



Sistema para avaliação de risco de resistência de insetos a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas

Aline de Holanda Nunes Maia¹, Marcelo Gonçalves Narciso², Durval Dourado Neto³

¹ Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil, aline.maia@embrapa.br

² Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil, marcelo.narciso@embrapa.br

³ Departamento de Produção Vegetal, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil, ddourado@usp.br

RESUMO

O sistema RRiskBtWeb foi desenvolvido para avaliação de risco de evolução de resistência de insetos a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas. A evolução de resistência de insetos a qualquer agente de controle é um processo natural e contribui para a redução da vida útil da tecnologia. RRiskBtWeb é uma versão WEB do software RRiskBt, desenvolvido em Visual Basic, em 2003. Naquela época, não era ainda permitido o cultivo de plantas transgênicas no Brasil e o software foi construído para auxiliar no estabelecimento de estratégias preventivas de manejo de resistência, anteriores à liberação da tecnologia de plantas transgênicas inseticidas. Recentemente, após 2013, começaram a surgir falhas de controle de importantes lepidópteros-praga nas lavouras de milho transgênico, acarretando sérios danos econômicos nos sistemas de produção. Esse evento motivou o desenvolvimento da versão mais acessível aos usuários em geral, o RRiskBtWeb, que pode ser executado em qualquer computador com um navegador de Internet. Esse sistema simula o processo de evolução da resistência em diferentes cenários, gerando informações cientificamente embasadas para auxílio à tomada de decisão sobre estratégias de manejo da resistência, especialmente o tamanho de refúgio.

PALAVRAS-CHAVE: RRiskBtweb, *Bacillus thuringiensis*, culturas inseticidas.

ABSTRACT

The RRiskBtWeb System was developed for assessing the risk of insect resistance evolution to Bt toxin expressed in transgenic insecticidal crops. Insect resistance evolution in response to any control agent is a natural process, which contributes to reduction of the technology

useful life. RRiskBtWeb is a Web version of the RRiskBt software, developed in Visual Basic language in 2003. At that time, cultivation of transgenic crops was not still allowed in Brazil; the software was constructed as a tool for helping definition of preventive resistance management strategies, before liberation of the insecticidal plant technology. Recently, after 2013, control failures of important Lepidopteran pests started to appear in transgenic crop fields, leading to serious economic damage in the corn production systems. Such event motivated the development of a more accessible version, the RRiskBtWeb, which can be run in any computer with Internet browser. This system simulates resistance evolution process in different scenarios thus generating scientifically sound information for helping decision making on resistance management strategies, specially the refuge size.

KEYWORDS: RRiskBtweb, *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crops.

INTRODUÇÃO

Culturas transgênicas que expressam genes que codificam para a produção de toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), são cultivadas em vários países desde 1996. As toxinas Bt são ativas contra algumas espécies de pragas das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Por esse motivo, as culturas nas quais esses genes foram incorporados são chamadas plantas transgênicas inseticidas. O principal risco ambiental associado à adoção das culturas inseticidas é a evolução de resistência das pragas-alvo a essas toxinas, processo que pode ser retardado pela adoção de estratégias de manejo. A principal estratégia adotada é o uso de materiais genéticos que expressem a toxina Bt em alta concentração nos tecidos da planta, combinada com adoção de refúgios estruturados. Os refúgios são áreas ocupadas por plantas do mesmo híbrido ou variedade da cultura transgênica, mas que não expressem a toxina (ILSI-HESI, 1998; USEPA, 2001; SCIENTIFIC ADVISORY PANEL, 2001). A modelagem matemática é a ferramenta utilizada para definição do tamanho e localização dos refúgios, uma vez que experimentos em campo para monitorar evolução de resistência em diferentes cenários são impraticáveis.

O sistema RRiskBtWeb é uma versão Web do Software RRiskBt (não registrado), desenvolvido em Visual Basic por Maia et al. (2003). Naquela época, não era ainda permitido o cultivo de transgênicos no Brasil e o uso de modelos seria útil para o estabelecimento de estratégias preventivas anteriores à adoção da tecnologia de plantas inseticidas. O software RRiskBT foi utilizado no âmbito do projeto internacional intitulado *International Project on GMO Environmental Risk Assessment Methodologies*, (<http://www.gmoera.umn.edu/>) num

estudo de caso sobre avaliação de risco de resistência da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) a toxinas Bt expressas na cultura do algodão.

