo transgene e tem uma atividade pesticida contra uma primeira praga alvo e uma segunda praga alvo, e em que o segundo tipo de semente não tem atividade pesticida contra a primeira praga alvo ou a segunda praga alvo, em que a dita mistura de sementes compreende cerca de 90% a cerca de 99%
15 do primeiro tipo de semente e de cerca de 10% a cerca de 1% do segundo tipo de semente, e o plantio da dita mistura de sementes. As sementes podem ainda incorporar um gene de resistência herbicida.

20 A invenção também diz respeito a um método de manejo de resistência de pragas em um terreno de culturas praga resistentes, fornecendo sementes de uma primeira cultura transgênica resistente a pragas, a primeira cultura transgênica resistente a pragas expressando um primeiro transgene e um segundo transgene, o primeiro transgene proporcionando maior
25 tolerância ou resistência a pelo menos uma praga Coleóptera e um segundo transgene proporcionando resistência a pelo menos uma praga lepidóptera, fornecendo sementes de uma segunda cultura transgênica resistente a pragas, a segunda cultura transgênica resistente a pragas expressando um terceiro
30 transgene, o terceiro transgene proporcionando resistência aos

mesmos, pelo menos uma praga lepidóptera através de um modo de ação pesticida outro, diferente do segundo transgene, e a plantação de sementes da primeira cultura transgênica resistente a pragas e as sementes da segunda cultura transgênica resistentes a pragas em um terreno. As sementes podem ainda incorporar um gene de resistência herbicida.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Na descrição que se segue, uma série de termos é usada extensivamente. As seguintes definições são fornecidas para facilitar a compreensão da invenção.

O artigo "a" e "um" são aqui usados para se referir a um ou mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um ou mais elementos. Conforme utilizado aqui, o termo "compreendendo" significa "incluindo, mas não se limitando a".

Um "terreno" destina-se a significar uma área onde são plantadas as culturas, independentemente da sua dimensão. Conforme utilizado aqui, o termo "cultura de planta transgênica resistente a praga", significa uma planta ou progênie desta (incluindo sementes) derivada de uma célula vegetal transformada ou protoplasto, onde o DNA da planta contém uma molécula de DNA heteróloga introduzida, não inicialmente presente em uma planta nativa, não-transgênica, da mesma estirpe, que confere resistência a uma ou mais lagartas de raiz de milho. O termo refere-se ao transformante original e a progênie do transformante que incluem o DNA heterólogo. O termo também se refere a progênie produzida por um cruzamento sexual entre os transformantes e uma outra variedade que inclui o DNA heterólogo. É também para se entender que duas diferentes

plantas transgênicas também podem acasalar para produzir descendentes que contenham dois ou mais genes heterólogos acrescentados por segregação independente. A autopolinização da progênie adequada pode produzir plantas que são homozigotas para ambos genes heterólogos acrescentados. Retro cruzamento com uma planta parental e cruzamento externo com uma planta não-transgênica também são contemplados, como é a propagação vegetativa. Descrições de outros métodos de reprodução que são comumente usados para diferentes características e plantas de cultivo podem ser encontrados em uma das várias referências, por exemplo, Fehr (1987), na *Breeding Methods for Cultivar Development*, ed. J. Wilcox (American Society of Agronomy, Madison, WI). Métodos de reprodução também podem ser usados para transferir qualquer gene de resistência natural em plantas de cultivo.

Conforme utilizado aqui, o termo "milho" significa *Zea mays* ou milho, e inclui todas as variedades vegetais que podem ser criadas com o milho, incluindo as espécies selvagens de milho. Em uma concretização, os métodos divulgados são úteis para o manejo de resistência em um terreno de milhos resistentes a pragas, quando é sistematicamente seguido pelo milho (ou seja, milho contínuo). Em outra concretização, os métodos são úteis para o manejo da resistência em um terreno de milho resistentes a pragas de primeiro ano, que é, onde o milho é seguido por outra cultura (por exemplo, soja), em um ciclo de rotação de dois anos. Outros ciclos de rotação são também contemplados no contexto da invenção, por exemplo, onde o milho é seguido por vários anos por uma ou várias outras culturas, de modo a prevenir resistência para outras extensões de pragas diapausa que podem desenvolver-se ao longo do tempo.

Uma cultura é considerada como tendo uma "alta dose" de um agente pesticida se esta tem ou produz, pelo menos, cerca de 25 vezes a concentração do agente pesticida (como, por exemplo, a proteína *Bt*) necessária para matar as larvas suscetíveis. Por exemplo, no contexto de culturas *Bt*, cultivares *Bt* devem produzir uma concentração de toxina alta o suficiente para matar quase todos os insetos que são heterozigotos para resistência, assumindo, naturalmente, que um único gene pode conferir resistência a uma determinada proteína *Bt* ou outras toxinas. Atualmente, um agente protetor incorporado em uma planta-*Bt* é geralmente considerado a fornecer uma dose elevada, se verificado, pelo menos, duas das cinco abordagens seguintes:

- 1) Bio-ensaio de diluição serial com dieta artificial contendo tecidos de plantas *Bt* liofilizados utilizando tecidos de plantas não-*Bt* como controles;
- 2) Bio-ensaios usando linhagens de plantas com níveis de expressão aproximadamente 25 vezes menores do que o cultivar comercial determinado por ELISA ou alguma técnica quantitativa mais confiável;
- 3) Prover grande número de plantas comerciais no campo para se certificar de que o cultivar está no LD_{99,9} ou superior para assegurar que 95% dos heterozigotos seriam mortos (ver Andow & Hutchison 1998);
- 4) Similar ao # 3 acima, mas usaria infestação controlada com estirpe laboratorial da praga que tivesse um valor de LD₅₀ similar ao de cepas do campo;
- e 5) Determinar se o ínstar larval posterior da praga alvejada poderia ser encontrado com uma LD₅₀ que fosse de cerca de 25 vezes maior do que o das larvas neonatas. Se assim for, a fase posterior, poderia ser testada nas plantas *Bt* cultivadas para determinar se 95% ou mais das larvas da fase posterior foram mortos.

A atual base de conhecimentos para expressão de dose elevada encontra-se resumido na tabela seguinte:

Tabela 2

HÍBRIDO	TEMPORADA - ALTA DOSE PARA PESTES DE MILHO					
	ECB	CEW	SWCB	FAW	SCSB	CSB
Bt11	Provável	Não	Desconhecido	Não	Desconhecido	Desconhecido
Bt Milho Doce (BT11)	Provável	Não	Desconhecido	Não	Desconhecido	Desconhecido
MON 810	Sim	Não	Desconhecido	Não	Desconhecido	Desconhecido
TC1507	Sim	Não				

5

Conforme utilizado aqui, os termos "polipeptídeo" "peptídeo", e "proteína" são utilizados aqui indistintamente para se referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. O termo se aplica aos polímeros de aminoácidos em que um ou mais
 10 resíduos de aminoácidos é um análogo químico artificial correspondente de um aminoácido que ocorre naturalmente, bem como aos polímeros de aminoácidos que ocorrem naturalmente.

Conforme utilizado aqui, os termos "atividade pesticida" e "atividade inseticida" são sinônimos utilizados para se referir
 15 à atividade de um organismo ou de uma substância (como, por exemplo, uma proteína) que pode ser medida, por meio de exemplos não-limitados, através da mortalidade de pragas, retardo de desenvolvimento pragas, perda de peso de praga, repelência a pragas, e outras alterações físicas e
 20 comportamentais de uma praga após a alimentação e a exposição por um período de tempo adequado. Desta forma, a atividade pesticida impacta, muitas vezes, pelo menos um parâmetro mensurável de adaptabilidade de pragas. Por exemplo, o

pesticida pode ser um polipeptídeo para diminuir ou inibir a alimentação de insetos e / ou para aumentar a mortalidade de inseto mediante o manejo do polipeptídeo. Ensaios para avaliar a atividade pesticida são bem conhecidos no estado da técnica.

5 Ver, por exemplo, Patentes US nos. 6,570,005 e 6,339,144.

Conforme utilizado aqui, o termo "gene Pesticida" ou "polinucleotídeo pesticida" refere-se a uma seqüência nucleotídica que codifica um polipeptídeo que exibe atividade pesticida. Conforme utilizado aqui, os termos "polipeptídeo
10 pesticida", "proteína pesticida", ou "toxina de inseto" destina-se a significar uma proteína com atividade pesticida.

Conforme utilizado aqui, o termo "pesticida" é utilizado para referir-se a um efeito tóxico contra uma praga (por exemplo, CRW), e inclui a atividade de um, ou ambos, um
15 pesticida oferecido externamente e / ou um agente que é produzido pelas plantas da cultura. Conforme utilizado aqui, o termo "diferente modo de ação pesticida" inclui os efeitos pesticidas de uma ou mais características resistentes, introduzida dentro das plantas cultivadas seja por
20 transformação ou por métodos tradicionais de reprodução, tais como a ligação de uma toxina pesticida produzida pela cultura de plantas a diferentes sítios de ligação (ou seja, diferentes receptores de toxina e / ou diferentes sítios na mesma toxina receptora) nas membranas intestinais de lagartas de raiz de
25 milho. No que diz respeito aos modos de ação pesticida, os compostos pesticidas se ligam "competitivamente", se eles tiverem sítios de ligação idênticos na praga sem sítios de ligação em que um composto irá se ligar e o outro não irá se ligar. Por exemplo, se o composto A utiliza apenas os sítios de
30 ligação 1 e 2, e o composto B também utiliza apenas os sítios

de ligação 1 e 2, os compostos A e B se ligam de forma "competitiva". Compostos pesticidas se ligam "semi-competitivamente" se tiverem, pelo menos, um sítio de ligação em comum na praga, mas também pelo menos, um sítio de ligação diferente (não em comum). Por exemplo, se o compostos C utiliza os sítios de ligação 3 e 4, e compostos D utiliza somente o sítios de ligação 3, os compostos C e D se ligam de forma "semi-competitiva". Compostos pesticidas se ligam de forma "não-competitiva" se eles não têm nenhum sitio de ligação em comum na praga. Por exemplo, se o composto E utiliza os sítios de ligação 5 e 6, e composto F utiliza o sítio de ligação 7, os compostos E e F se ligam de forma "não-competitiva".

Conforme utilizado aqui, o termo "quantidade pesticida efetiva" conota uma quantidade de uma substância ou organismo que tem atividade pesticida quando presentes no ambiente de uma praga. Para cada substância ou organismo, a quantidade pesticida efetiva é determinada empiricamente para cada praga afetada em um ambiente específico. Do mesmo modo uma "quantidade inseticida eficaz" pode ser utilizada para se referir a uma "quantidade pesticida eficaz" quando a praga é um inseto-praga.

