

**MODELAGEM DA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PRAGAS A TOXINAS
Bt EXPRESSAS EM CULTURAS TRANSGÊNICAS: QUANTIFICAÇÃO DE
RISCO UTILIZANDO ANÁLISE DE INCERTEZAS**

ALINE DE HOLANDA NUNES MAIA

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 2003

**MODELAGEM DA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PRAGAS A TOXINAS
Bt EXPRESSAS EM CULTURAS TRANSGÊNICAS: QUANTIFICAÇÃO DE
RISCO UTILIZANDO ANÁLISE DE INCERTEZAS**

ALINE DE HOLANDA NUNES MAIA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **DURVAL DOURADO NETO**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia Área de
Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 2003

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Maia, Aline de Holanda Nunes

Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análise de incertezas / Aline de Holanda Nunes Maia. - - Piracicaba, 2003.

108 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Bactéria entomopatogênica 2. Controle biológico 3. Plantas produtoras de pesticidas 4. Plantas transgênicas 5. Pragas agrícolas 6. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 581.158

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICO

À minha filha **BÁRBARA**, pelo amor incondicional, e

Aos meus pais José Amirto Nunes Maia e Pastora Holanda Maia, camponeses das margens do rio do Jaguar, oásis perdido no árido sertão cearense, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Durval Dourado Neto, pela orientação, dedicação e amizade.

Aos Professores dos Departamentos de Produção Vegetal, Ciências Exatas (Setor de Estatística) e Economia, Administração e Sociologia, pelos conhecimentos adquiridos no decorrer do Curso.

Ao Professor Dr. Paulo Augusto Manfron pelas sugestões apresentadas.

Às secretárias do Departamento de Produção Vegetal, Elisabete Aparecida Sarkis São João, Luciane Aparecida Lopes Toledo, Maria Célia Rodrigues e Sílvia Borghesi, pelo apoio.

À Bibliotecária Eliana Maria Garcia pela revisão da formatação geral do texto e do item REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

À Embrapa Meio Ambiente e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Culturas transgênicas inseticidas	5
2.1.1 Uso do Bt como inseticida	5
2.1.2 Genes Bt inseticidas e culturas transgênicas Bt	6
2.1.3 Área cultivada e níveis de adoção no mundo	8
2.1.4 Principais culturas transgênicas Bt	9
2.1.4.1 Milho Bt	10
2.1.4.2 Algodão Bt	11
2.2 Resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas ..	14
2.2.1 Fatores que influenciam a evolução da resistência	15
2.2.1.1 Fatores genéticos	16
2.2.1.1.1 Frequência inicial do alelo de resistência	16
2.2.1.1.2 Dominância da resistência	17
2.2.1.1.3 Custo adaptativo	19
2.2.1.1.4 Número de genes envolvidos	20
2.2.1.2 Fatores associados à bioecologia da população da praga alvo	20
2.2.1.2.1 Mortalidade biótica e abiótica	20

2.2.1.2.2	Dispersão da praga alvo	21
2.2.1.2.3	Sincronia de acasalamentos	23
2.2.1.2.4	Número de gerações da praga alvo por ano	23
2.2.1.2.5	Diversidade de hospedeiros da praga alvo	24
2.2.1.3	Fatores operacionais.....	24
2.2.1.3.1	Número de genes Bt inseridos na planta	25
2.2.1.3.2	Expressão da toxina Bt na planta transgênica	25
2.2.1.3.3	Manejo da resistência.....	26
2.2.2	Estratégias de manejo da resistência	26
2.2.2.1	Variedades expressando toxinas em alta doses e adoção de refúgio	28
2.2.2.2	Materiais genéticos expressando múltiplas toxinas	28
2.2.2.3	Genótipos expressando toxinas em baixas doses e controle biológico....	28
2.2.2.4	Rotação de culturas transgênicas Bt e não transgênicas	29
2.2.2.5	Expressão seletiva de toxinas	29
2.2.3	A estratégia refúgio/alta dose	29
2.2.3.1	Pressupostos básicos	30
2.2.3.2	Comparação de cenários	30
2.2.3.3	Requerimentos de refúgio para milho e algodão	31
2.3	Modelos para simular a evolução da resistência à toxina Bt expressa em culturas transgênicas	34
2.3.1	Classificação dos modelos	35
2.3.1.1	Modelos determinísticos versus modelos estocásticos	36
2.3.1.2	Modelos biológicos versus modelos bioeconômicos.....	36
2.3.1.3	Modelos estáticos versus modelos dinâmicos.....	37
2.3.1.4	Modelos (explicitamente) espaciais versus modelos não espaciais	37
2.3.2	Principais modelos	37
2.3.2.1	Modelo de Alstad & Andow (1995)	38
2.3.2.2	Modelo de Onstad & Gould (1998)	38
2.3.2.3	Modelo de Caprio (1998a)	38
2.3.2.4	Modelo de Caprio (Caprio, 1998b)	40

2.3.2.5	Modelo de Peck et al. (1999)	40
2.3.2.6	Modelo de Livingston (2000)	41
2.3.2.7	Modelo de Guse et al. (2002)	41
2.4	Avaliação do risco de resistência.....	42
2.4.1	Definição de risco	43
2.4.1.1	Risco como percepção	43
2.4.1.2	Risco como ciência	44
2.4.2	A análise de incertezas como ferramenta para quantificação de risco.....	45
2.4.2.1	Modelagem incorporando análise de incertezas	45
2.4.2.2	Fatores operacionais limitantes	46
2.4.2.2.1	Tempo computacional de processamento	47
2.4.2.2.2	Armazenamento dos resultados	47
2.4.2.2.3	Processamento de resultados com incertezas associadas	47
2.4.2.3	Estratégias computacionais para análise de incertezas	47
2.4.2.3.1	Propagação analítica	48
2.4.2.3.2	Monte Carlo com amostragem aleatória	48
2.4.2.3.3	Monte Carlo com técnicas de amostragem especializadas	49
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	Modelo determinístico de Caprio.....	50
3.1.1	Dados de entrada.....	51
3.1.1.1	Proporção da área total ocupada pelo refúgio (AreaDeRefugio)	53
3.1.1.2	Frequência inicial do alelo de resistência (R) na área de refúgio (FreqInicial)	53
3.1.1.3	Frequência crítica do alelo R na área da cultura transgênica (FreqRCriticaTran)	53
3.1.1.4	Sobrevivência da população da praga alvo durante a fase imatura na área de refúgio (SFImatRef)	53