O modelo matemático que serviu de base para o desenvolvimento do software RRiskBt, codificado em linguagem Java (Caprio,1998a), estava disponível, à época, sem restrição de acesso; seus fundamentos teóricos estão descritos em Caprio (1998b). Trata-se de um modelo determinístico para simular a evolução de resistência via projeções pontuais da frequência do alelo de resistência (FreqR) à toxina Bt incorporada numa cultura transgênica, na população de uma praga-alvo, ao final de cada geração da praga, em diferentes cenários. Os cenários são definidos pelo tamanho da área de refúgio (área ocupada pela cultura convencional, não transgênica) e pelo manejo de pragas nessa área (USEPA, 2001). No software RRiskBt, foram incorporados módulos para análise de sensibilidade e incertezas não contempladas no Modelo de Caprio (Caprio,1998a). Recentemente, após 2013, começaram a surgir falhas de controle de diversas pragas do milho em materiais Bt, o que ocasionou o resgate do interesse pelos modelos de evolução de resistência de insetos a culturas inseticidas. Esse evento, motivou a construção de uma versão Web do RRiskBt, para atendimento à demanda dos setores envolvidos.

O sistema RRiskBtWeb foi construído para ser executado a partir de um navegador e pode ser acessada em qualquer ambiente (IBM AIX, Linux, FreeBSD, Windows, MacOS, etc.) enquanto a versão em Visual Basic (RRiskBt) roda apenas em ambiente Windows. A disponibilização desse sistema é uma demanda de diferentes setores envolvidos na pesquisa sobre manejo da evolução da resistência de insetos em culturas transgênicas inseticidas.

O objetivo deste trabalho é apresentar o sistema RRiskBtWeb e demonstrar sua utilidade na geração de informações técnico-científicas para auxílio à definição de políticas públicas relacionadas à regulamentação do manejo preventivo da resistência de insetos, fundamentado na adoção de áreas de refúgio.

MATERIAL E MÉTODOS

O Sistema RRiskBtWeb foi desenvolvido utilizando as linguagens HTML, CSS, e JavaScript, para simular o processo de evolução da resistência à toxina Bt, em populações de insetos-praga de culturas transgênicas inseticidas. É uma versão do software RRiskBt (não registrado), desenvolvido em 2003 (MAIA, 2003).

O software RRiskBt

O software RRiskBt, construído em linguagem Visual Basic, foi baseado no modelo determinístico de Caprio (CAPRIO, 1998a e CAPRIO, 1998b), para gerar projeções da frequência de insetos resistentes à toxina Bt, em populações de pragas-alvo das culturas de milho e algodão Bt, a partir de informações sobre: i) características da cultura transgênica; ii) genética de resistência, sobrevivência e dispersão da praga-alvo e iii) fatores operacionais do manejo de pragas área da cultura não transgênica (refúgio) (MAIA, 2003; MAIA e DOURADO-NETO, 2004).

No modelo de Caprio e versões dele derivadas (RRiskBt e RRiskBtWeb), considera-se que a resistência é governada por um par de genes com dominância incompleta: os indivíduos homocigotos recessivos (RR) são resistentes a qualquer concentração da toxina Bt expressa nos tecidos da planta, os heterocigotos (RS) podem ser resistentes ou susceptíveis, dependendo da concentração da toxina e os indivíduos SS são susceptíveis.

A evolução da resistência é quantificada pelas frequências do alelo R (FreqR) ou do genótipo RR (FreqRR), ao longo das gerações da praga, até ser atingida uma frequência crítica (FreqCritica) definida pelo usuário. Os parâmetros de entrada do modelo (*input data*) são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de entrada para simular a evolução da resistência à toxina Bt em pragas-alvo, utilizando o modelo determinístico de Caprio.