Uma "composição inseticida" destina-se a dizer que as composições das concretizações da invenção têm atividade contra insetos patógenos de plantas, incluindo insetos-praga da ordem Homóptera, e assim é capaz de reprimir, controlar, e / ou matar os insetos invasores. Uma composição do inseticida da concretização da invenção irá reduzir os sintomas resultantes do desafio promovido pelo inseto de, pelo menos, cerca de 5% para cerca de 50%, de pelo menos cerca de 10% para cerca de 60%, de pelo menos cerca de 30% para cerca de 70%, de pelo

menos cerca de 40% para cerca de 80%, ou de pelo menos cerca de 50% para cerca de 90% ou mais. Assim, os métodos de melhoramento da invenção podem ser utilizados para proteger organismos, nomeadamente plantas, de insetos invasores.

5 Conforme utilizado aqui, o termo "atividade inseticida melhorada" caracteriza uma δ -endotoxina da invenção que tem atividade pesticida anti-Coleóptera melhorada, relativamente à atividade da proteína do tipo selvagem correspondente, e / ou uma endotoxina que seja eficaz contra tanto um vasto leque de insetos, ou adquira uma especificidade para um inseto que não é suscetível à toxicidade da proteína de tipo selvagem. A constatação de maior atividade pesticida requer a demonstração de um aumento da toxicidade de pelo menos 30% contra os insetos-alvo, e mais preferencialmente de 35%, 40%, 45%, ou 50% em relação à atividade inseticida da endotoxina tipo-selvagem determinada contra o mesmo inseto.

20 Conforme utilizado aqui, o termo "transgênico" inclui qualquer tipo de célula, linhagem celular, calo, tecidos, parte de planta, ou planta, da qual o genótipo tenha sido alterado pela presença de ácido nucléico heterólogo incluindo os transgênicos inicialmente também alterados, bem como os criados por cruzamentos sexuais ou propagação assexuada dos primeiros transgênicos. O termo "transgênico", como utilizado aqui, não inclui a alteração do genoma (cromossômica ou extra-cromossômica) por métodos de cruzamento de plantas convencionais que ocorrem naturalmente ou por eventos aleatórios, tais como fertilização cruzada, infecção viral não recombinante, transformação bacteriana não recombinante, transposição não recombinante, ou por mutação espontânea.

Conforme utilizado aqui, o termo "planta" inclui a referência a plantas inteiras, órgãos (por exemplo, folhas, caules, raízes, etc), sementes, células vegetais, protoplastos de planta, culturas de tecidos de células vegetais a partir do qual plantas podem ser regeneradas, calos de plantas, grumos de plantas, e células vegetais que estão intactas nas plantas ou partes das plantas e progênie da mesma. Partes de plantas transgênicas são para ser entendidas no âmbito de aplicação da invenção como incluindo, por exemplo, células vegetais, protoplastos, tecidos, calos, embriões, bem como flores, pólen, óvulos, sementes, galhos, amêndoas, espigas, sabugos, cascas, talos, caules, frutos, folhas, raízes, pontas de raiz, anteras, e similares, originando em plantas transgênicas ou na progênie desta previamente transformada com uma molécula de DNA da invenção e, portanto, consistindo ao menos em parte, de células transgênicas, também são um objeto da presente invenção. Grão pretende significar a semente madura produzida por agricultores comerciais para outros fins que não a cultura ou de reprodução da espécie. Progênie, variantes e mutantes das plantas regeneradas estão também incluídos no âmbito da invenção, desde que essas partes compreendam os polinucleotídeos introduzidos.

Conforme utilizado aqui, o termo "célula vegetal" inclui, sem limitação, sementes, suspensão de culturas, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófilos, esporófitos, pólen, e micrósporos. A classe de plantas que podem ser utilizada nos métodos da invenção é geralmente tão ampla quanto à classe de plantas superiores susceptíveis a técnicas de transformação, incluindo as plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Conforme utilizado aqui, o termo "criar ou reforçar a resistência a inseto" destina-se a dizer que a planta, que foi geneticamente modificada de acordo com os métodos da presente invenção, tem maior resistência a uma ou mais pragas de insetos em relação a uma planta com um componente genético semelhante com exceção à modificação genética, descrito a seguir. Plantas geneticamente modificadas da presente invenção são capazes de expressar pelo menos uma lipase inseticida e pelo menos uma proteína *Bt* inseticida, a combinação que protege uma planta de um inseto-praga enquanto impactando um inseto-praga de uma planta. "Defender uma planta de um inseto-praga" destina-se a significar limitar ou eliminar a praga de insetos relacionados com danos a uma planta, por exemplo, inibindo a capacidade do inseto-praga em crescer, se alimentar e / ou reproduzir ou através da matança do inseto-praga. Conforme utilizado aqui, "impactar um inseto-praga de uma planta" inclui, mas não está limitado a, impedir o inseto-praga de alimentação suplementar sobre a planta, prejudicando o inseto-praga através, por exemplo, da inibição da capacidade do inseto em crescer, se alimentar, e / ou reproduzir, ou matando-se o inseto-praga.

Conforme utilizado aqui, o termo "lipase inseticida" é utilizado no seu sentido mais amplo e inclui, mas não está limitado a, qualquer membro da família de lipídio acil hidrolases que tem substâncias tóxicas ou de efeitos inibitórios sobre insetos. Além disso, o termo "proteína inseticida *Bt*" é utilizado no seu sentido mais amplo e inclui, mas não está limitado a, qualquer membro da família de proteínas de *Bacillus thuringiensis* que têm efeitos tóxicos ou inibitórios sobre insetos, como as toxinas *Bt* aqui descritas e conhecidas no estado da técnica, e inclui, por exemplo, as

proteínas inseticidas vegetativas e as δ -endotoxinas ou toxinas Cry. Também inclui quaisquer formas modificadas de toxinas Bt, como as toxinas quiméricas, toxinas embaralhadas, ou algo do gênero. Assim, tal como aqui descrito, resistência a insetos
5 pode ser conferida a um organismo através da introdução de uma sequência nucleotídica codificadora de uma lipase inseticida com uma sequência que codifica para uma proteína inseticida Bt ou aplicar uma substância inseticida, que inclui, mas não está limitada a uma proteína inseticida, a um organismo (por
10 exemplo, uma planta ou parte da mesma planta).

Conforme utilizado aqui, "mistura" de sementes significa, por exemplo, uma mistura de pelo menos dois tipos de sementes em um saco (como durante o acondicionamento, produção ou venda), a mistura de pelo menos dois tipos de sementes, em um
15 terreno, ou qualquer outro método que resulte em pelo menos dois tipos de sementes a ser introduzido no terreno. A mistura pode resultar em um arranjo aleatório no terreno, ou poderia ser, no contexto de um refúgio estruturado de algum tipo (como, por exemplo, um refúgio de bloco ou refúgio de tiras). Quando é
20 utilizado um refúgio estruturado, um "terreno", como utilizado neste documento pode, mas não necessariamente, incluir tais refúgios estruturados.

Aqueles qualificados na técnica irão reconhecer que nem todos os compostos são igualmente eficazes contra todas as
25 pragas. Compostos das concretizações exibem atividade contra insetos-praga, que pode incluir agrônomo economicamente importantes, florestas, estufas de vegetação, viveiro de plantas ornamentais, alimentos e fibras, saúde pública e animal, estrutura comercial e doméstica, familiar, e pragas de
30 produtos armazenados. Pragas de inseto incluem insetos

selecionados a partir das ordens Coleóptera, Díptera, Hymenoptera, Lepidóptera, Malófaga, Homóptera, Hemíptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Sifonáptera, Trichoptera, etc, principalmente Coleóptera e
5 Lepidóptera.

Coleóptera

De interesse estão às larvas e adultos da ordem Coleoptera incluindo besouros das famílias Anthribidae, Bruchidae, e Curculionidae (incluindo, mas não se limitando a: *Anthonomus*
10 *grandis* Boheman (bicudo, *boll weevil*); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (gorgulho-aquático-do-arroz); *Sitophilus granarius* Linnaeus (gorgulho do trigo, *granary weevil*); *S. oryzae* Linnaeus (gorgulho de arroz); *Hypera punctata* Fabricius (gorgulho de folha de trevo); *Cylindrocopturus adspersus*
15 LeConte (gorgulho de caule de girassol); *Smicronyx fulvus* LeConte (gorgulho de raiz de girassol vermelho); *S. sordidus* LeConte (gorgulho de raiz de girassol cinza); *Sphenophorus maidis* Chittenden (curculionídeos de milho)); *flea beetles*, besouro de pepinos, lagartas de raiz, besouros de folhas,
20 besouros de batata, e mineiros de folha na família Chrysomelidae (incluindo, mas não se limitando a: *Leptinotarsa decemlineata* Dita (besouro de batata do Colorado); *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (vaquinha do milho ocidental, *western corn rootworm*); *D. barberi* Smith & Lawrence (vaquinha
25 do milho do norte); *D. undecimpunctata howardi* Barber (vaquinha do milho do sul); *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer (*flea beetle* de milho); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (*flea beetle* de milho); *Colaspis brunnea* Fabricius (colaspis de uva); *Oulema melanopus* Linnaeus (*leaf beetle* de cereal); *Zygogramma exclamationis*
30 Fabricius (besouro de girassol)); besouros da família

Coccinellidae (incluindo, mas não se limitando a: *Epilachna varivestis* Mulsant (besouro de Feijão mexicano)); *chafers* e outros besouros da família Scarabaeidae (incluindo, mas não se limitando a: *Popillia japonica* Newman (Besouro Japonês);

5 *Cyclocephala borealis* Arrow (besouros mascarados do norte, *northern masked chafer, white grub*); *C. immaculata* Olivier (besouros mascarados do sul, *white grub*); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (besouro Europeu); *Phyllophaga crinita* Burmeister (*white grub*); *Ligyrus gibbosus* De Geer (besouro de cenoura));

10 besouros carpete da Família Dermestidae; larva-aramé (*wireworms*) da família Elateridae, *Eleodes* spp.; *Melanotus* spp.; *Conoderus* spp.; *Limonius* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; besouros cascudos da família Scolytidae e besouros da família Tenebrionidae.