3.1.1.5	Sobrevivência das subpopulações SS (SFImatSStran), RS (SFImatRStran) e RR (SFImatRRtran) durante a fase imatura na área da cultura transgênica.....	54
3.1.1.6	Coeficiente de endogamia (CoefEndogamia)	54
3.1.1.7	Proporção de indivíduos com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória (DispPRErand)	54
3.1.1.8	Proporção de indivíduos com dispersão pós-acasalamento completamente aleatória (DispPOSrand)	54
3.1.2	Pressupostos do modelo	55
3.1.2.1	Densidade inicial da praga alvo	55
3.1.2.2	Frequência inicial do alelo de resistência	56
3.1.2.3	Arranjo espacial das áreas de refúgio e da cultura transgênica.....	56
3.1.2.4	Sobrevivência dos genótipos SS, SR e RR durante a fase imatura.....	56
3.1.2.5	Dispersão pré-acasalamento.....	56
3.1.2.6	Dispersão pós-acasalamento	56
3.1.2.7	Coeficiente de endogamia	57
3.1.3	Equações gerais do modelo.....	57
3.1.3.1	Cálculo das frequências relativas iniciais dos genótipos RR, RS e SS na população de ovos da primeira geração, em cada um dos habitats.....	57
3.1.3.2	Cálculo das frequências relativas iniciais dos genótipos RR, RS e SS na população de adultos da primeira geração, em cada um dos habitats	58
3.1.3.3	Cálculo das frequências genótípicas nas subpopulações de adultos definidas pelo padrão de dispersão pré-acasalamento	59
3.1.3.4	Cálculo das frequências gênicas dos adultos acasalados nas subpopulações SubPRErand, SubPREref e SubPREtran.....	60
3.1.3.5	Cálculo das frequências genótípicas dos descendentes dos adultos acasalados, nas subpopulações SubPRErand, SubPREref e SubPREtran, na fase de ovo	61

3.1.3.6	Cálculo das frequências genóticas dos descendentes nas subpopulações SubPOSrand, SubPOSref e SubPOStran, na fase de ovo.....	62
3.1.3.7	Cálculo das frequências genóticas nas subpopulações de ovos no refúgio e na área da cultura transgênica, oriundos da oviposição das fêmeas das subpopulações SubPOSrand, SubPOSref e SubPOStran.....	63
3.1.3.8	Cálculo das frequências gênicas nas subpopulações de ovos no refúgio e na área da cultura transgênica, oriundos da oviposição das fêmeas das subpopulações SubPOSrand, SubPOSref e SubPOStran.....	64
3.2	Análise de sensibilidade do modelo determinístico	64
3.3	Caracterização da incerteza associada à frequência inicial do alelo R....	66
3.4	Estimação do risco de resistência ao longo das gerações	69
3.5	Programa computacional.....	70
3.5.1	Modelo determinístico	70
3.5.2	Análise de sensibilidade.....	71
3.5.3	Análise de incertezas.....	72
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.1	Modelo determinístico	74
4.2	Análise de sensibilidade do modelo determinístico	74
4.3	Valores simulados do parâmetro frequência inicial do alelo R.....	85
4.4	Evolução da resistência ao longo das gerações.....	89
4.5	Estimativas de risco de resistência em diferentes cenários.....	95
4.6	Considerações finais	97
5	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Representação esquemática do modelo conceitual utilizado para simular a evolução da resistência da praga alvo à toxina Bt expressa em culturas transgênicas, base para elaboração do software RRiskBt (v.1.00).....	51
2 Exemplo de saída do modelo determinístico: tabela com os valores de <i>FreqR</i> ao longo das gerações da praga e gráfico de evolução da resistência.....	71
3 Sensibilidade da estimativa de <i>FreqR</i> a variações de <i>FreqInicial</i> no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 3, 4, 5, 6 e 15, no cenário sem área de refúgio	76
4 Sensibilidade da estimativa de <i>FreqR</i> a variações de <i>FreqInicial</i> no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 15, 42, 43, 100 e 367, no cenário com área de refúgio igual a 5%	77
5 Sensibilidade da estimativa de <i>FreqR</i> a variações de <i>FreqInicial</i> no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 15, 40, 41, 100 e 292, no cenário com área de refúgio igual a 20%, com aplicação de inseticida.....	78
6 Sensibilidade da estimativa de <i>NGer</i> a variações de <i>FreqInicial</i> no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ nos cenários sem área de refúgio (A), refúgio de 5% (B) e refúgio de 20% com e aplicação de inseticida.....	79
7 Sensibilidade da estimativa de <i>FreqR</i> a variações de <i>DFRes</i> no intervalo $(0, 4 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1 a 6, no cenário sem área de refúgio	81
8 Sensibilidade da estimativa de <i>FreqR</i> a variações de <i>DFRes</i> no intervalo $(0, 4 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 8, 15, 42, 43 e 61 no cenário com área de refúgio igual a 5%	82

9	Sensibilidade da estimativa de <i>FreqR</i> a variações de <i>DFRes</i> no intervalo $(0, 4.10^{-3})$ para as gerações 1, 8,15, 40, 41 e 59, no cenário com área de refúgio igual a 20%, com aplicação de inseticida.....	83
10	Sensibilidade da estimativa de <i>NGer</i> a variações no parâmetro dominância funcional da resistência (<i>DFRes</i>) no intervalo $(0, 4.10^{-3})$ nos cenários sem área de refúgio (A), refúgio de 5% (B) e refúgio de 20% com e aplicação de inseticida (C).....	84
11	Distribuições empíricas construídas com os valores amostrados das distribuições Uniforme (A), Triangular simétrica (B) e Normal truncada simétrica (C) utilizadas para caracterizar a incerteza associada à frequência inicial do alelo <i>R</i> na população da praga alvo.....	88
12	Distribuições empíricas de <i>FreqR</i> ao longo das gerações 1, 3, 4 e 15, referentes ao cenário sem refúgio construídas a partir de uma amostra de 1000 valores da distribuição Uniforme $(0, 2.10^{-3})$ para <i>FreqInicial</i>	90
13	Distribuições empíricas de <i>FreqR</i> ao longo das gerações 1, 3, 4 e 8 referentes ao cenário sem refúgio construídas a partir de uma amostra de 1000 valores da distribuição Triangular simétrica $(0, 2.10^{-3})$ para <i>FreqInicial</i>	91
14	Distribuições empíricas de <i>FreqR</i> ao longo das gerações 1, 3, 4 e 9 referentes ao cenário sem refúgio construídas a partir de uma amostra de 1000 valores da distribuição Normal truncada simétrica $(1.10^{-3}, 0,1453.10^{-6}, 0, 2.10^{-3})$ para <i>FreqInicial</i>	92
15	Risco de resistência à toxina Bt expressa em culturas transgênicas na população de uma praga alvo, em função do número de gerações da praga, para 0 (A), 5% (B) e 20% (C) de área de refúgio, considerando as diferentes distribuições para caracterizar a incerteza de <i>FreqInicial</i> : Uniforme (UN), Triangular simétrica (TS) e Normal truncada simétrica (NTS).....	96