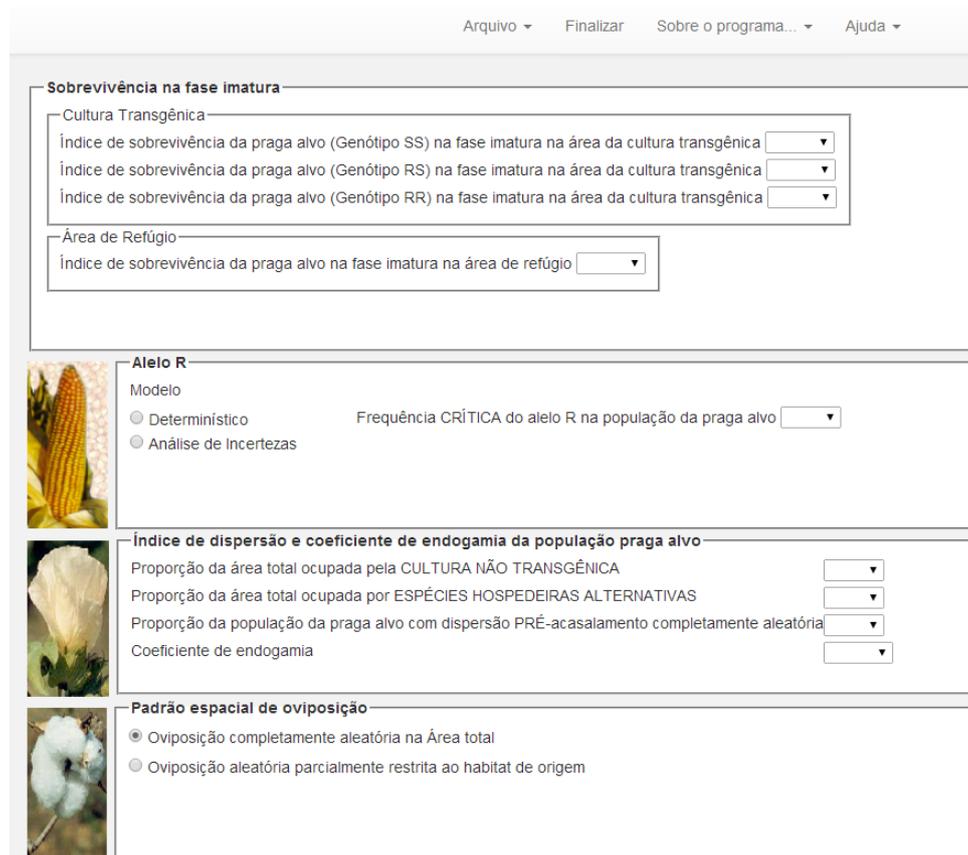
Parâmetro	Descrição
AreaDeRefugio	Proporção da área total ocupada pelo refúgio
FreqInicial	Frequência inicial do alelo de resistência (R) na área de refúgio
FreqCritica	Frequência crítica do alelo R na área da cultura transgênica
SFImatRef	Sobrevivência da lagarta-do-cartucho durante a fase imatura, na área de refúgio.
CoefEndogamia	Coeficiente de endogamia da população da lagarta-do-cartucho
SFImatSStran	Sobrevivência da subpopulação SS durante a fase imatura na área da cultura transgênica
SFImatRRtran	Sobrevivência da subpopulação RR durante a fase imatura na área da cultura transgênica
SFImatRStran	Sobrevivência da subpopulação RS durante a fase imatura na área da cultura transgênica
DispPRErand	Proporção de indivíduos de cada <i>habitat</i> que se dispersa de forma aleatória na área total antes do acasalamento
DispPOStrand	Proporção de indivíduos com dispersão pré-acasalamento restrita aos respectivos <i>habitats</i> de origem que se dispersa de forma aleatória na área total após o acasalamento

No RRiskBt, também foram incorporados ao modelo de Caprio, módulos de análise de sensibilidade e de análises de incertezas. A análise de sensibilidade permite avaliar a influência de variações nos parâmetros de entrada do modelo sobre as variáveis prognósticas

(FreqR ao longo das gerações da praga e número de gerações até que a FreqCritica seja atingida, NGer). A análise de incertezas considera incertezas associadas a alguns parâmetros de entrada do modelo, representadas via distribuições de probabilidade. Permite obter projeções probabilísticas das métricas da evolução de resistência e dessa forma quantificar o de risco de resistência na população de insetos ao longo das gerações, em diferentes cenários (MAIA e DOURADO-NETO, 2004).