15 **Díptera**

Adultos e imaturos da ordem Díptera são de interesse, incluindo mineiros de folha *Agromyza parvicornis* Loew (traça mineira de folha de milho, *corn blotch leafminer*); borrachudo, *midges* (incluindo, mas não limitados a: *Contarinia sorghicola*

20 *Coquillett* (mosca-do-sorgo, *sorghum midge*); *Mayetiola destructor* Say (Mosca Hessian); *Sitodiplosis mosellana* Géhin (mosca-do-trigo); *murtfeldtiana* *Neolasioptera* Felt, (mosca de semente de girassol)); moscas de frutas (Tephritidae), *Oscinella frit* Linnaeus (moscas *frit*), larvas (*maggot*)

25 (incluindo, mas não se limitando a: *Delia platura* Meigen (lagarta de semente de milho, *seedcorn maggot*); *D. coarctata* Fallen (mosca de bulbo de trigo), e outros *Delia* spp.; *Meromyza americana* Fitch (lagarta do colmo, *wheat stem maggot*), Mosca doméstica Linnaeus (mosca doméstica), *Fannia canicularis*

30 Linnaeus, *F. femoralis* Stein (mosca doméstica menor); *Stomoxys*

calcitrans Linnaeus (moscas estáveis)); moscas-da-face, moscas-do-chifre, moscas varejeiras, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp.; e outros pragas de moscas muscóides, mosca-de-cavalo *Tabanus* spp.; moscas de berne *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; larvas de gado *Hypoderma* spp.; moscas-de-veados *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (*keds*); e outros *Brachycera*, mosquitos *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; mosca negra *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; mosca enana mordedora (*biting midges*), flebotomíneos (*sand flies*), *Sciaridae*, e outros

10 Nematocera.

Hymenoptera

Insetos-praga da ordem Hymenoptera são também de interesse, incluindo moscas-serra (*sawflies*) tais como *cephus cinctus* Norton (*Symphyta* de caule de trigo); formigas

15 (incluindo, mas não se limitados a: *Camponotus ferrugineus* Fabricius (formiga carpinteira vermelha); *C. pennsylvanicus* De Geer (formiga carpinteira preta); *Monomorium pharaonis* Linnaeus (formiga faraó); *Wasmannia auropunctata* Roger (formiga pixixica, *little fire ant*); *Solenopsis geminata* Fabricius

20 (formiga-de-fogo); *S. molesta* Say (formiga ladrão); *S. invicta* Buren (formiga-de-fogo importadas vermelhas); *Iridomyrmex humilis* Mayr (formiga argentina); *Paratrechina longicornis* Latreille (formiga louca); *Tetramorium caespitum* Linnaeus (formiga de pavimento); *Lasius alienus* Förster (formiga de

25 milharal); *Tapinoma sésseis* Dita (formiga de odoríferos-casa)); abelhas (incluindo mamangavas, *carpenter bees*), abelhas *Hornets*, Casacas amarelas e vespas.

Lepidóptera

As larvas da ordem Lepidóptera incluem, mas não estão

30 limitadas a, lagartas militar (*armyworms*), *cutworm*, lagarta-

mede-palmo, e heliothines da família **Noctuidae** Spodoptera frugiperda JE Smith (lagarta do cartucho, *fall armyworm*); S. exigua Hübner (lagarta militar de beterraba); S. litura Fabricius (lagarta-rosca de tabaco, *tobacco black cutworm*,
 5 lagarta-elasma, *cluster caterpillar*); Mamestra configurata Walker (lagarta militar Bertha); M. brassicae Linnaeus (mariposa de repolho); Agrotis ipsilon Hufnagel (lagarta-rosca, *black cutworm*); A. orthogonia Morrison (lagarta-rosca pálida ocidental, *pale western cutworm*); A. subterranea Fabricius
 10 (lagarta-rosca granulada); Alabama argillacea Hübner (lagarta de folha de algodão); Trichoplusia ni Hübner (mede-palmo de repolho, *cabbage looper*); Pseudoplusia includens Walker (mede-palmo de soja), Anticarsia gemmatilis Hübner (lagarta de mucuna-preta); Hypena scabra Fabricius (lagarta de trevo
 15 verde); Heliothis virescens Fabricius (lagarta de broto de tabaco); Pseudaletia unipuncta Haworth (lagarta militar); Athetis mindara Barnes e McDunnough (*cutworm* de pele áspera); Euxoa messoria Harris (*cutworm* de lado escuro); Earias Insulana Boisduval (lagarta capulho espinhosa, *spiny bollworm*); E.
 20 vittella Fabricius (lagarta capulho pontilhada); Helicoverpa armigera Hübner (lagarta capulho Americana); H. zea Boddie (lagarta de espiga de milho ou lagarta de capulho de algodão); Melanchra picta Harris (lagartas zebra); Egira (Xylomyges) curialis Grote (*cutworm* de citros); brocas, *casebearers*,
 25 lagartas de rede (*webworms*), lagartas cone (*coneworms*), e *skeletonizers* da família **Crambidae** Ostrinia nubilalis Hübner (broca de milho Européia); Chilo suppressalis Walker (broca de caule de arroz); C. partellus, (broca de sorgo); Crambus caliginosellus Clemens (*webworm* de raiz de milho); C.
 30 teterrellus Zincken (*webworm* de febra, *bluegrass webworm*);

Desmia funeralis Hübner (dobrador de folha de uva); Diaphania
 hyalinata Linnaeus (lagarta de melão); D. nitidalis Stoll
 (lagarta de picles); Diatraea grandiosella Dyar (broca de milho
 sudoeste), D. saccharalis Fabricius (broca de cana de açúcar);
 5 Eoreuma loftini Dyar (broca de arroz mexicano); Herpetogramma
 licarsisalis Walker (webworm de céspede); Loxostege sticticalis
 Linnaeus (webworm de beterraba); Maruca testulalis Geyer (broca
 de feijão); Udea rubigalis Guenée (leaftier de aipo); **Pyralidae**
 Amyelois transitella Walker (lagarta de laranja naval);
 10 Anagasta kuehniella Zeller (mariposa da farinha do
 Mediterrâneo); Cadra cautella Walker (Traça do cacau, almond
 moth); Corcyra cephalonica Stainton (Traça do arroz, rice
 moth); Cnaphalocrocis medinalis Guenée (enrolador da folha de
 arroz); Ephestia elutella Hübner (Traça do cacau e do tabaco,
 15 tobacco (cacao) moth); Galleria mellonella Linnaeus (traça
 grande da cera, greater wax moth); Homoeosoma electellum Hulst
 (traça de girassol, sunflower moth); Elasmopalpus lignosellus
 Zeller (broca-do-colo ou lagarta elasm, lesser cornstalk
 borer); Achroia grisella Fabricius (traça da cera, lesser wax
 20 moth); Orthaga thyrisalis Walker (mariposa teia da árvore do
 chá, tea tree web moth); Plodia interpunctella Hübner (Mariposa
 de refeição Indiana, Indian meal moth); e enroladores de
 folhas, lagartas de broto, lagartas de sementes, e lagarta de
 frutas na família **Tortricidae** Acleris gloverana Walsingham
 25 (lagarta de broto de cabeça preta do oeste, Western blackheaded
 budworm); A. variana Fernald (lagarta de broto de cabeça preta
 do leste); Archips argyrospila Walker (traça tortricídea de
 árvores frutíferas, fruit tree leaf roller); A. rosana Linnaeus
 (traça tortricídea dos arbustos, European leaf roller); e
 30 outras espécies Archips, Adoxophyes orana Fischer von

Rösslerstamm (traça tortricídea dos frutos de verão, *summer fruit tortrix moth*); *Cochylis hospes* Walsingham (mariposa bandeada de girassol); *Cydia latiferreana* Walsingham (traça da avelaneira, *filbert worm*); *C. pomonella* Linnaeus (Bichado das pomóideas, *coding moth*); *Platynota flavedana* Clemens (lagarta enroladeira de folha variegado); *P. stultana* Walsingham (lagarta enroladeira de folha de onívoro); *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (Eudémis, *European grape vine moth*); *Spilonota ocellana* Denis & Schiffermüller (Traça vermelha dos gomos, *eyespotted bud moth*); *Endopiza viteana* Clemens (mariposa de bagas de uva); *Eupoecilia ambiguella* Hübner (Cochilis, *vine moth*); *Bonagota salubricola* Meyrick (Lagarta enroladeira da maçã, *Brazilian apple leafroller*); *Grapholita molesta* Busck (Traça oriental do pessegueiro, *oriental fruit moth*); *Suleima helianthana* Riley (mariposa de broto de girassol, *sunflower bud moth*); *Argyrotaenia* spp.; *Choristoneura* spp.

Outras pragas agrônômicas selecionadas na ordem Lepidoptera incluem, mas não se limitam a, *Alsophila pometaria* Harris (lagarta de gangrena de outono, *fall cankerworm*); *Anarsia lineatella* Zeller (Lagarta mineira do pessegueiro, *peach twig borer*); *Anisota senatoria* J.E. Smith (lagarta de listra laranja de carvalho); *Antheraea pernyi* Guérin-Ménéville (mariposa de seda de carvalho Chinês); *Bombyx mori* Linnaeus (mariposa-de-seda, *Silkworm*); *Bucculatrix thurberiella* Busck (Lagarta mineradora das folhas, *cotton leaf perforator*); *Colias eurytheme* Boisduval (lagarta de alfafa); *Datana integerrima* Grote & Robinson (lagarta de nogueira); *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov (mariposa-de-seda-Siberiana), *Ennomos subsignaria* Hübner (lagarta de olmo *elmspan worm*); *Erannis tiliaria* Harris (mede-palmo de tília, *linden looper*); *Euproctis chrysorrhoea*

Linnaeus (mariposa de rabo marrom, *browntail moth*); *Harrisina americana* Guérin-Ménéville (*skeletonizer* de folha de uva, *grapeleaf skeletonizer*); *Hemileuca oliviae* Cockrell (lagarta de faixa); *Hyphantria cunea* Drury (larva de teias de outono, *fall webworm*); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (oxiúro de tomate, *tomato pinworm*); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (lagarta-enroladora de cicuta do leste, *Eastern hemlock looper*); *L. fiscellaria lugubrosa* Hulst (lagarta-enroladora de cicuta do oeste); *Leucoma salicis* Linnaeus (mariposa de cetim);
 5 *Lymantria dispar* Linnaeus (mariposa-cigana); *Manduca quinquemaculata* Haworth (mariposa falcão de 5 manchas, *hornworm* de tomate, *five spotted hawk moth*, *tomato hornworm*); *M. sexta* Haworth (Mandarova do fumo, *tomato hornworm*, *tobacco hornworm*); *Operophtera brumata* Linnaeus (Traça de inverno, *winter moth*);
 15 *Paleacrita vernata* Peck (lagarta de gangrena de primavera, *spring cankerworm*); *Papilio cresphontes* Cramer (calda engolidora gigante, cachorro laranja, *giant swallowtail*, *orange dog*); *Phryganidia californica* Packard (lagarta de carvalho da Califórnia, *California oakworm*); *Phyllocnistis citrella*
 20 Stainton (minerador de folha de citros, *citrus leafminer*); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (minerador de folha manchado, *spotted tentiform leafminer*); *Pieris brassicae* Linnaeus (borboleta grande branca); *P. rapae* Linnaeus (borboleta pequena branca); *P. napi* Linnaeus (borboleta branca com verde raiado); *Platyptilia carduidactyla* Riley (mariposa plumosa de alcachofra); *Plutella xylostella* Linnaeus (mariposa de costas de diamante, *diamondback moth*); *Pectinophora gossypiella* Saunders (lagarta capulho rosa, *pink bollworm*); *Pontia protodice* Boisduval & Leconte (lagarta de repolho do
 30 Sul, *Southern cabbage worm*); *Sabulodes aegrotata* Guenée

(lagarta enroladora de onívoros, *omnivorous looper*); *Schizura concinna* J.E. Smith (lagarta corcunda vermelha); *Sitotroga cerealella* Olivier (mariposa de grão Angoumois); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermuller (lagarta processadora de pinheiro,
 5 *pine processionary caterpillar*); *Tineola bisselliella* Hummel (mariposa desfiadora de roupa, *webbing clothesmoth*); *Tuta absoluta* Meyrick (minerador de folha de tomate); *Yponomeuta padella* Linnaeus (mariposa de arminho, *ermine moth*); *Heliothis subflexa* Guenée; *Malacosoma* spp.; e *Orgyia* spp.