LISTA DE TABELAS

	Página
16 Área ocupada pelas principais culturas transgênicas no mundo em 2002 (James, 2002).....	9
17 Área ocupada por culturas transgênicas nos principais países produtores e variação relativa entre 2000 e 2001 (James, 2002)	9
18 Pragas alvo do milho e algodão Bt (Estados Unidos, 2001a,b)	12
19 Características de produtos comerciais desenvolvidos a partir de vários eventos Bt (Estados Unidos 2001a,b; Deegan 2003).....	13
20 Parâmetros bioecológicos da praga que são utilizados no modelo determinístico de Caprio	52
21 Funções densidade de probabilidade correspondentes às distribuições utilizadas para representar a incerteza associada ao parâmetro <i>FreqInicial</i>	67
22 Média e variância das distribuições para representar a incerteza associada ao parâmetro <i>FreqInicial</i>	68
23 Parametrização das distribuições de probabilidade utilizadas para caracterizar a incerteza associada à <i>FreqInicial</i> : (i) Uniforme: UN(a,b), (ii) Triangular simétrica: TS(a,b) e (iii) Normal truncada simétrica: NTS(a, b, μ , σ^2).....	68
24 Descrição dos cenários utilizados para geração das distribuições empíricas de <i>FreqR</i> ao longo das gerações, com diferentes combinações de valores de sobrevivência da praga alvo (<i>SFimatRef</i> , %) durante a fase imatura na área de refúgio (<i>AreaDeRefugio</i> , %)	69

25 Algoritmos ¹ implementados no <i>software</i> RRiskBt para obtenção de amostras das distribuições Triangular simétrica e Normal truncada simétrica	73
26 Gerações da praga alvo utilizadas na análise de sensibilidade de <i>FreqR</i> aos parâmetros <i>FreqInicial</i> e <i>DFRes</i>	74
27 Sensibilidade de <i>NGer</i> a variações nos parâmetros <i>FreqInicial</i> e <i>DFRes</i> expressa como a razão entre a amplitude de <i>NGer</i> e a estimativa de <i>NGer</i> obtida utilizando o modelo determinístico (<i>NGer*</i>).....	80
28 Valores mínimo e máximo, média e variância das distribuições empíricas: Uniforme: UN(a,b), Triangular simétrica TS(a,b) e Normal truncada simétrica NTS(a, b, μ , σ^2) de <i>FreqInicial</i> obtidas com uma amostra de 1000 valores das respectivas distribuições teóricas (Tabela 8).....	86
29 Percentis das distribuições empíricas de <i>FreqInicial</i> (%) construídas com os n=1000 valores amostrados das distribuições Uniforme (UN), Triangular simétrica (TS) e Normal Truncada Simétrica (NTS)	87
30 Percentis 5, 25, 50, 75 e 95% das distribuições de <i>FreqR</i> , para as gerações 1, 3, 4 e 8 da praga alvo, correspondentes às distribuições Uniforme, Triangular simétrica e Normal Truncada Simétrica, em cenários sem área de refúgio	93
31 Percentis 5, 25, 50, 75 e 95% das distribuições de <i>FreqR</i> , para as gerações 15, 42, 43 e 203 da praga alvo, correspondentes às distribuições Uniforme, Triangular simétrica e Normal Truncada Simétrica, em cenários com área de refúgio de 5%, sem aplicação de inseticida.....	94
32 Percentis 0, 25, 50, 75 e 95% das distribuições de <i>FreqInicial</i> , para as gerações 5, 7, 9 e 11 da praga alvo, correspondentes às distribuições Uniforme, Triangular simétrica e Normal Truncada Simétrica em cenários com área de refúgio de 20%, com aplicação de inseticida	95

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>AreaDeRefugio</i>	Proporção da área total ocupada pela área de refúgio.
<i>CoefEndogamia</i>	Coefficiente de endogamia da população da praga alvo.
FIFRA	<i>Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act</i> .
<i>FreqInicial</i>	Frequência do alelo de resistência (<i>R</i>) na população inicial de <i>Spodoptera frugiperda</i> .
<i>FreqRdispPRErand</i>	Frequência do alelo <i>R</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória.
<i>FreqRdispPREref</i>	Frequência do alelo <i>R</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita ao refúgio.
<i>FreqRdispPREtran</i>	Frequência do alelo <i>R</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita à área da cultura transgênica (<i>SubPREtran</i>).
<i>FreqRRdispPRErand</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória (<i>SubPRErand</i>).
<i>FreqRRdispPREref</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita ao refúgio (<i>SubPREref</i>).
<i>FreqRRdispPREtran</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita à área da cultura transgênica.
<i>FreqRref</i>	Frequência relativa do alelo de resistência (<i>R</i>) à toxina Bt expressa em cultura transgênica, na população da praga alvo na área de refúgio.

<i>FreqRRposRand</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOSrand</i> .
<i>FreqRRposRef</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOSref</i> .
<i>FreqRRposTran</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOStran</i> .
<i>FreqRRpreRand</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPRErand</i> .
<i>FreqRRpreRef</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPREref</i> .
<i>FreqRRpreTran</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPREtran</i> .
<i>FreqRRref</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> no refúgio.
<i>FreqRRtran</i>	Frequência do genótipo <i>RR</i> na cultura transgênica.
<i>FreqRSdispPRErand</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita completamente aleatória.
<i>FreqRSdispPREref</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita ao refúgio.
<i>FreqRSdispPREtran</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita à área da cultura transgênica.
<i>FreqRSposRand</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOSrand</i> .
<i>FreqRSposRef</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOSref</i> .
<i>FreqRSposTran</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOStran</i> .
<i>FreqRSpreRand</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPRErand</i> .

<i>FreqRSpreRef</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPREref</i> .
<i>FreqRSpreTran</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPREtran</i> .
<i>FreqRSref</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> no refúgio.
<i>FreqRStran</i>	Frequência do genótipo <i>RS</i> na cultura transgênica.
<i>FreqRtran</i>	Frequência relativa do alelo de resistência (<i>R</i>) à toxina Bt expressa na cultura transgênica, na população da praga alvo na área da cultura transgênica.
<i>FreqSdispPRErand</i>	Frequência do alelo <i>S</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória.
<i>FreqSdispPREref</i>	Frequência do alelo <i>S</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita ao refúgio.
<i>FreqSdispPREtran</i>	Frequência do alelo <i>S</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita à área da cultura transgênica.
<i>FreqSref</i>	Frequência relativa do alelo de susceptibilidade (<i>S</i>) à toxina Bt expressa na cultura transgênica, na população da praga alvo na área de refúgio.
<i>FreqSSdispPRErand</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória.
<i>FreqSSdispPREref</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita ao refúgio.
<i>FreqSSdispPREtran</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> na subpopulação de adultos com dispersão pré-acasalamento restrita à área da cultura transgênica.
<i>FreqSSposRand</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOSrand</i> .
<i>FreqSSposRef</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOSref</i> .