O Sistema RRiskBtWeb

O sistema RRiskBtWeb foi construído para ser executado a partir de um navegador, e assim pode ser acessado por intermédio de um servidor ou ainda rodar em qualquer computador que tenha navegador Firefox, Safari ou Google Chrome. A versão em Visual Basic (RRiskBt) roda apenas em ambiente Windows, enquanto a versão Web pode ser acessada em qualquer ambiente (IBM AIX, Linux, FreeBSD, Windows, MacOS, etc.) desde que haja um navegador disponível, conforme descrito anteriormente. A linguagem usada para os cálculos foi JavaScript, que é executada no computador do usuário, não sendo necessário o uso de um servidor, embora o servidor possa ser usado para disponibilizar as páginas do sistema.



The screenshot displays the RRiskBtWeb web interface with the following sections and controls:

- Menu:** Arquivo, Finalizar, Sobre o programa..., Ajuda.
- Sobrevivência na fase imatura:**
 - Cultura Transgênica:** Three dropdown menus for survival indices of pest genotypes (SS, RS, RR) in the transgenic area.
 - Área de Refúgio:** One dropdown menu for the survival index of the pest in the refuge area.
- Alelo R:**
 - Modelo:** Radio buttons for "Determinístico" and "Análise de Incertezas".
 - Frequência CRÍTICA do alelo R na população da praga alvo:** A dropdown menu.
- Índice de dispersão e coeficiente de endogamia da população praga alvo:**
 - Proporção da área total ocupada pela CULTURA NÃO TRANSGÊNICA:** A dropdown menu.
 - Proporção da área total ocupada por ESPÉCIES HOSPEDEIRAS ALTERNATIVAS:** A dropdown menu.
 - Proporção da população da praga alvo com dispersão PRÉ-acasalamento completamente aleatória:** A dropdown menu.
 - Coefficiente de endogamia:** A dropdown menu.
- Padrão espacial de oviposição:**
 - Oviposição completamente aleatória na Área total:** A radio button.
 - Oviposição aleatória parcialmente restrita ao habitat de origem:** A radio button.

Figura 1 – Tela inicial do RRiskBtWeb com campos para inserção das seguintes informações: a) valores dos parâmetros de entrada do modelo, descritos na Tabela 1; b) escolha do tipo de análise: determinística ou incorporando análise de incertezas, e c) padrão espacial de oviposição.

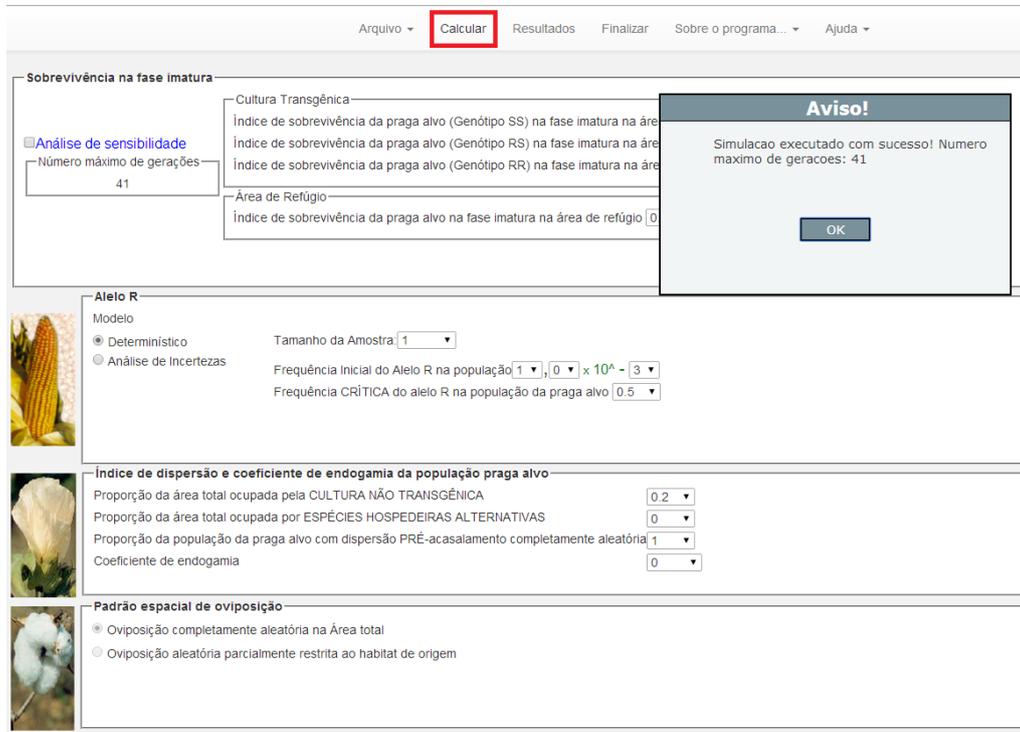


Figura 2 – Tela do sistema RRiskBtWeb obtida após execução de uma simulação do modelo determinístico, após informação sobre os valores dos parâmetros de entrada do modelo, descritos na Tabela 1.