10 **Mallophaga**

Insetos-praga da ordem Mallophaga também são de interesse, e incluem *Pediculus humanus capitis* De Geer (piolho de cabeça); *P. humanus humanus* Linnaeus (piolho de corpo); *Menacanthus stramineus* Nitzsch (piolho de corpo de frango); *Trichodectes*
 15 *canis* De Geer (piolho mordedor de cachorro); *Goniocotes gallinae* De Geer (piolho de buço); *Bovicola ovis* Schrank (piolho de corpo de ovinos); *Haematopinus eurysternus* Nitzsch (piolho de gado de fuço-achatado, *short-nosed cattle louse*); *Linognathus vituli* Linnaeus (piolho de gado de fuço-longo); e
 20 outros piolhos parasitas mastigadores e sugadores que atacam o homem e os animais.

Homóptera & Hemíptera

Incluídos como insetos de interesse estão os adultos e ninfas das ordens Hemiptera e Homóptera, tais como, mas não se
 25 limitando a, adelgids da família Adelgidae, percevejo de planta da família Miridae, cigarras da família Cicadidae, cigarrinhas, *Empoasca* spp.; provenientes da família Cicadellidae, cigarrinhas de plantas das famílias Cixiidae, Flatidae, Fulgoroidea, Issidae e Delphacidae, cigarrinhas de árvore da
 30 família Membracidae, psilídeos da família Psyllidae, moscas-

brancas da família Aleyrodidae, afídeos ou pulgões da família Aphididae, filoxera da família Phylloxeridae, cochonilhas-farinhas da família Pseudococcidae, escalas (*scales*) das famílias Asterolecanidae, Coccidae, Dactylopiidae, Diaspididae, 5 Eriococcidae, Ortheziidae, Phoenicococcidae e Margarodidae, percevejo-de-renda da família Tingidae, percevejos da família Pentatomidae, percevejos cincha, *Blissus* spp.; e outros percevejos de sementes provenientes da família Lygaeidae, cigarrinhas da família Cercopidae, percevejos de polpa da 10 família Coreidae, e percevejos vermelhos e percevejos manchados de algodão provenientes da família Pyrrhocoridae.

Membros agronomicamente importantes da ordem Homóptera, ainda incluem, mas não estão limitados a: *Acyrtosiphon pisum* Harris (pulgão de ervilheira), *Aphis craccivora* Koch (afídeo de 15 feijão-caupi); *A. fabae* Scopoli (pulgão de feijão preto), *A. gossypii* Glover (afídeo de algodão, pulgão de melão); *A. maidiradicis* Forbes (pulgão de raiz de milho); *A. pomi* De Geer (afídeo de maçã); *A. spiraecola* Patch (pulgão de spirea); *Aulacorthum solani* Kaltenbach (pulgão de dedaleira); 20 *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (pulgão de morango); *Diuraphis noxia* Kurdjumov / Mordvilko (pulgão de trigo russo); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (pulgão de rosa de maçã); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (pulgão lanoso), *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (Piolho da couve, *cabbage aphid*); 25 *Hyalopterus pruni* Geoffroy (Piolho farinhento do pessegueiro, *mealy plum aphid*); *Lipaphis erysimi* Kaltenbach (pulgão de nabo); *Metopolophium dirrhodum* Walker (Pulgão verde-pálido das folhas, *cereal aphid*), *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (Pulgão grande da batinha, *potato aphid*), *Myzus persicae* Sulzer (afídeo 30 de pêssego-batata, pulgão de pêssego verde); *Nasonovia*

ribisnigri Mosley (afídeo de alface); Pênfigo spp. (pulgões de raiz e pulgões de galha), Rhopalosiphum maidis Fitch (pulgão de folha de milho); R. padi Linnaeus (afídeo de aveia-cereja de pássaro, *bird cherry-oat aphid*); Schizaphis graminum Rondani
 5 (pulgão-verde); Sipha flava Forbes (pulgão-amarelo de cana); Sitobion avenae Fabricius (pulgão do trigo, *English grain aphid*); Therioaphis maculata Buckton (pulgão-manchado-da-alfafa); Toxoptera aurantii Boyer de Fonscolombe (pulgão preto do citros) e T. citricida Kirkaldy (pulgão marron do citros);
 10 Adelges spp., (adelgídeos); Phylloxera devastatrix Pergande (filoxera de noz-pecã), Bemisia tabaci Gennadius (mosca-branca de tabaco, mosca-branca de batata-doce); B. argentifolii Bellows & Perring (mosca-branca-da-folha-prateada); Dialeurodes citri Ashmead (mosca-branca dos cítricos); Trialeurodes
 15 abutiloneus (mosca-branca de asa bandeada, *banded winged whitefly*) e T. vaporariorum Westwood (mosca-branca de estufa); Empoasca fabae Harris (cigarrinha da batata); Laodelphax striatellus Fallen (pulga de planta marrom pequena, *smaller brown planthopper*); Macrolestes quadrilineatus Forbes
 20 (cigarrinha de áster); Nephotettix cincticeps Uhler (cigarrinha verde); N. nigropictus Stål (cigarrinha de arroz); Nilaparvata lugens Stål (pulga de planta marrom, *brown planthopper*); peregrinus maidis Ashmead (pulga-do-milho); Sogatella furcifera Horvath (pulga de costa branca, *white-backed planthopper*);
 25 Sogatodes orizicola Muir (Delfacídeo-do-arroz); Typhlocyba pomaria McAtee (cigarrinha de maçã branca); Erythroneoura spp. (cigarrinha da uva); Magicicada septendecim Linnaeus (cigarras periódicas); Icerya purchasi Maskell (escala de almofada felpuda, *cottony cushion scale*); Quadraspidiotus perniciosus
 30 Comstock (escala San José, *San Jose scale*); Planococcus citri

Risso (cochonilha-dos-citros); *Pseudococcus* spp. (outros complexo cochonilha); *Cacopsylla pyricola* Foerster (psilídeo da pêra); *Trioza diospyri* Ashmead (psilídeo do caqui).

- Espécies de importância agronômica de interesse da ordem
- 5 Hemiptera incluem, mas não estão limitados a: *Acrosternum hilare* Say (percevejo verde); *Anasa tristis* De Geer ("percevejo de polpa, *squashbug*); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (percevejo, *chinch bug*); *Corythuca gossypii* Fabricius (percevejo-de-renda, *cotton lace bug*); *Cyrtopeltis modesta*
- 10 *Distantes* (percevejo de tomate, *tomato bug*); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schäffer (manchado de algodão, *cotton stainer*); *Euschistus servus* Say (percevejo marrom); *Euschistus variolarius* Palisot de Beauvois (percevejo de uma-mancha, *one-spotted stink bug*); *Graptostethus* spp. (complexo de percevejo
- 15 de sementes); *Leptoglossus corculus* Say (percevejo de sementes de patas-de-folha, *leaf-footed pine seed bug*); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (percevejo de planta manchado, *tarnished plant bug*); *Lygus hesperus* Knight (percevejo de planta manchado do oeste, *Western plant bug*); *Lygus pratensis* Linnaeus
- 20 (percevejo comum de prado, *common meadow bug*) *Lygus rugulipennis* Poppius (percevejo de planta manchado europeu, *European tarnished plant bug*); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (capsidial verde comum), *Nezara viridula* Linnaeus (percevejo verde do sul); *Oebalus pugnax* Fabricius (percevejo-de-arroz);
- 25 *Oncopeltus fasciatus* Dallas (percevejo grande das *Asclepiadáceas*); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (pulgão do algodoeiro).

Além disso, concretizações da presente invenção podem ser eficazes contra Hemíptera tais como, *Calocoris norvegicus*

30 *Gmelin* (percevejo de morango); *Orthops campestri* Linnaeus;

Plesiocoris rugicollis Fallen (capsidial de maçã); Cyrtopeltis modestus Distantes (percevejo de tomate); Cyrtopeltis notatus Distantes (*suckfly*); Spanagonicus albofasciatus Reuter (pulgão com marca-branca, *whitemarked fleahopper*); Diaphnocoris chlorionis Say (percevejo de planta, *honeylocust plant bug*); Labopidicola allii Knight (percevejo de cebola, *onion plant bug*); Pseudatomoscelis seriatus Reuter (pulgão do algodão); Adelphocoris rapidus Say (percevejo de planta rápido, *rapid plant bug*); Poecillocapsus lineatus Fabricius (percevejo de planta de quatro-linhas, *four-lined plant bug*); Nysius ericae Schilling (percevejo falso, *false chinch bug*); Nysius Raphanus Howard (percevejo falso); Nezara viridula Linnaeus (percevejo verde do Sul, *Southern green stink bug*); Eurygaster spp.; Coreidae spp.; Pyrrhocoridae spp.; Tingidae spp.; Blotomatidae spp.; Reduviidae spp.; e Cimicidae spp.

Ortóptera

Adultos e imaturos de insetos da ordem Ortóptera são de interesse, incluindo gafanhotos, grilos e gafanhotos Melanoplus sanguinipes Fabricius (gafanhoto migratório); differentialis Thomas M. (gafanhoto diferencial); M. femurrubrum De Geer, (gafanhoto de patas encarnadas); Schistocerca americana Drury (gafanhoto Americano); S. gregaria Forskal (gafanhotos do deserto); locusta migratoria Linnaeus (gafanhotos migratórios); Acheta domesticus Linnaeus (Grilo-doméstico), e Gryllotalpa spp. (grilos-topeira).

Thysanoptera

Adultos e imaturos da ordem Thysanoptera são de interesse, incluindo Thrips tabaci Lindeman (tripes de cebola); Anaphothrips obscurus Müller (tripes de erva); Frankliniella fusca Hinds (tripes de tabaco); Frankliniella occidentalis

Pergande (tripes da Califórnia); *Neohydatothrips variabilis* Praia (tripes de soja); *Scirthothrips citri* Moulton (tripes dos citros) e outros tripses de alimentação foliar.

Dermaptera

- 5 Outros insetos de interesse incluem insetos adultos e larvas da ordem Dermaptera incluindo lacraias da família Forficulidae, *Forficula auricularia* Linnaeus (pequena lacraia européia); *Chelisoches morio* Fabricius (pequena lacraia preta).