<i>FreqSSposTran</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> nos descendentes nas subpopulação <i>SubPOStran</i> .
<i>FreqSSpreRand</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPRErand</i> .
<i>FreqSSpreRef</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPREref</i> .
<i>FreqSSpreTran</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> nos descendentes de adultos acasalados nas subpopulação <i>SubPREtran</i> .
<i>FreqSSref</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> no refúgio.
<i>FreqSStran</i>	Frequência do genótipo <i>SS</i> na cultura transgênica.
<i>FreqStran</i>	Frequência relativa do alelo de susceptibilidade ($\$$) à toxina Bt expressa na cultura transgênica, na população da praga alvo na área da cultura transgênica.
<i>FreqTotalDdispPREref</i>	Soma das Frequências genótípicas em <i>SubPREref</i> .
<i>FreqTotalDispPRErand</i>	Soma das Frequências genótípicas em <i>SubPRErand</i> .
<i>FreqTotalDispPREtran</i>	Soma das Frequências genótípicas em <i>SubPREtran</i> .
<i>NGer</i>	Número de gerações da praga até que a frequência crítica seja atingida.
<i>NGer*</i>	Número de gerações da praga até que a frequência crítica seja atingida quando se utiliza modelo determinístico.
<i>SFimatRef</i>	Sobrevivência das subpopulações <i>RR</i> , <i>RS</i> e <i>SS</i> durante a fase imatura na área de refúgio.
<i>SFimatSStran</i>	Sobrevivência da subpopulação <i>SS</i> durante a fase imatura na área da cultura transgênica.
<i>SFimatRRtran</i>	Sobrevivência da subpopulação <i>RR</i> durante a fase imatura na área da cultura transgênica.
<i>SFimatRStran</i>	Sobrevivência da subpopulação <i>RS</i> durante a fase imatura na área da cultura transgênica.
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> .

**MODELAGEM DA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PRAGAS A TOXINAS
Bt EXPRESSAS EM CULTURAS TRANSGÊNICAS: QUANTIFICAÇÃO DE
RISCO UTILIZANDO ANÁLISE DE INCERTEZAS**

Autor: ALINE DE HOLANDA NUNES MAIA

Orientador: Prof. Dr. DURVAL DOURADO NETO

RESUMO

Um dos principais riscos associados às culturas inseticidas que expressam toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) é a evolução de resistência em pragas alvo, processo governado por fatores genéticos e bioecológicos que se inter-relacionam. Um dos parâmetros chave que influenciam a evolução de resistência é a frequência inicial do alelo de resistência na população da praga alvo (*FreqInicial*). Devido à complexidade desse processo, experimentos para estudar sua evolução em larga escala são praticamente impossíveis. Modelos matemáticos de simulação têm sido utilizados para estimar a frequência do alelo de resistência (*FreqR*) à toxina Bt ao longo das gerações da praga. O risco de resistência foi estimado utilizando o modelo de Caprio, incorporando incerteza ao parâmetro *FreqInicial*. Essa abordagem, denominada análise de incertezas, possibilita estimar o risco ao longo das gerações da praga, quantificado pela probabilidade de *FreqR* exceder um valor crítico. Os principais objetivos deste trabalho foram: (i) discutir o uso de análise de incertezas no contexto da estimação do risco de resistência e (ii) avaliar o efeito de diferentes distribuições da frequência inicial do alelo de resistência (*FreqInicial*) sobre as estimativas de risco. Foi desenvolvido um *software* (*RRiskBt*), em linguagem Visual BASIC que permite quantificar o risco de

resistência utilizando análise de incertezas. Os resultados da análise de incertezas indicaram que as estimativas de risco são afetadas pela distribuição de *FreqInicial* de modo diferenciado ao longo das gerações. As estimativas do risco de resistência, considerando a distribuição Normal para *FreqInicial*, são similares àquelas considerando a distribuição Triangular quando as referidas distribuições têm a mesma variância. O uso da distribuição Uniforme, ao invés da Normal ou Triangular em função da falta de informação sobre *FreqInicial*, leva à superestimação das estimativas de risco de resistência nas gerações iniciais e subestimação nas gerações subsequentes à geração na qual a frequência crítica é atingida. A análise de sensibilidade de *FreqR* a variações nos parâmetros *FreqInicial* ou *DFRes* possibilita estimar a geração a partir da qual a estimativa de *FreqR* independe da variação do parâmetro em questão dentro de um intervalo de valores possíveis preestabelecido. A utilização da análise de incertezas possibilita estimar a geração da praga alvo a partir da qual o risco de resistência é superior a 0,99, independentemente da distribuição utilizada para caracterizar a incerteza associada a *FreqInicial*.

**MODELING PEST RESISTANCE EVOLUTION TO Bt TOXINS EXPRESSED
BY TRANSGENIC CROPS : RISK ASSESSMENT USING UNCERTAINTY
ANALISYS**

Author: ALINE DE HOLANDA NUNES MAIA

Adviser: Prof. Dr. DURVAL DOURADO NETO

SUMMARY

One of the main risks associated to transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins is the pest resistance evolution, process driven by genetic and ecological inter related factors. A key parameter that influences the rate of resistance evolution is the initial frequency of the resistance allele in the pest population (*FreqInicial*). Due to complexity of that process, large scale field experiments to investigate resistance evolution are practically impossible. Mathematical simulation models have been utilized to estimate the *R* allele frequency (*FreqR*) along pest generations. The resistance risk was estimated using the deterministic Caprio's model, incorporating uncertainty to *FreqInicial*. That approach, called uncertainty analysis, allows to estimate resistance risk along generations. The risk is quantified by the probability of *FreqR* exceeding a critical value. The main objectives of this work were: (i) to discuss the use of uncertainty analysis in the context of risk resistance estimation and (ii) to evaluate the effect of different *FreqInicial* input probability distributions on the risk estimates. A software (*RRiskBt*) was developed in Visual BASIC language to quantify risk of pest resistance evolution to Bt toxins using uncertainty analysis. The results of uncertainty analysis showed that the influence of *FreqInicial* input

distributions on the risk estimates changes along pest generations. The risk estimates considering input Normal distribution for *FreqInicial* are similar to those ones obtained considering Triangular distribution if their variances are equal. The use of Uniform distribution instead the Normal or Triangular due to lack of information about *FreqInicial*, leads to super estimation of risk estimates for the initial generations and sub estimation for the generations after the generation for which the critical frequency is achieved. The sensitivity analysis of *FreqR* to *FreqInicial* or *DFRes* allows to estimate the generation after which the *FreqR* estimates become independent of changes in the particular parameter. The uncertainty analysis allows to estimate the pest generation after which the resistance risk is higher than 0.99, independently of the *FreqInicial* input distribution.