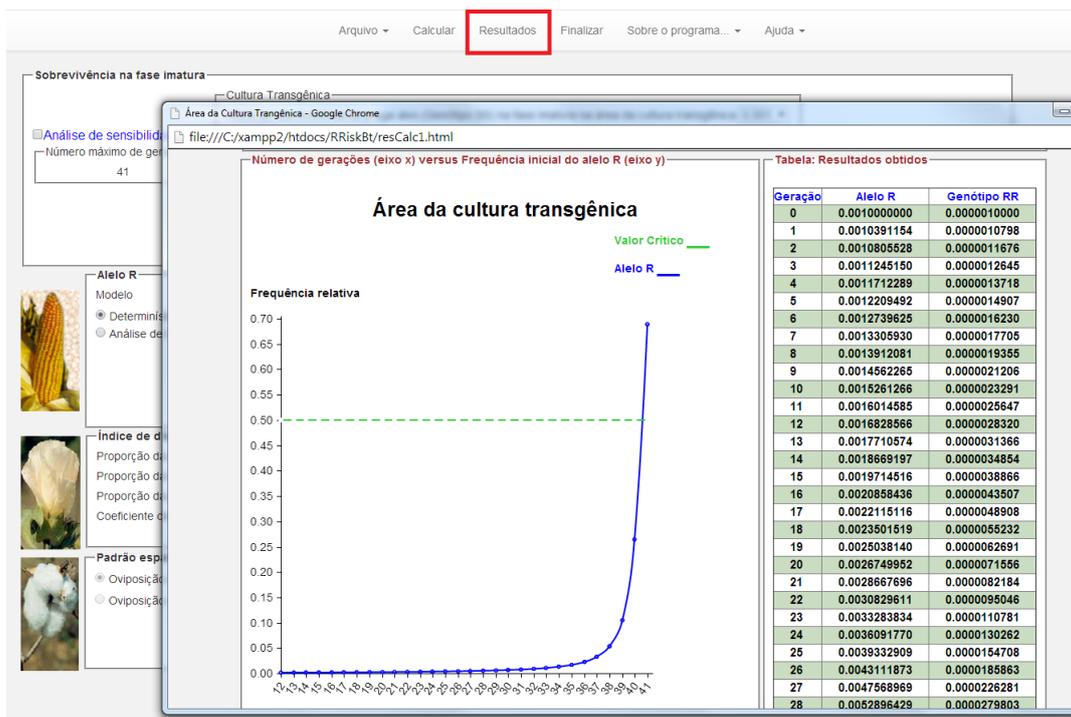


Figura 3 – Tela do sistema RRiskBtWeb obtida após execução de uma simulação do modelo determinístico, ao escolher a opção “Resultados”. O gráfico representa a evolução de resistência, expressa como frequência relativa do alelo R, ao longo das gerações da praga-alvo da toxina Bt. A tabela mostra os valores da frequência do alelo R e do genótipo RR, ao longo das gerações da praga, até que a frequência crítica de 0,5 (50%) seja atingida.

O programa permite que as informações sobre os parâmetros sejam digitadas na própria tela inicial (Figura 1) ou carregadas pela leitura de um arquivo de dados. Após a leitura e carregamento desse arquivo, o sistema fornece opções para executar o modelo e mostrar os resultados. Na Figura 2, é ilustrada a tela gerada após a execução de uma análise determinística, obtida ao clicar na opção “Calcular”; na Figura 3, tabelas e gráficos relativos ao resultado da simulação, obtidos ao clicar na opção “Resultados”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste sistema, a evolução da resistência pode ser simulada de duas formas distintas, a saber:

a) Determinística: são obtidos valores pontuais de FreqR ou FreqRR, ao longo das gerações, até que a FreqCritica seja atingida. Os dados de entrada são valores pontuais dos parâmetros do modelo.

b) Probabilística: são obtidos valores pontuais de FreqR ou FreqRR, ao longo das gerações, até que a FreqCritica seja atingida, para cada valor ou combinação de valores dos parâmetros do modelo considerados na análise de incertezas. Assim, são obtidas distribuições de probabilidade de FreqR, ao longo do tempo e calculado o risco de resistência ($\text{prob}[\text{FreqR} > \text{FreqCritica}]$) ao longo das gerações da praga (ANDERSON e HATTIS, 1999).