Trichoptera

- 10 Outros insetos de interesse incluem ninfas e adultos da ordem Blattodea incluindo baratas provenientes da família e Blattellidae Blattidae, *Blatta orientalis* Linnaeus (barata oriental); *Blattella asahinai* Mizukubo (barata asiática); *Blattella germanica* Linnaeus (barata alemã); *Supella longipalpa*
15 Fabricius (barata de listras marrom); *Periplaneta americana* Linnaeus (barata americana); *Periplaneta brunnea* Burmeister (barata marrom); *Leucophaea maderae* Fabricius (barata Madeira).

- Estão também incluídos os adultos e larvas da ordem Acari (ácaros), tais como *Aceria tosichella* Keifer (acarídeos de
20 cacho de trigo); *Petrobia latens* Müller (acarídeos de trigo marrom); ácaros vermelhos e ácaros da família Tetranychidae, *Panonychus ulmi* Koch (ácaro vermelho europeu), *Tetranychus urticae* Koch (ácaro rajado); (*T. mcdanieli* McGregor (ácaro McDaniel); *T. cinnabarinus* Boisduval (ácaro carmim); *T.*
25 *turkestani* Ugarov & Nikolski (ácaro aranha de morango); ácaros planos da família Tenuipalpidae, *Brevipalpus lewisi* McGregor (acarídeos planos de cítricos); ácaro da falsa ferrugem e o ácaro da gema, da família Eriophyidae e outros ácaros de
30 alimentação foliar e ácaros importantes na saúde humana e animal, isto é, os ácaros da família Epidermoptidae, ácaros

foliculares da família Demodicidae, ácaros de grãos da família Glycyphagidae, carrapatos na ordem Ixodidae. *Ixodes scapularis* Say (carrapato de veados); *Ixodes holocyclus* Neumann (carrapato paralisador Australiano); *Dermacentor variabilis* Say (carrapato de cão americano); *Amblyomma americanum* Linnaeus (carrapato de estrela solitária) e ácaros de sarna e de coceira nas famílias Psoroptidae, Pyemotidae, e Sarcoptidae.

Insetos-praga da ordem Thysanura são de interesse, tais como *Lepisma saccharina* Linnaeus (tisanuro); *Thermobia domestica* Packard (*firebrat*).

Concretizações exemplares da invenção pesticida utilizam diferentes modos de ação para evitar o desenvolvimento de resistência, por exemplo, de lagartas de raiz de milho. Resistência a lagartas de raiz pode ser introduzida na cultura de plantas por qualquer método conhecido no estado da técnica. Em algumas concretizações, os diferentes modos de ação pesticida incluem ligação de toxina a diferentes sítios de ligação na membrana do intestino das lagartas de raiz de milho. Transgenes da presente invenção úteis contra lagartas de raiz incluem, mas não estão limitados a, estes que codificam proteínas *Bt*. Outros transgenes adequados para outras pragas também são discutidos aqui e são conhecidos no estado da técnica.

Em algumas concretizações da invenção, o método de introdução de resistência inclui a introdução de um gene pesticida na planta. Um exemplo não limitante de tal gene é um gene que codifica uma toxina *Bt*, tal como um homólogo de uma toxina Cry conhecida. "Toxina *Bt*" destina-se a significar a mais ampla classe de toxinas encontradas em diferentes cepas de *Bt*, que inclui toxinas, tais como, por exemplo, as proteínas

inseticidas vegetativas e as δ -endotoxinas. Ver, por exemplo, Crickmore et al. (1998) Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62:807-813; Crickmore et al. (2004) Bacillus Thuringiensis Toxin Nomenclature em Nomenclatura lifesci.sussex.ac.uk / Home /

5 Neil_Crickmore / Bt. As proteínas inseticidas vegetativas (por exemplo, os membros das classes VIP1, VIP2, ou VIP3) são proteínas inseticidas secretadas que sofrem processamentos proteolíticos por fluidos no intestino médio dos insetos. Elas têm atividade pesticida contra um amplo espectro de insetos lepidópteros. Ver, por exemplo, Patente US No. 5877012. As δ -endotoxinas *Bt* são tóxicas para larvas de uma série de pragas, incluindo os membros das ordens Lepidóptera, Díptera, Coleóptera. Estas toxinas de insetos incluem, mas não se limitam a toxinas Cry, incluindo, por exemplo, Cry1, Cry3, 15 Cry5, Cry8, e Cry9.

Em certas concretizações as plantas produzem mais de uma toxina, por exemplo, através de empilhamento de genes. Por exemplo, os construtos de DNA nas plantas das concretizações podem incluir qualquer combinação de sequências de nucleotídeos 20 de interesse empilhadas, a fim de criar plantas com uma característica desejada. Uma "característica", como utilizado aqui, refere-se ao fenótipo derivado de uma sequência particular ou grupos de sequências. Um único cassete de expressão pode conter tanto um nucleotídeo codificando uma 25 proteína pesticida de interesse e, pelo menos, um gene adicional, como um gene empregado para aumentar ou melhorar uma qualidade desejada da planta transgênica. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(is) pode(m) ser fornecido(s) em cassetes de expressão múltiplos. As combinações geradas também podem

incluir várias cópias de qualquer um dos polinucleotídeos de interesse.

Por exemplo, pilhas de genes nas plantas das concretizações podem conter um ou mais polinucleotídeos codificando polipeptídeos tendo atividade pesticida e / ou inseticida, tais como proteínas tóxicas *Bt* (descritos, por exemplo, Patente US Nos. 5,188,960; 5,277,905; 5,366,892; 5,593,881; 5,625,136; 5,689,052; 5,691,308; 5,723,756; 5,747,450; 5,859,336; 6,023,013; 6,114,608; 6,180,774; 6,218,188; 6,342,660; e 7,030,295; Pubilação de Pedido Nos. US20040199939 e US20060085870; WO2004086868; e Geiser et al. (1986) Gene 48:109. (1986) Gene 48:109) e proteínas de cristal *Bt* das classes Cry34 e Cry35 (ver, por exemplo, Schnepf et al. (2005) Appl. Environ. Microbiol. 71:1765-1774). As proteínas inseticidas vegetativas também são previstas para utilização em pilhagem de gene (por exemplo, os membros das classes VIP1, VIP2, ou VIP3). Ver, por exemplo, Patente US Nos. 5,849,870; 5,877,012; 5,889,174; 5,990,383; 6,107,279; 6,137,033; 6,291,156; 6,429,360; Pubilação de Pedido Nos. US20050210545; US20040133942; US20020078473.

AS δ -endotoxinas *Bt* ou toxinas Cry que podem ser utilizadas em pilhas de genes são bem conhecidas no estado da técnica. Ver, por exemplo, Publicação de Pedido No. US20030177528. Estas incluem as toxinas Cry 1 até Cry 42, Cyt 1 e 2, toxina tipo Cyt, e as toxinas *Bt* binárias. Existem atualmente mais de 250 espécies conhecidas de δ -endotoxinas *Bt* com uma vasta gama de especificidades e toxicidades. Para uma lista expansiva ver Crickmore et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813, e para as atualizações regulares através da World Wide Web, ver biols.susx.ac.uk / Home / Neil_

Crickmore / Bt / index. Os critérios para inclusão nesta lista é que as proteínas tenham semelhança de sequência significativa com uma ou mais toxinas na nomenclatura ou ser uma proteína de inclusão parasporal de *Bacillus thuringiensis* que exibe
 5 atividade pesticida, ou que tenha algum efeito tóxico experimentalmente verificável para um organismo alvo. No caso das toxinas Bt binárias, aqueles qualificados na técnica reconhecem que duas toxinas Bt devem ser co-expressas para induzir a atividade inseticida Bt.

10 Exemplos específicos, não limitantes de toxinas Bt Cry de interesse incluem o grupo constituído por Cry 1 (tais como Cry1A, Cry1A (um), Cry1A (b), Cry1A (c), Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F), Cry 2 (tais como Cry2A), Cry 3 (tais como Cry3Bb), Cry
 15 5, Cry 8 (ver GenBank Nos de acesso CAD57542, CAD57543, ver também Pedido de Patente US No. 10/746,914), Cry 9 (tais como Cry9C) e Cry34/35, bem como fragmentos funcionais, modificações quiméricas ou embaralhadas, ou outras variantes destas.

20 Genes empilhados em plantas das concretizações também podem codificar polipeptídeos com atividade inseticida diferente das proteínas Bt tóxicas, tais como lectinas (Van Damme et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24:825, pentina (descritos na Patente US No. 5,981,722), lipases (lipídio acil hidrolases, ver, por exemplo, aquelas divulgadas na Patente US Nos. 6,657,046 e 5,743,477; ver também WO2006131750A2), colesterol
 25 oxidases de *Streptomyces*, e proteínas pesticidas derivadas de espécies de bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, espécies de *Bacillus laterosporus*, e espécies de *Bacillus sphaericus*, e similares. Também está prevista a utilização de toxinas quiméricas (híbridas) (ver, por exemplo Bosch et al. (1994)
 30 *Bio/Technology* 12:915-918).

Tais transformantes podem conter transgenes que são obtidos a partir da mesma classe de toxinas (por exemplo, mais de uma δ -endotoxina, mais de uma lipase pesticida, mais de uma toxina binária, e similares), ou os transgenes podem ser
 5 provenientes de diferentes classes de toxinas (por exemplo, uma δ -endotoxina em combinação com uma lipase pesticida ou uma toxina binária). Por exemplo, uma planta com a capacidade de expressar uma δ -endotoxina inseticida derivada de *Bt* (como Cry1F), também tem a capacidade de expressar, pelo menos, outra
 10 δ -endotoxina que é diferente da proteína Cry1F, tais como, por exemplo, uma proteína Cry1A (b). Do mesmo modo, uma planta com a capacidade de expressar uma δ -endotoxina inseticida derivada de *Bt* (como Cry1F), também tem a capacidade de expressar uma lipase pesticida, como, por exemplo, uma lipídio acil
 15 hidrolase.

Na prática, algumas combinações de empilhados dos vários genes *Bt* e outros genes descritos anteriormente são mais adequadas para determinadas pragas, com base na natureza da
 ação pesticida e da susceptibilidade de certas pragas para
 20 determinadas toxinas. Por exemplo, algumas combinações transgênicas são particularmente adequadas para uso com vários tipos de vaquinha (CRW), incluindo WCRW, vaquinha do norte (NCRW) e vaquinha mexicana (MCRW). Essas combinações incluem pelo menos Cry34/35 e Cry3A; e Cry34/35 e Cry3B. Outras
 25 combinações também são conhecidas para outras pragas. Por exemplo, combinações adequadas para utilização contra o ECB e / ou broca de milho do sudoeste (SWCB) incluem pelo menos empilhamento de Cry1Ab e Cry1F, Cry1Ab e Cry2, Cry1Ab e cry9, Cry1Ab e Cry2/Vip3A, Cry1Ab e Cry1F/Vip3A pilha, Cry1F e Cry2,
 30 Cry1F e cry9, bem como Cry1F e Cry2/Vip3A. Combinações

adequadas para utilização contra lagarta de espiga de milho (CEW) incluem pelo menos pilha de Cry1Ab e Cry2, Cry1F e Cry2, Cry1Ab e Cry1F, Cry2 e Vip3A, Cry1Ab e Cry2/Vip3A, pilha de Cry1Ab e Cry1F/Vip3A, bem como pilha de Cry1F e Cry2 / Vip3A.