1 INTRODUÇÃO

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria do solo que produz endotoxinas com ação letal sobre algumas espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Formulações comerciais de Bt são utilizadas para o controle biológico de pragas em muitas culturas, principalmente na agricultura orgânica. Esse agente de controle biológico tem alta especificidade e é relativamente seguro para organismos não alvo, mas apresenta limitações relativas à persistência e eficiência. Essas limitações levaram pesquisadores a investir no desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas para expressar toxinas oriundas da bactéria Bt. Nas últimas décadas, genes oriundos da bactéria Bt responsáveis pela expressão de proteínas inseticidas têm sido incorporados em espécies de plantas cultivadas tais como milho (*Zea mays* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), canola (*Brassica napus* L.) e batata (*Solanum tuberosum* L.) As plantas modificadas com a inserção de tais genes são chamadas plantas transgênicas inseticidas ou plantas Bt.

Um dos principais riscos ambientais associados às culturas inseticidas é o potencial de evolução de resistência em pragas alvo. Insetos evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (Hawthorne, 1998). Mais de 500 espécies de insetos se tornaram resistentes a inseticidas convencionais e existe evidência empírica de que eles também podem adaptar-se à toxina Bt.

A evolução da resistência a toxinas Bt expressas em plantas transgênicas, numa população de insetos, é um processo governado por um grande número de fatores que interagem entre si e são relacionados a características do material genético da planta transgênica, a bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente

da região de cultivo. Esses fatores podem ser classificados como genéticos, bioecológicos e operacionais.

O relatório do *International Life Science Institute – Health and Environmental Science Institute* (1998) aponta várias consequências negativas da evolução de resistência de pragas alvo às culturas Bt, entre elas: (i) perda das culturas Bt como opção de controle de pragas, devido ao aumento da frequência de indivíduos resistentes; (ii) perda das formulações tradicionais de Bt para controle de pragas, importantes para a agricultura orgânica, caso a resistência às plantas Bt implique em resistência a tais formulações; (iii) aumento do uso de inseticidas sintéticos caso as culturas e formulações Bt se tornem ineficientes no controle das pragas alvo; (iv) surgimento de resistência cruzada; (v) impacto sobre o desenvolvimento futuro de culturas resistentes a insetos devido ao descrédito gerado por eventuais falhas; e (vi) impacto negativo sobre a percepção do público sobre os benefícios da biotecnologia num sentido mais amplo.

Para retardar a evolução da resistência nas populações de pragas-alvo, um conjunto de práticas denominado manejo da resistência, deve ser adotado quando se utiliza qualquer método de controle. A principal estratégia de manejo de resistência recomendada nos países que adotam a tecnologia de culturas Bt é a estratégia denominada refúgio/alta dose. Como o próprio nome indica, essa estratégia se refere ao uso de um híbrido ou variedade que expresse a toxina Bt em alta concentração em todos os tecidos da planta combinado com a adoção de refúgios estruturados. Os refúgios são áreas ocupadas por plantas hospedeiras da praga alvo, preferencialmente, do mesmo híbrido ou variedade da cultura transgênica, mas que não expressem a toxina. Espera-se que o refúgio gere um número de insetos suficiente para diluir os alelos de resistência.

A estratégia refúgio/alta dose se baseia em três pressupostos básicos: (i) os tecidos da planta devem ser altamente tóxicos, assim a resistência será funcionalmente recessiva; (ii) os alelos de resistência devem ser suficientemente raros; e (iii) o arranjo do refúgio deve ser tal que os insetos homozigotos resistentes da área da cultura transgênica tenham alta probabilidade de acasalar com os homozigotos susceptíveis do refúgio.

A escolha de cenários mais eficientes para a estratégia refúgio/alta dose é feita utilizando projeções da evolução da resistência obtidas com o uso de modelos de simulação determinísticos ou estocásticos que se baseiam em fundamentos teóricos de ecologia e genética de populações (Andow & Alstad, 1998; Glare & O'Callaghan, 2000; Estados Unidos, 2001a,b). Os diferentes cenários são constituídos por combinações de tamanho, localização e arranjo espacial do refúgio e tipo de manejo de pragas utilizado nessa área.

Nos modelos determinísticos, a informação sobre os parâmetros de entrada é representada por meio de estimativas pontuais tais como média ou mediana, sem considerar a incerteza e/ou variabilidade a elas associadas. Uma alternativa que permite considerar a natureza não determinística dos processos envolvidos é o uso de modelos de simulação estocásticos, onde alguns desses processos são modelados utilizando ferramentas probabilísticas. Modelos estocásticos que simulam a evolução da resistência de pragas a toxinas expressas em culturas Bt foram desenvolvidos por Caprio (1998a) e Peck et al. (1999).

Em situações onde existe pouca informação disponível, principalmente relacionada à caracterização espacial detalhada dos processos de dispersão, o uso de modelos estocásticos complexos com grande número de parâmetros é inviável. Nesses casos, análise de incertezas associada a um modelo determinístico simplificado como por exemplo o '*Non random mating model*' desenvolvido por Caprio (1998b) é uma opção viável.

De um modo geral, a análise de incertezas utiliza um conjunto de parâmetros de entrada estocásticos, um modelo que integra a informação contida nesses parâmetros e suas inter-relações. Permite obter, através de processos iterativos, distribuições de probabilidade da variáveis de saída.

O modelo determinístico de Caprio fornece estimativas pontuais da frequência do alelo de resistência (*FreqR*) ao final de cada geração da praga considerada. Um dos parâmetros chave desse modelo é a frequência inicial do alelo de resistência (*FreqInicial*) na população da praga. Quando *FreqInicial* ou qualquer outro parâmetro do modelo é representado por uma distribuição de probabilidade e são utilizadas as

ferramentas de análise de incertezas, a informação resultante sobre a evolução da resistência passa a ser apresentada em termos de um conjunto de valores possíveis para $FreqR$, ou seja, a distribuição empírica de $FreqR$ ao final de cada geração da praga. Utilizando essa abordagem, diferentes cenários podem ser comparados quanto ao risco de evolução da resistência. Esse tipo de informação é útil para a tomada de decisão sobre o tamanho de refúgio a ser adotado, seu arranjo espacial e a opção de controlar ou não as pragas nessa área.

As estimativas de risco obtidas utilizando análise de incertezas são influenciadas pelo tipo de distribuição escolhido para caracterizar a incerteza associada a parâmetros do modelo. Quando essa caracterização é feita utilizando conhecimento de especialistas, um alto grau de subjetividade é embutido no processo.

Os objetivos deste trabalho foram: (i) discutir o uso de análise de incertezas no contexto da estimação do risco de resistência utilizando modelos determinísticos de simulação e (ii) avaliar a influência de variações nos parâmetros $FreqInicial$ e dominância funcional da resistência ($DFRes$) nas estimativas de $FreqR$ e do número de gerações até $FreqR$ exceder a frequência crítica ($NGer$) e (iii) quantificar a influência da distribuição de probabilidade de $FreqInicial$ (Uniforme, Triangular simétrica e Normal truncada simétrica) sobre as estimativas de risco de resistência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Culturas transgênicas inseticidas

Nas últimas décadas, genes oriundos da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) responsáveis pela produção de proteínas inseticidas têm sido incorporados em espécies de plantas cultivadas tais como milho, algodão, canola e batata, através de engenharia genética (Andow & Hutchison, 1998).