No primeiro caso, é gerada uma tabela com os valores de FreqR e FreqRR a cada geração, até que FreqR exceda a FreqCritica, e um gráfico, mostrando a evolução de FreqR ao longo das gerações da praga alvo. No modelo que incorpora análise de incertezas, são gerados os seguintes resultados: (i) um arquivo com os n valores de FreqInicial amostrados da distribuição de probabilidade escolhida para representação da incerteza desse parâmetro (Normal truncada, Triangular ou Uniforme) e o histograma correspondente; (ii) um arquivo com os valores de FreqR para cada geração da praga, correspondentes a cada valor amostrado de FreqInicial; (iii) um gráfico do risco de resistência em função do número de ordem da geração da praga-alvo; (iv) uma tabela com a informação utilizada para gerar o gráfico e (v) um arquivo com a seguinte informação: distribuição de probabilidade escolhida para

caracterizar a incerteza de FreqInicial, tamanho da área de refúgio utilizada na simulação, número de ordem da geração da praga e risco de resistência.

Apresentamos um estudo de caso onde é simulado o processo de evolução de resistência na população de uma praga-alvo, numa cultura transgênica com apenas uma toxina Bt inserida, expressa nos tecidos da planta numa concentração considerada ‘alta dose’, usando a abordagem probabilística. Os valores dos parâmetros de entrada do modelo foram os seguintes: SFImatRRTran=1; SFImatRSTran=0,002; SFImatSSTran=0,001; FreqCritica=0,5; DispPRErand=1; DispPOSrand=1 e CoefEndogamia=0. A evolução da resistência foi simulada para dois cenários (Tabela 2): (I) sem área de refúgio e (II) com área de refúgio de 20% da área total, com aplicação de um inseticida com eficiência de 80%, o que corresponde a uma mortalidade de 20% da fase imatura da praga na área de refúgio (SFImatRef=20% ou 0,2). Foi usado o valor médio de FreqInicial de 1×10^{-3} , com amplitude de 0 a 2×10^{-3} com base em informações de Andow e Alstad (1998). As distribuições usadas para caracterizar a incerteza desse parâmetro foram a Uniforme (U), Triangular (T) e Normal Truncada Simétrica (NTS).

Tabela 2 - Cenários utilizados para a geração da distribuição empírica de FreqR para diferentes combinações de tamanho de refúgio e sobrevivência da fase imatura da praga-alvo na área de refúgio.

Cenário	AreaDeRefugio	SFImatRef ⁽¹⁾	Distribution
I	0	-	Uniforme
	0	-	Triangular Simétrica
	0	-	Normal Truncada Simétrica
II	20	20 ⁽²⁾	Uniforme
	20	20	Triangular Simétrica
	20	20	Normal Truncada Simétrica

¹ Sobrevivência da fase imatura da praga-alvo na área de refúgio; ²Aplicação de inseticida com 80% de eficiência para a praga-alvo na área de refúgio.

Observa-se uma rápida evolução do risco de resistência no cenário sem refúgio (I), com o risco atingindo 100% já na oitava geração da praga, independente da distribuição utilizada na análise de incertezas. Isso corresponde a quatro anos, numa região com duas gerações da praga-alvo por ano. Já no cenário com área de refúgio de 20% (II), o risco atinge 100% em torno da geração 200 – o que corresponde a 100 anos, considerando a mesma região do cenário I (Figura 4).

De posse dessas informações, é possível comparar os riscos associados a cada cenário e avaliar qual tamanho de refúgio seria mais adequado, considerando os custos envolvidos e o tempo de duração pretendido para a tecnologia Bt. Quanto maior o refúgio, maior a duração

da tecnologia, mas isso implica em perda de produtividade pelo ataque da praga no refúgio (MAIA e DOURADO-NETO, 2004).