- 5 Combinações adequadas para utilização contra lagarta de cartucho de outono (FAW) incluem pelo menos pilha de Cry1F e Cry1Ab, Cry1F e Vip3A, Cry1Ab e Cry1F/Vip3A, pilha de Cry1F e Cry2/Vip3A, e pilha de Cry1Ab e Cry2/Vip3A, combinações adequadas para utilização contra lagarta de rosca (*black cutworm* BCW) e / ou lagarta de corte de feijão ocidental (WBCW)
- 10 incluem Cry1F e Vip3A, Cry1F e Cry2, bem como pilha de Cry1F e Cry2/Vip3A. Além disso, estes diferentes combinações podem ser ainda combinadas umas com as outras, a fim de oferecer manejo de resistência a múltiplas pragas.

- 15 As plantas das concretizações também podem conter pilhas de genes que contenham uma combinação de genes para produzir plantas com uma variedade de combinações de características desejadas, incluindo, mas não se limitando a, características desejáveis para a alimentação animal, como a genes de óleo de
- 20 alta qualidade (por exemplo, Patente US No. 6,232,529); aminoácidos equilibrados (por exemplo, hordotioninas (Patente US Nos. 5,990,389; 5,885,801; 5,885,802; 5,703,049); cevada com proteínas de alta lisina (Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165:99-106; WO 98 / 20.122) e alta metionina (Pedersen
- 25 et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:6279; Kirihara et al. (1988) Gene 71:359; Musumura et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 123)), maior digestibilidade (por exemplo, proteínas de armazenamento modificadas (Patente US No. 6,858,778) e tioredoxinas (Patente US No. 7,009,087)).

As plantas das concretizações também podem conter pilhas de genes que compreendam genes que resultem em características desejáveis para a resistência às doenças (por exemplo, genes de desintoxicação de fumonisina (Patente US No. 5,792,931); genes de virulência e resistência às doenças (Jones et al. (1994) Science 266 : 789; Martin et al. (1993) Science 262:1432; Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089).

Em outras concretizações, a primeira e / ou segunda culturas de plantas resistentes a pragas contêm ainda um gene de resistência a herbicida que prevê tolerância a herbicida, por exemplo, ao glifosato-N-(fosfonometil) glicina (incluindo a forma de sal de isopropilamina desses herbicidas). Genes de resistência a herbicida exemplares incluem glifosato N-acetiltransferase (GAT) e 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), incluindo aquelas divulgadas na Publicação de Pedido No. US20040082770, assim como WO02/36782 e WO03/092360). Genes de resistência a herbicida geralmente codificam para uma proteína alvo-modificada insensível ao herbicida ou para uma enzima que degrada ou desintoxica o herbicida na planta antes que ele possa atuar. Ver, por exemplo, DEBLOCK et al. (1987) EMBO J. 6:2513; DEBLOCK et al. (1989) Plant Physiol. 91:691; Fromm et al. (1990) Biotecnologia 8:833; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603; e Frisch et al. (1995) Plant Mol. Biol. 27:405-9. Por exemplo, a resistência ao herbicida glifosato ou sulfoniluréia foi obtida usando-se genes codificadores para as enzimas alvo mutantes, EPSPS e acetolactato sintase (ALS). A resistência ao glufosinato de amônio, bromoxinil, e 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) tem sido obtida através dos genes que codificam para fosfinotricina-acetiltransferase bacteriana, uma nitrilase, ou um 2,4-

diclorofenoxiacetato monooxigenase, que desintoxicam os respectivos herbicidas. Também são contemplados inibidores de glutamina sintetase, como fosfinotricina ou basta (por exemplo, gene bar).

5 Outras plantas das concretizações podem conter empilhamentos compreendendo características desejáveis para processamento ou transformação dos produtos, tais como óleos modificados (por exemplo, genes de ácidos graxos desaturase (Patente US Nos. 5,952,544; 6,372,965)); amidos e féculas

10 modificados (por exemplo, ADPG pirofosforilases (AGPase), amido sintases (SS), enzimas de ramificação de amido (SBE), e enzimas de desramificação de amido (SDBE)); e polímeros ou bioplásticos (por exemplo, Patente US No. 5,602,321; beta-cetotiolase, polihidroxibutirato sintase, e acetoacetil-CoA redutase

15 (Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170:5837-5847)). Poderíamos também combinar os polinucleotídeos da concretização com polinucleotídeos proporcionando características agronômicas, tais como a esterilidade masculina (por exemplo, ver Patente US No. 5,583,210), força de espiga, tempo de

20 floração, ou características de tecnologia de transformação, como regulação do ciclo celular ou alvejamento de gene (por exemplo, WO 99/61619; Patente US Nos. 6,518,487 e 6,187,994).

Estas combinações de empilhamentos podem ser criadas por qualquer meio, incluindo, mas não se limitando a, reproduções-

25 cruzada de plantas por qualquer metodologia convencional ou TopCross, ou a transformação genética. Se as seqüências são empilhadas através de transformação genética das plantas, as seqüências polinucleotídicas de interesse podem ser combinadas em qualquer momento e em qualquer ordem. Por exemplo, uma

30 planta transgênica compreendendo uma ou mais característica

desejada pode ser usada como alvo para introdução de novas características por transformação subsequente. As características podem ser introduzidas simultaneamente em um protocolo de co-transformação com os polinucleotídeos de interesse providos em qualquer combinação de cassetes de transformação. Por exemplo, se duas seqüências serão introduzidas, as duas seqüências podem estar contidas em cassetes de transformação separados (trans) ou contidas no mesmo cassete de transformação (cis). A expressão das seqüências pode ser conduzida pelo mesmo promotor ou por diferentes promotores. Em certos casos, pode ser desejável introduzir um cassete de transformação que irá suprimir a expressão do polinucleotídicas de interesse. Isto pode ser combinado com qualquer combinação de outros cassetes de supressão ou cassetes de superexpressão para gerar a combinação desejada de características da planta. É ainda reconhecido que seqüências polinucleotídicas podem ser empilhadas em uma localização genômica desejada utilizando-se um sistema de recombinação sítio-específica. Ver, por exemplo, WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855 e WO 99/25853.

Dado o entendimento atualmente aceito de que um refúgio de 20% é adequado para a expressão de dose elevada de uma única proteína de resistência a inseto, pode ser preferível, pelo menos por razões regulamentares, a adotar algo razoavelmente perto de uma mistura de 80% -20% de uma primeira e uma segunda semente transgênica resistentes a pragas. Embora a invenção divulgada aqui não seja tão limitada, dependendo-se das características da proteína pesticida produzida, diferentes misturas podem ser ótimas para uma determinada praga, em geral pensa-se que uma mistura 80-20 é razoável, em muitos casos,

quando as proteínas pesticidas são produzidas em altas doses pela plantas transgênicas. Misturas de sementes que visam às mesmas pragas através de um modo diferente de ação pesticida, no entanto, são menos susceptíveis de produzir insetos resistentes, uma vez que é altamente improvável que um inseto tenha resistência para ambos os modos distintos de ação. Como resultado, tais casos prestam-se a diferentes distribuições que não seja uma mistura 80-20 (embora se deva entender que a invenção não se limita a uma determinada aplicação ou razão).

10 Além disso, as resistências a pragas podem ser conferidas através de tratamento de materiais de propagação vegetal. Antes que o material vegetal (frutas, tubérculos, bulbos, cormo, grãos, sementes), mas, sobretudo de sementes, é vendida como um produto comercial, que é habitualmente tratada com um
15 revestimento compreendendo herbicidas protetores, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematicidas, moluscicidas, ou misturas de várias destas preparações, se o desejar, juntamente com outros carreadores, surfactantes, ou a adjuvantes promotores de aplicação habitualmente empregados no estado da
20 técnica de formulação para fornecer proteção contra danos causados por bactérias, fungos, parasitas ou animal. A fim de tratar as sementes, revestimentos protetores podem ser aplicados nas sementes, quer por impregnação dos tubérculos ou dos grãos com uma formulação líquida ou pelo revestimento
25 destas com um combinado úmido ou seco da formulação. Além disso, em casos especiais, outras modalidades de aplicação para as plantas são possíveis, por exemplo, o tratamento direcionado a gomos ou a fruta.

Além disso, os genes nativos de resistência também podem
30 ser utilizados na presente invenção, tais como maysin (Waiss,

et al., J. Econ. Entomol. 72:256-258 (1979)); cisteína proteases de milho, como MIR1-PB, (Pechan, T. et al., Plant Cell 12:1031-40 (2000)); DIMBOA (Klun, JA et al., J. Econ. Entomol. 60:1529-1533 (1967)); e genes para aperto de casca (Reitor, BG et al., J. Econ. Entomol. 95:1303-1307 (2002)). Esses genes podem ser utilizados no contexto das plantas em que são encontrados, ou inseridos em outras plantas transgênicas através de meios transgênicos conhecidos no estado da técnica e / ou discutidos aqui.

10 Métodos de manejo de resistência de pragas em um terreno de espécies vegetais pragas-resistentes são prestados. Tal método inclui cultivar uma primeira planta resistente à praga em um terreno, em um ciclo de plantação, e cultivar em um segundo ciclo de plantação, uma segunda cultura de planta
15 resistente a praga no mesmo terreno, onde a primeira e a segunda planta pragas-resistentes cultivadas são pesticidas para uma mesma praga-alvo, mas através de um modo diferente de ação pesticida. É reconhecido que uma característica de resistência pode ser introduzida em uma cultura de plantas por
20 transformação (isto é, transgênicos) ou por métodos tradicionais de reprodução. Alternativamente, um agente pesticida externo, como um tratamento de sementes ou um pesticida químico pode ser utilizado como uma ou ambas as fontes de resistência à praga.

25 O método evita o desenvolvimento de resistência em uma praga alvo por matar pragas resistentes que são selecionadas no primeiro ciclo de plantação durante o segundo ciclo de plantação. Isto é realizado através da utilização de uma fonte de resistência à praga no segundo ciclo de plantação que age
30 através de um modo de ação diferente do proveniente da fonte de

resistência a pragas do primeiro ciclo de plantação. Como resultado, a probabilidade é de que qualquer parasita resistente que sobreviva ao primeiro ciclo de plantação baseado na resistência à primeira fonte de resistência a pragas, será
5 morto durante o segundo ciclo de plantação, uma vez que a resistência primeira fonte de resistência a pragas não confere resistência a segunda fonte de resistência à praga devido aos diferentes modos de ação pesticida. Assim, ao contrário dos requisitos de refúgio aceitos atualmente, um refúgio adequado
10 pode ser gerado em um segundo ciclo de plantação, o que torna possível a partir de uma perspectiva IRM de ter uma colheita plena de plantas resistentes a pragas a cada ciclo de plantação e ainda gerir o desenvolvimento de resistência em pragas.