As plantas modificados com a inserção de tais genes são chamadas plantas transgênicas inseticidas. As primeiras plantas transgênicas a expressar toxinas Bt foram o fumo e o tomate. A primeira cultura Bt registrada na *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) foi milho, em 1995. Nesse mesmo ano, foram aprovados algodão e batata Bt; em 1996, iniciou-se a comercialização de culturas transgênicas (Neppl, 2000).

2.1.1 Uso do Bt como inseticida

O Bt é uma bactéria que ocorre naturalmente no solo. Foi identificado pela primeira vez em 1911, quando se descobriu sua ação letal sobre larvas de dípteras. A primeira formulação comercial foi disponibilizada na França em 1938. Em 1950, iniciou-se seu uso comercial nos EUA. Hoje, formulações inseticidas contendo Bt são utilizadas para o controle biológico de pragas em muitas culturas. No entanto, uma fração mínima dos pesticidas utilizados no mundo têm o Bt como ingrediente ativo. As formulações comerciais contendo Bt são relativamente caras e têm limitações de eficiência e persistência (Neppl, 2000).

Hoje, o modo de ação do Bt é bem conhecido: após a ingestão dos cristais que contêm delta endotoxinas, esses são dissolvidos no trato digestivo do inseto, liberando as protoxinas de que são constituídos. Por meio de um processo de proteólise, as protoxinas são quebradas em fragmentos, que se ligam a células do epitélio do trato digestivo. As proteínas ativadas induzem a formação de poros na membrana celular que causam alteração no balanço osmótico dessas células e levam à sua ruptura (Denolf, 1993). Em consequência, o trato digestivo é paralisado e os insetos param de se alimentar. A maioria morre poucas horas após a ingestão. A afinidade entre os fragmentos dessas toxinas e os sítios de ligação no epitélio do trato digestivo é diretamente relacionada com a toxicidade (Van Rie, 1990; Gould, 1998).

O Bt é um agente muito seletivo: a atividade inseticida das toxinas difere entre subespécies da bactéria. Algumas subespécies do Bt são efetivas contra alguns insetos das ordens dos lepidópteros, coleópteros e algumas moscas e mosquitos (dípteros). A toxicidade de algumas endotoxinas Bt é similar a de pesticidas organofosforados, mas devido à sua especificidade, essas toxinas são relativamente seguras para insetos benéficos e outros animais (ILSI - HESI, 1998).

2.1.2 Genes Bt inseticidas e culturas transgênicas Bt

Existem 34 subespécies reconhecidas de Bt. As mais utilizadas como inseticidas são as subespécies *kurstaki*, *israelensis* e *tenebrionis*, eficientes no controle de espécies de lepidópteros, dípteros e coleópteros, respectivamente. Os genes que codificam a produção dessas proteínas inseticidas são classificados em dois grandes grupos: genes *cyt*, que codificam a produção de citolisinas e genes *cry*, a produção de delta endotoxinas cristalinas (Whalon & McGaughey, 1998).

Genes do grupo *cry* são os mais utilizados para obtenção de culturas inseticidas. Em 1995, após anos de intenso esforço de pesquisa, 60 diferentes tipos de genes Bt foram identificados e um novo sistema de classificação foi adotado com base na homologia de suas seqüências e no seu espectro inseticida. Höfte & Whitley (1989) definem quatro classes de *cry* genes: *cry1*, *cry2*, *cry3* e *cry4*. De um modo geral, essas classes diferem quanto à expressão de sua toxicidade: proteínas codificadas pelo gene

cry1 são tóxicas para lepidópteros, pelo *cry2*, para lepidópteros e dípteros; pelo *cry3*, para coleópteros e pelo *cry4* para dípteros (Gill et al., 1992). Enquanto as toxinas *cry3* são produzidas pelas subespécies *tenebrionis* e *tolwhorthi* e *cry4* pela subespécie *israelensis*, de um modo geral, existe pouca correlação entre o tipo de toxina e a subespécie de Bt (Frutos & Royer, 1999).

As proteínas codificadas pelo gene *cry1*, são as mais comumente encontradas em subespécies de Bt, com 12 diferentes tipos identificados, que diferem em sua estrutura primária e potência de ação contra lepidópteros. Proteínas codificadas pelos genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, por exemplo, são efetivas contra lepidópteros pragas do milho. Proteínas codificadas pelo gene *cry3*, expresso em híbridos transgênicos de batata têm sido efetivas no controle de *Lepinotarsa decemlineata* (Say), besouro da batata do Colorado (ILSI-HESI, 1998).

A magnitude de expressão da toxicidade da proteína Bt produzida nos tecidos da planta, para uma determinada praga alvo, pode variar entre diferentes materiais genéticos de culturas Bt. O Painel SAP-1998 definiu alta dose como a concentração da toxina vinte e cinco vezes maior que a concentração necessária para matar as larvas susceptíveis homozigotas da praga em questão (FIFRA, 2001). Esta é a definição adotada pela USEPA (Estados Unidos, 2001a,b). Caprio et al. (1999) sugerem usar como referência para alta dose o dobro dessa concentração pelo fato de dados empíricos sugerirem que aquela concentração (25X) não era suficientemente alta para causar considerável mortalidade entre os indivíduos heterozigotos (FIFRA, 2001).

Num mesmo material genético, a concentração da toxina Bt varia entre plantas e entre órgãos na mesma planta. Pode ainda ser influenciada por fatores nutricionais e concentração de aleloquímicos nos diferentes órgãos. Gore et al. (2001) observaram alta sobrevivência de larvas da lagarta do capulho (*Helicoverpa zea*) em flores de algodão Bollgard II.

O fato de a expressão de a toxina Bt ser influenciada por múltiplos fatores implica em considerável incerteza sobre a eficiência de algumas culturas Bt no controle de pragas em diferentes ambientes, principalmente aquelas que não expressam toxinas

em alta dose. Outro fator que contribui para essa incerteza é a variabilidade genética das populações de pragas alvo no que concerne à susceptibilidade à toxina.

2.1.3 Área cultivada e níveis de adoção no mundo

A área total plantada com culturas transgênicas no mundo passou de 1,7 milhões de hectares, em 1996 para 58,7 milhões de hectares em 2001. Cerca de 75% dessa área está em países industrializados. Desses 58,7 milhões, 98% são ocupados com apenas quatro culturas: soja, milho, algodão e canola. Da área total cultivada com essas culturas, a porcentagem ocupada por variedades transgênicas é 62, 21, 12 e 7%, respectivamente (Tabela1). Duas características – resistência a insetos e tolerância a herbicidas dominam o cenário (Fresco, 2001; James, 2002).