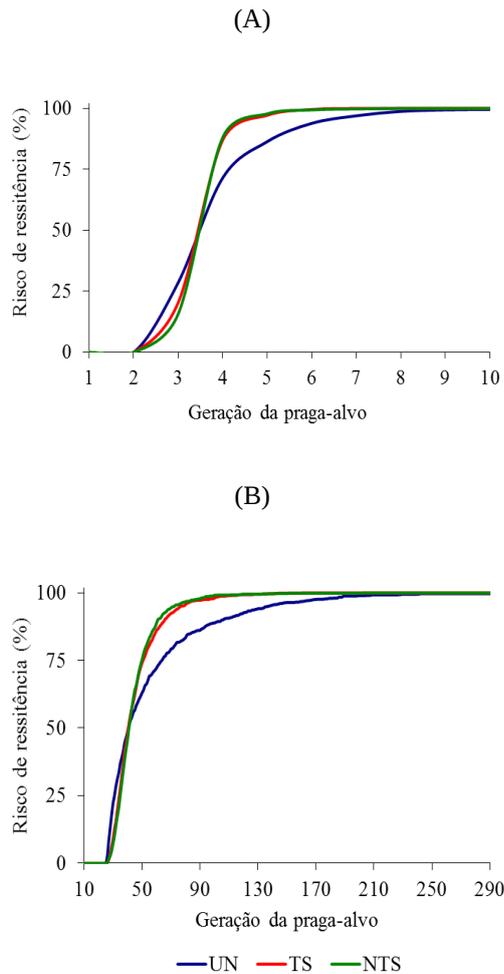


Figura 4 – Risco de resistência à toxina Bt expressa numa cultura transgênica, na população de uma praga alvo, em função do número de gerações da praga, para 0 (A) e 20% (B) de área de refúgio, considerando as diferentes distribuições para caracterizar a incerteza da frequência inicial do alelo de resistência (FreqInicial): Uniforme (UN), Triangular simétrica (TS) e Normal truncada simétrica (NTS)

CONCLUSÕES

O Software RRiskBtWeb apresenta a vantagem, em relação ao RRiskBt, de ser mais acessível aos usuários, podendo ser executado em qualquer computador com acesso à Internet. A abordagem probabilística para quantificar o risco de evolução de resistência é

fundamental para fornecer informações cientificamente embasadas sobre o tamanho de refúgio a ser recomendado, num estágio em que o conhecimento sobre os parâmetros dos modelos, especialmente para FreqInicial e DFRes, é ainda extremamente incerto. A análise de incertezas permite que amplitudes de variação dos parâmetros de entrada do modelo (*input parameters*) observadas na literatura, ou mesmo o conhecimento subjetivo de especialistas, seja incorporado à simulação via distribuições de probabilidade. O modelo implementado (modelo de Caprio) é relativamente simples, quando comparado aos modelos espaciais estocásticos, e portanto, mais adequado quando não há informação detalhada sobre os padrões de dispersão da praga nos períodos de pré e pos-oviposição. O software RRiskBtWeb permite a geração de informações cientificamente embasadas para auxílio à tomada de decisão sobre estratégias de manejo preventivo da resistência de insetos a toxinas expressas em plantas transgênicas, fundamentado na adoção de áreas de refúgio. O sistema também é útil como ferramenta didática para entendimento dos fatores que influenciam o processo de evolução da resistência e da importância das ferramentas probabilísticas para auxílio à tomada de decisão em ambientes de incerteza.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, E. L.; HATTIS, D. Foundations: uncertainty and variability. **Risk analysis**, v.19, n.1, p.47-49, 1999.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D.N. F2 Screen for Rare Resistance Alleles. **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p.572-578, 1998.
- CAPRIO, M.A. Non random mating model, 1998a. Disponível em: <[www.msstate.edu/Entomology/PgJava/ILSI model.html](http://www.msstate.edu/Entomology/PgJava/ILSI%20model.html)> Acesso em: 12 out. 2003.
- CAPRIO, M. A. Evaluating resistance management for multiple toxins in presence of external refuges. **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.5, p.1021-1031, 1998b.
- ILSI/HESI. An evaluation of insect resistance management in Bt field corn: a science based framework for risk assessment and risk management. 1999. Disponível em:<<https://research.cip.cgiar.org/confluence/download/attachments/3443/Q41.pdf>> Acesso em: 21 set. 2003.
- MAIA, A. de H. N. Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análise de incertezas. Piracicaba, 2003.