Usando-se este método da invenção, um produtor pode
15 plantar uma cultura de milho em um terreno da plantação no ciclo seguinte ao cultivo de milho no mesmo terreno. Antes da invenção, isto não era aconselhável devido ao risco de danos ao sistema radicular da cultura. Além disso, uma vez que tem ocorrido recentemente atividade de vaquinha em outras culturas,
20 os métodos fornecem um meio de controlar do sistema radicular e difundir uma estratégia de manejo da resistência para lagartas de raiz.

Em outra concretização, é fornecido um método para minimizar ou eliminar a necessidade de um refúgio estruturado
25 em um terreno, tal como atualmente é exigido como descrito anteriormente. Isto é conseguido através da plantação em um terreno de uma mistura de sementes com características de resistência a pragas alvo, através de diferentes modos de ação.

A título de exemplo não limitante, na cultura do milho,
30 pragas nas ordens Lepidóptera e Coleóptera são de interesse

frequente, em especial, pragas tais como CRW e ECB, bem como outras anteriormente descritas. Também como se referiu anteriormente, é vantajoso para os agricultores ter tanto quanto possível de uma cultura resistente a pragas prevalentes em uma determinada área, a fim de maximizar a produtividade.

A fim de ter tantas plantas resistentes a pragas quanto possível, enquanto ainda se mantém a manejo da resistência pragas, as plantas no terreno são providas com mais de um mecanismo de resistência a pragas para ao menos uma praga. Por exemplo, se pretende-se reduzir ou eliminar a necessidade de um refúgio estruturado para os ECB, as plantas no terreno seriam providas de pelo menos duas formas de resistência a pragas ECB, com diferentes modos de ação. Neste contexto, a possibilidade de desenvolvimento de pragas resistentes ECB é drasticamente reduzida, como a probabilidade de que uma determinada praga tenha uma mutação aleatória necessária para proporcionar resistência a ambos os modos de ação pesticida seria remota. Exemplos não limitantes de combinações de fontes de resistência a pragas que podem ser utilizadas no contexto da presente invenção foram descritos anteriormente no que diz respeito a ambos ECB e outras pragas, e pode incluir transgenes produzindo diferentes proteínas *Bt* (ou outras proteínas que fornecem essas resistências), pesticidas químicos, tratamentos de sementes, ou uma combinação dos mesmos. Pares particulares de proteínas *Bt* com diferentes modos de ação foram descritos acima.

Assim, plantas exibindo esses primeiro e segundo modos de resistência pesticida provavelmente não exigirão um refúgio estruturado separado, ou, no mínimo, exigiriam um refúgio substancialmente menor. Um pequeno refúgio seria aceitável, porque normalmente um refúgio deve produzir cerca de 500

insetos suscetíveis para cada inseto resistente que sobrevive à exposição às culturas resistentes. Como a cultura com modo de ação duplo iria produzir substancialmente menos (se houver) insetos sobreviventes resistentes, correspondentemente um menor número de insetos suscetíveis seria necessário a partir de um refúgio. Como resultado, este método é uma forma eficaz para reduzir ou eliminar a exigência de um refúgio em um terreno de plantas e ainda manejar o desenvolvimento de insetos resistentes com eficácia.

10 Além disso, o mesmo método pode ser empregado para várias pragas no mesmo terreno. Por exemplo, uma planta pode ter resistência a ambas as ECB e CRW, através de dois modos de ação semelhantes, através de combinações listadas acima. Se um terreno compreende duas plantas com resistência a pragas alvo, cada uma através de dois diferentes modos de ação, os refúgios para cada uma dessas pragas devem poder ser eliminados ou reduzidos. Como resultado, o agricultor já não necessita sacrificar a produtividade em uma porção de uma plantação, a fim de evitar o desenvolvimento de resistência de insetos. Além disso, este método também impede o cumprimento de questões discutidas anteriormente que um agricultor pode, no interesse do aumento da produtividade, ou simplesmente através de procedimentos de plantio imperfeitos, não plantar um refúgio suficiente para gerir o desenvolvimento de parasitas resistentes.

Os métodos divulgados podem, por exemplo, ser usados para atrasar o desenvolvimento de resistência a insetos-praga das ordens Lepidóptera e Coleóptera, enquanto aumenta a área total de um terreno e ainda fornecem proteção contra danos causados as culturas por essas pragas. Em um terreno de plantas

resistentes a pragas, isto pode ser feito de várias formas. Por exemplo, o terreno pode incorporar, pelo menos, cerca de 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, ou 99% de plantas produtoras de proteínas Cry1A (b), Cry1F, e Cry34/35, com o restante das plantas produtoras de proteínas Cry1A (b) e Cry1F. Isto resulta em 100% das plantas no terreno com resistência a pelo menos uma praga da ordem Lepidóptera, e um aumento da percentagem de plantas com resistência a pelo menos uma praga da ordem Coleóptera. Isto é possível porque Cry1A (b) e Cry1F têm diferentes modos de ação contra pragas lepidópteras, e, como tal, ter dois modos de ação contra essas pragas significa que apenas um número muito pequeno de pragas com resistência a ambas irá sobreviver no terreno. Isto significa que, pouco ou nenhum refúgio é necessário para impedir o desenvolvimento de parasitas resistentes, como o número de parasitas resistentes já é muito pequeno. Como tal, a totalidade das culturas plantadas no terreno apresenta resistência a pelo menos uma praga lepidóptera. Diferentes combinações de proteínas podem ser utilizadas, tal como aqui descrito, para alvejar especialmente pragas lepidópteras que causam problemas em uma região de interesse.

Além disso, uma maioria substancial do terreno também é protegida de pelo menos uma praga Coleóptera. A natureza da reação das pragas a proteínas Cry34/35 (ver Pedido de Patente Provisório US No. 60/977,477), permite uma maior percentagem do que a de 80% geralmente aceita, do terreno em expressar essas proteínas, enquanto continua a ter refúgio suficiente para a(s) praga(s) Coleóptera(s) de interesse. Como resultado, em tal sistema, todo o terreno do produtor tem proteção para pelo menos uma praga lepidóptera de interesse, e uma maioria

substancial do terreno também possui proteção para pelo menos uma praga Coleóptera de interesse.

No caso em que um refúgio é exigido para pragas lepidópteras, o terreno pode incorporar também um terceiro tipo
5 de semente que incorpora tolerância a pragas Coleóptera, mas não a pragas lepidópteras. Isto ainda fornece proteção contra pragas sobre uma percentagem maior de um determinado terreno, mas também fornece alguns refúgios de insetos para diluir qualquer inseto lepidóptero resistente que sobreviver.

10 Embora a invenção seja descrita predominantemente usando exemplos de pragas que afetam milho, a presente invenção também pode ser aplicada a áreas onde é necessário manejo de resistência no contexto de outras culturas, incluindo a soja, trigo, cevada, sorgo, algodão e similares. A invenção também
15 pode ser utilizada em combinação, de modo que várias pragas podem ser controladas no decorrer do método, quer seja por meio transgênico ou não.

Em algumas concretizações, uma ou ambas as culturas de plantas resistentes a pragas são ainda tratadas com um agente
20 inseticida ou pesticida. O "agente pesticida" é um pesticida que é fornecido externamente à cultura de plantas, ou das sementes de uma das culturas vegetal. O termo "agente inseticida" tem o mesmo significado que agente pesticida, exceto pelo fato que seu uso é destinado para aqueles casos
25 onde a praga é um inseto. Pesticidas adequados para a utilização da invenção incluem piretrinas e piretróides sintéticos; derivados de oxadiazina (ver, por exemplo, Patente US No. 5,852,012); cloronicotinilos (ver, por exemplo, Patente US No. 5,952,358); derivados de Nitroguanidina (ver, por
30 exemplo Patente US Nos. 5,633,375; 5,034,404 e 5,245,040);

triazóis; organofosforados; pirroles, pirazoles e fenilpirazoles (ver, por exemplo, Patente US No. 5,952,358); diacilhidrazinas; carbamatos, produtos biológico / fermentação. Pesticidas conhecidos dentro dessas categorias são indicados, por exemplo, The Pesticide Manual, 11ª ed., (1997) ed. CDS Tomlin (British Crop Protection Conselho, Farnham, Surrey, UK). Quando um inseticida é descrito aqui, é para ser entendido que a descrição se destina a incluir formas de sal do inseticida, assim como qualquer forma isomérica e / ou tautomérica do inseticida que apresente a mesma atividade inseticida como a forma do inseticida que é descrita. Os inseticidas que são úteis no presente método podem ser de qualquer grau ou pureza que passa no comércio como tais inseticidas. Em outras concretizações ainda, a primeira e / ou segunda cultura de plantas resistentes a pragas é opcionalmente tratada com acaricidas, nematicidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas, e suas combinações.

Para estender transgenes ou genes nativos de resistência que são usados, vários promotores conhecidos no estado da técnica também podem ser empregados a fim de tanto aumentar ou diminuir a expressão da proteína-alvo, e, conseqüentemente, afetar a quantidade de refúgio que ainda seja necessária. Se o objetivo é refúgio menor ou ausente para uma praga, na maioria das vezes será desejada uma maior expressão para produzir uma "alta dose" de proteína expressa. Em alguns casos, no entanto, um maior número de parasitas adultos pode ser preferível, a fim de acompanhar o desenvolvimento de resistência ou de se produzir um refúgio maior para uma praga e, como tal, pode ser apropriado diminuir a expressão.

Apesar de que as concretizações expostas terem sido descritas com algum pormenor, a título de ilustração e de exemplo para fins de clareza de entendimento, será evidente que algumas modificações e alterações podem ser praticadas no

5 âmbito das reivindicações anexas. Todas as publicações e os pedidos de patente mencionados no relatório descritivo são indicativos do nível dos versados na técnica aos quais as concretizações desta invenção pertencem. Todas as publicações e pedidos de patente estão aqui incorporados por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para reduzir o desenvolvimento de pragas resistentes em um campo de culturas transgênicas resistentes a praga caracterizado por compreender as etapas de:

a) misturar sementes de uma primeira cultura transgênica resistente a praga com sementes de uma segunda cultura transgênica resistente a pragas para fornecer uma mistura de sementes onde a dita primeira cultura transgênica resistente a praga e a dita segunda cultura transgênica resistente a praga são pesticidas para a mesma praga alvo, mas através de um modo de ação pesticida diferente, em que a dita mistura de sementes consiste em a partir de cerca de 99% até cerca de 1% da dita primeira cultura transgênica resistente a praga e a partir de cerca de 1% até cerca de 99% da dita segunda cultura transgênica resistente a praga; e

b) plantar a dita mistura de sementes.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita praga é selecionada a partir do grupo constituído por: vaquinha ocidental, vaquinha do norte, vaquinha mexicana, vaquinha do sul, e suas combinações.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita praga é a vaquinha ocidental.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os ditos diferentes modos de ação compreendem

pesticidas de ligação semi-competitiva ou não-competitiva a membrana do intestino da dita mesma praga alvo.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender, ainda, tratar as sementes da dita primeira cultura transgênica resistente a praga e/ou da dita segunda cultura transgênica resistente a praga com um agente pesticida.