Culturas transgênicas são cultivadas para fins comerciais em treze países. As maiores áreas estão nos EUA, Argentina, Canadá, China, África do Sul e Austrália (Tabela 2). Apenas 27% da área total está em países em desenvolvimento (James, 2000). Nesses países, as culturas dominantes são soja e algodão, modificadas para tolerância a insetos e/ou resistência a herbicidas. Apenas na China, o algodão transgênico foi desenvolvido e comercializado localmente; nos demais países, os construtos genéticos ou variedades foram obtidos de países industrializados (Fresco, 2001; James, 2002).

As culturas transgênicas inseticidas atualmente comercializadas são milho, algodão e batata. As taxas de adoção da tecnologia transgênica para expressão de toxinas Bt em milho e algodão são 16,86% e 7,84%, respectivamente (James, 2002). O cultivo de batata transgênica representa ainda uma fração inferior a 1% da área cultivada com essa cultura no mundo.

Tabela 1. Área ocupada pelas principais culturas transgênicas no mundo em 2002 (James, 2002)

Cultura	Área (milhões de ha)	Área relativa (%)
Soja tolerante a herbicida	36,5	62
Milho Bt	7,7	13
Canola tolerante a herbicida	3,0	5
Milho tolerante a herbicida	2,5	4
Algodão Bt	2,4	4
Algodão tolerante a herbicida	2,2	4
Algodão Bt tolerante a herbicida	2,2	4
Milho Bt tolerante a herbicida	2,2	4
Total	58,7	100

Tabela 2. Área ocupada por culturas transgênicas nos principais países produtores e variação relativa entre 2000 e 2001 (James, 2002)

País	Área (milhões de ha)	Área relativa (%)	Varição relativa
EUA	39,0	66	+9
Argentina	13,5	23	+14
Canadá	3,5	6	+9
China	2,1	4	+40
África do Sul	0,3	1	+50
Austrália	0,1	<1	-50

2.1.4 Principais culturas transgênicas Bt

Atualmente, as culturas inseticidas Bt com maior área plantada no mundo são milho e algodão, com 9,9 e 4,6 milhões de hectares, respectivamente, correspondentes a 17 e 8 % da área total ocupada pelas principais culturas transgênicas (Tabela1). Alguns desses materiais genéticos, além de expressar a toxina Bt, são também resistentes a herbicidas.

As principais pragas alvo da toxina Bt expressa em materiais genéticos de milho e algodão transgênicos são apresentados na Tabela 3. Características detalhadas dos

materiais genéticos de milho e algodão Bt são apresentadas nas seções 2.1.4.1 e 2.1.4.2, respectivamente.

2.1.4.1 Milho Bt

Um grande número de genes responsáveis pela expressão de toxinas *Bt Cry* em milho têm sido patenteados, mas o número de genes ativos contra pragas de interesse econômico é muito pequeno (Andow & Hutchison, 1998). Os híbridos de milho Bt atualmente comercializados expressam toxinas codificadas pelos genes *cryIAb* (Bt-11 e MON-810), *cryIF* (Herculex I) e *cry3Bb* (MON-863). Os híbridos resultantes dos eventos E-176, DBT-418 e CBH-351 e MON-801, cujas proteínas inseticidas eram codificadas pelos genes *cryIAb*, *cryIAc*, *cry9c* e *cryIAb*, respectivamente, tiveram seus registros cancelados ou expirados.

O milho Bt Herculex I, obteve registro em 2001. Além de controlar o broca européia do colmo (*Ostrinia nubilalis*), também controla a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e a lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) (Estados Unidos, 2001a). O mais recente evento Bt em milho é o MON 863, com a inserção do gene *cry3B1b*, que codifica a produção de uma proteína tóxica a várias espécies de *Diabrotica*, praga conhecida no Brasil como larva-alfinete, vaquinha ou patriota. Esse genótipo, registrado em 2003, é o primeiro híbrido de milho Bt geneticamente modificado para o controle de coleópteros (Deegan, 2003).

Todos os demais híbridos de milho Bt existentes destinam-se ao controle de lepidópteros, principalmente a broca européia do colmo. Outras lepidópteros também podem ser controladas, com diferentes níveis de eficiência, tais como a broca do Sudoeste (*Diatraea grandiosella*), a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) (Estados Unidos 2001a,b).

Até hoje, apenas uma cultura Bt foi geneticamente modificada para produção de uma toxina Bt específica para coleópteros, a Batata Bt, para controle do besouro da batata do Colorado (*L. decemlineata*). Características dos híbridos comerciais desenvolvidos a partir de vários eventos Bt e sua situação atual quanto ao registro são apresentados na Tabela 4.

2.1.4.2 Algodão Bt

Plantas de algodão geneticamente modificadas para a produção de delta endotoxinas inseticidas foram obtidas pela primeira vez por Perlack et al. (1990), nos EUA, com a inserção de genes *cryIAb* ou *cryIAc* do *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. As principais pragas alvo dessas toxinas eram *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens*, pragas importantes do algodão e outras culturas na América do Norte. Em 1994, variedades australianas de algodão foram também modificadas para produção de toxinas ativas contra *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa punctigera* (Olsen & Daly, 2000).

Desde 1996, variedades que produzem proteínas Bt têm substituído ou suplementado o componente inseticida no manejo integrado de pragas do algodão em muitos países, especialmente EUA e Austrália (Gould & Tabashnik, 1998). A primeira variedade de algodão Bt aprovado para cultivo comercial nos EUA foi a Bollgard™, da companhia Monsanto, expressando apenas uma toxina Bt, codificada pelo gene *CryIAc* (Hofte & Whitely, 1989; Perlack et al., 1991). Foi registrada em 1995, para controle da lagarta do capulho (*Helicoverpa zea*), lagarta das maçãs (*Heliothis virescens*) e lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*). Seu cultivo teve início em 1996, com algumas restrições para áreas de cultivo onde existem ervas daninhas que são parentes selvagens do algodão.

O algodão Bt está sendo comercializado em nove países: EUA, China, Índia, México, Austrália, Argentina, Colômbia, África do Sul e Indonésia. De acordo com James (2002) a área cultivada com algodão Bt no mundo em 2001 era 5,3 milhões de hectares, aumentando para 6,8 milhões em 2001, correspondente a um incremento de 28%. Em 2002 não houve acréscimo de área.

No final de 2002, outro híbrido, também da Monsanto, o Bollgard II™, expressando duas toxinas (*CryIAc* e *Cry2Ab*), foi liberado para comercialização. A toxina Bt *CryIAc* é expressa em concentrações de 1 a 3 ppm enquanto a *Cry2Ab* em 7 a 19 ppm. Com essa nova tecnologia, aumentou a eficiência de controle das pragas alvo do Bollgard™ com apenas uma toxina (Olsen & Daly, 2000; Gore, 2001).