10 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dito agente pesticida é selecionado a partir de um grupo constituído por: um inseticida, um acaricida, um nematocida, um fungicida, um bactericida, um herbicida, ou uma combinação dos mesmos.

15 7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito agente pesticida é um inseticida

20 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito inseticida é selecionado a partir do grupo constituído por: uma piretrina, um piretrina sintética, uma oxadiazina, um cloronicotinil, uma nitroguanidina, um triazol, um organofosforado, um pirrol, um pirazol, um fenilpirazole, uma diacilhidrazina, um produto biológico/de fermentação, um carbamato, ou uma combinação dos mesmos.

25

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz proteínas Cry34/35 e a dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma
30 proteína Cry3.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz proteínas Cry34/35 e a dita segunda
5 cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1F.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas
10 resistentes a praga produz uma proteína Cry1A(b) e a dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1F.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
15 fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1A(b) e a dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry9.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
20 fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1A(b) e a dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry2.

25 14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1F e dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma
30 proteína Cry2.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1A(b) e a dita
5 segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry2 e uma proteína Vip3A.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas
10 resistentes a praga produz uma proteína Cry1F e a dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry2 e uma proteína Vip3A.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
15 fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1A(b) e a dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1F e uma proteína Vip3A.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga e/ou a dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga contém ainda um gene de resistência a herbicida selecionado do grupo constituído por:
20 glifosato N-acetiltransferase (GAT), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), fosfinotricina N-acetiltransferase (PAT) ou uma combinação dos mesmos.

19. Método para reduzir o desenvolvimento de pragas resistentes em um campo de culturas transgênicas resistentes a praga caracterizado por compreender as etapas de:

- a) misturar um primeiro tipo de semente e um segundo tipo de semente para produzir uma mistura de sementes, em que o primeiro tipo de semente são as sementes de uma cultura de plantas transgênicas resistentes a praga compreendendo um primeiro transgene e um segundo transgene, o primeiro tipo de semente tendo atividade pesticida contra uma primeira praga alvo e uma segunda praga alvo, e em que o segundo tipo de semente não tem atividade pesticida contra a primeira praga alvo ou a segunda praga alvo, em que a dita mistura de sementes inclui cerca de 90% até cerca de 99% do primeiro tipo de semente e de cerca de 10% até cerca de 1% do segundo tipo de semente; e
- b) plantar as sementes da dita mistura.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a dita primeira praga alvo é selecionada a partir do grupo constituído por: vaquinha ocidental, vaquinha do norte, vaquinha mexicana, vaquinha do sul, e suas combinações.

21. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a dita primeira praga alvo é a vaquinha ocidental.

22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o primeiro tipo de semente é pesticida para, pelo menos, uma praga através de, pelo menos, dois modos diferentes de ação pesticida, os diferentes modos de ação pesticida que incluam ambas as ligações semi-competitivas ou não-competitivas na membrana do intestino da pelo menos uma praga.

23. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por compreender, ainda, tratar o primeiro tipo de semente e/ou o segundo tipo de semente com um agente pesticida.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que dito agente pesticida é selecionado a partir do grupo constituído de piretrinas e piretrinas sintéticas, oxadiazinas, cloronicotinilos, nitroguanidinas, triazóis, organofosfatos, pirroles, pirazoles, fenilpirazoles, diacilhidrazinas, produtos biológicos/de fermentação, e carbamatos.

25. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína selecionada de um grupo constituído das proteínas Cry34/35, Cry1F, Cry1A(b), Cry2, Cry3, Cry9 ou combinações das mesmas.

26. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a cultura de plantas transgênicas resistentes a praga produz uma proteína Cry1F e uma proteína Cry1A(b).

27. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a cultura transgênica resistente a praga produz uma proteína Cry 34/35, uma proteína Cry1A(b), e uma proteína Cry1F.

5

28. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que dita mistura de sementes compreende cerca de 95% de sementes do primeiro tipo e cerca de 5% de sementes do segundo tipo.

10

29. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que dita primeira cultura de plantas transgênicas resistentes a praga ou dita segunda cultura de plantas transgênicas resistentes a praga contém ainda um gene de resistência a herbicida selecionado a partir do grupo constituído por: glifosato N-acetiltransferase (GAT), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), fosfinotricina N-acetiltransferase (PAT) ou uma combinação dos mesmos.

15

20

30. Método de manejo de resistência de pragas em um terreno de culturas resistentes a praga caracterizado por compreender:

- a) fornecer sementes de uma primeira cultura transgênica resistente a praga, a primeira cultura transgênica resistente a praga expressando um primeiro transgene e um segundo transgene, o primeiro transgene proporcionando maior tolerância ou resistência a pelo menos uma praga Coleóptera e o segundo transgene proporcionando resistência a pelo menos uma praga Lepidóptera,

25

- b) fornecer sementes de uma segunda cultura transgênica resistente a praga, a segunda cultura transgênica resistente a praga expressando um terceiro transgene, o terceiro transgene proporcionando resistência, pelo menos, a mesma praga lepidóptera através de um modo de ação outro do que o segundo transgene pesticida, e
- c) plantar as sementes da primeira cultura transgênica resistente a praga e as sementes da segunda cultura transgênica resistente a praga em um terreno.

10

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma praga Coleóptera é selecionada a partir de um grupo constituído por vaquinha ocidental, vaquinha do norte, vaquinha mexicana, vaquinha do sul, ou combinações dos mesmos.

15

32. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma praga Lepidóptera é selecionada do grupo constituído por broca do milho européia, broca de milho do sudoeste, lagarta de espiga de milho, lagarta militar de outono, lagarta de corte de feijão preto, lagarta de corte ocidental, ou combinações dos mesmos.

20

33. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por compreender, ainda, tratar as ditas sementes da primeira cultura transgênica resistente a praga e/ou as ditas sementes da segunda cultura transgênica resistente a praga com um agente pesticida.

25

34. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o dito agente pesticida é selecionado a partir do grupo constituído por: um inseticida, um acaricida, um nematocida, um fungicida, um bactericida, um herbicida, ou uma
5 combinação dos mesmos.

35. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o dito agente pesticida é um inseticida.

● 10 36. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o dito inseticida é selecionado a partir do grupo constituído por: uma piretrina, uma piretrina sintética, uma oxadiazina, um cloronicotinil, uma Nitroguanidina, um triazol, um organofosforado, um pirrol, um pirazole, um
15 fenilpirazole, um diacilhidrazina, um produto biológico/de fermentação, um carbamato, ou uma combinação dos mesmos.

37. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a dita primeira cultura de planta transgênica
● 20 resistente a praga e/ou a dita segunda cultura de planta transgênica resistente a praga ainda incorpora um gene de resistência a herbicida selecionado a partir do grupo constituído por: glitoxato N-acetiltransferase (GAT), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), fosfinotricina
25 N-acetiltransferase (PAT) ou uma combinação dos mesmos.

38. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a expressão do primeiro transgene causa expressão da proteína Cry34/35 em uma planta.

39. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a expressão do segundo transgene causa expressão de uma proteína Cry1F em uma planta.

5 40. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a expressão do terceiro transgene causa expressão de uma proteína em uma planta, em que a proteína é selecionada a partir do grupo constituído pelas proteínas Cry1A(b), Cry1F, Cry2, e Cry9.

10

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a proteína é uma proteína Cry1A(b).

15

42. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a proteína é uma proteína Cry1F.

20

43. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a primeira cultura transgênica resistente a praga expressa um quarto transgene e a segunda cultura transgênica resistente a praga expressa um quinto transgene, e onde a expressão do primeiro transgene causa a expressão da proteína Cry34/35 em uma planta, a expressão do segundo transgene causa a expressão da proteína Cry1F em uma planta, a expressão do terceiro transgene causa a expressão da proteína Cry1F em uma planta, a expressão do quarto transgene causa de a expressão de uma proteína Cry1A(b) em uma planta, e a expressão do quinto transgene causa a expressão de uma proteína Cry1A(b) em uma planta.

25

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que as sementes da primeira cultura transgênica resistente a praga incluem pelo menos cerca de 90% do total das culturas plantadas no terreno.

5

45. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado por compreender ainda: fornecer sementes de uma terceira cultura transgênica resistente a praga, a segunda cultura transgênica resistente a pragas expressando um quarto transgene, o quarto transgene proporcionando resistência a, pelo menos, a mesma praga Coleóptera, mas que não oferece resistência a, pelo menos, a mesma praga Lepidóptera.

10

46. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o quarto transgene e o segundo transgene compreendem o mesmo transgene.

15

47. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a expressão do quarto transgene causa a expressão de uma proteína em uma planta, em que a proteína é selecionada a partir do grupo constituído pelas proteínas Cry34/35 e Cry3.

20

48. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a primeira cultura transgênica resistente a praga inclui pelo menos cerca de 85% do total de plantas cultivadas no terreno.

25

49. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a primeira cultura transgênica resistente a

30

praga inclui pelo menos cerca de 90% do total de plantas cultivadas no terreno.

50. Método de acordo com a reivindicação 45, caracterizado
5 pelo fato de que a primeira cultura transgênica resistente a praga inclui pelo menos cerca de 95% do total de plantas cultivadas no terreno.

RESUMO**MÉTODO PARA REDUZIR O DESENVOLVIMENTO DE PRAGAS RESISTENTES EM UM CAMPO DE CULTURAS TRANSGÊNICAS RESISTENTES A PRAGA E MÉTODO DE MANEJO DE RESISTÊNCIA DE PRAGAS EM UM TERRENO DE CULTURAS RESISTENTES A PRAGA**

São descritas estratégias de refúgio de insetos para o manejo do desenvolvimento da resistência dos insetos. A presente invenção diz respeito, em geral, ao controle de pragas que causam danos às plantas cultivadas e, em particular para plantas de milho, pelas suas atividades de alimentação dirigidas a danos na raiz, e mais especialmente para o controle dessas pragas de plantas, através da exposição das pragas alvo a sementes ou misturas de sementes com vários modos diferentes de ação. Cada um do primeiro um ou mais transgenes e do segundo um ou mais transgenes são, respectivamente, inseticidas para o mesmo inseto alvo, mas têm diferentes modos de ação, e ligam-se tanto semi-competitivamente ou não-competitivamente a diferentes sítios de ligação da praga alvo. Além disso, também é descrito o tratamento dessas sementes com um pesticida químico ou peptídeo-associado antes de plantar a semente.