Tabela 3. Pragas alvo do milho e algodão Bt (Estados Unidos, 2001a,b)

Nome científico	Nome comum	Cultura	Sigla	Ordem	Família
<i>Papaipema nebris</i> (Guennee)	Broca comum do colmo	Milho	CSB	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Diatraea grandiosella</i> (Dyar)	Broca do colmo do Sudoeste	Milho	SWCB	Lepidoptera	Pyralidae
<i>Diatraea crambidoides</i> (Grote)	Broca do colmo do Sul	Milho	SCSB	Lepidoptera	Pyralidae
<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner)	Broca européia do colmo	Milho	ECB	Lepidoptera	Crambidae
<i>Alabama argillacea</i> (Hübner)	Curuquerê do algodoeiro	Algodão	CLF	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Helicoverpa punctigera</i> (Wallengren)	Lagarta australiana dos botões	Algodão	NBW	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	Lagarta da espiga	Milho	CEW	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Heliothis virescens</i> (Fabricius)	Lagarta das maçãs	Algodão	TBW	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	Lagarta do capulho	Algodão	CBW	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner)	Lagarta do capulho	Algodão	ACBW	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders)	Lagarta rosada	Algodão	PBW	Lepidoptera	Gelechiidae
<i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith)	Lagarta do cartucho	Milho	FAW	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Agrotis ipsilon</i> (Hufnagel)	Lagarta rosca	Milho	BCW	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Diabrotica speciosa</i> (Guermar)	Larva-alfinete e vaquinha	Milho	CRW	Coleoptera	Chrysomelidae

Tabela 4. Características de produtos comerciais desenvolvidos a partir de vários eventos Bt (Estados Unidos 2001a,b; Deegan 2003)

Evento	Marca Registrada	Companhia	Proteína	Eficácia
E-176 ¹	KnockOut™	Syngenta	Cry1Ab	Alto grau de controle da 1ª geração de ECB, controle da 2ª geração de ECB decresce quando a planta senesce; alguma supressão de CEW, SCB e SWCB.
	NaturGard™	Mycogen Seeds/ DowAgroSciences LLC		
Bt-11	YieldGard™	Syngenta	Cry1Ab	Alto grau de controle da 1ª e 2ª gerações de ECB, alguma supressão de CEW, FAW e SCB.
Mon 810	YieldGard™	Monsanto	Cry1Ab	Alto grau de controle da 1ª e 2ª gerações de ECB, alguma supressão de CEW, FAW, SWCB e SCB.
DBT-418 ²	Bt-Xtra™	DeKalb/Monsanto	Cry1Ac	Alto grau de controle da 1ª geração de ECB, alguma supressão de SWCB e SCB.
CBH-351 ³	StarLink™	Aventis CropScience USA LP	Cry9c	Alto grau de controle da 1ª e 2ª gerações de ECB, alguma supressão de BCW, SWCB e SCB.
TC-1507	Herculex™ I	Mycogen Seeds/ DowAgroSciences LLC	Cry1F	Controle de ECB, SCB, FAW e BCW; supressão de CEW.
TC-1507	Herculex™ I	Pionner Hi-bred International Inc./DuPont	Cry1F	Controle de ECB, SCB, FAW e BCW; supressão de CEW.
Mon 863	YieldGard™ rootworm	Monsanto	Cry3Bb1	Controle de CRW

¹ Registro expirado em 2001; ² Registro voluntariamente cancelado em 1998; ³ Registro voluntariamente cancelado em 2000

O algodão Bollgard™ com apenas um gene (*cryIAc*) controla satisfatoriamente a lagarta das maçãs (*H. virescens*), mas não a lagarta do capulho (*H. zea*) (Luttrell et al., 1999). Inseticidas são freqüentemente aplicados ao algodão Bollgard™ para controlar populações de *H. zea*, principalmente durante os picos de oviposição. Estudos indicaram que a produtividade de várias cultivares comerciais de Bollgard™ aumentou quando piretróides foram aplicados, indicando falhas do controle da lagarta do capulho pela toxina Bt. Os níveis insatisfatórios de controle de algumas espécies de lepidópteros levaram os pesquisadores da Monsanto a desenvolver o algodão Bollgard II, incluindo duas toxinas (Gore et al., 2001).

2.2 Resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas

Resistência é definida como a capacidade, adquirida por meio de um processo evolutivo, de um organismo sobreviver em resposta à pressão de seleção imposta pela exposição a algum agente tóxico (ILSI/HESI, 1998). Pragas alvo evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (Hawthorne, 1998). Os casos de resistência não se limitam a inseticidas sintéticos mas incluem uma ampla gama de produtos naturais incluindo reguladores de crescimento e agentes de controle biológico, entre eles a toxina produzida pelo Bt. É um fenômeno que ocorre em todo o mundo. Estimativas atuais indicam que cerca de 500 espécies de insetos desenvolveram raças resistentes a um ou mais pesticidas (Roush, 2000).

Formulações contendo a toxina Bt tinham sido usados por mais de quarenta anos como inseticidas sem nenhuma evidência de resistência em situações de campo; o primeiro relato de falhas de formulações Bt no controle de pragas ocorreu nas Filipinas com a traça das crucíferas (*Plutella xylostella* L.). Outros relatos apontaram falhas de controle da traça das crucíferas em áreas dos EUA, Japão, América Central e China. Populações de várias espécies de lepidópteros, coleópteros e dípteros, têm desenvolvido resistência à toxina Bt em condições de laboratório (Neppel, 2000; Roush, 2000). Liang et al. (1998) detectaram resistência à toxina Bt em algumas populações de *H. armigera* na China. Esses resultados alertam para a possibilidade de insetos desenvolverem

resistência a culturas transgênicas inseticidas contendo toxinas. Shelton et al. (2000) observaram em experimentos de campo populações da traça das crucíferas sobrevivendo em crucíferas transgênicas expressando altos níveis de *CryIAc*.

O desenvolvimento de resistência a plantas transgênicas Bt anularia os benefícios dessa nova tecnologia cultivada milhões de hectares em todo o mundo. Entre os benefícios do cultivo de plantas Bt está a redução no uso de inseticidas de alta toxicidade para o homem como os organofosforados e piretróides, como é caso do algodão Bt nos EUA. Desde o início da comercialização do algodão Bt em 1996, o uso de inseticidas químicos em algodão nos EUA foi reduzido em aproximadamente 3,8 milhões de litros de produto formulado por ano.

2.2.1 Fatores que influenciam a evolução da resistência

A evolução da resistência a toxinas Bt expressas em plantas transgênicas, numa população de insetos, é afetada por um grande número de fatores que interagem entre si e são relacionados a características do material genético da planta transgênica, à bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo. No relatório do ILSI/HESI (1998) tais fatores foram classificados em três grupos: (i) fatores genéticos: associados à genética da praga alvo, (ii) fatores bioecológicos: associados à biologia e ecologia das pragas alvo e (iii) fatores operacionais: todos os fatores manipulados pelo homem.

A interação entre fatores genéticos, bioecológicos e operacionais definirá a adaptabilidade dos genótipos susceptíveis e resistentes. A adaptabilidade é o resultado do somatório de vários componentes: a dominância funcional da resistência, a proporção da população exposta e o custo adaptativo dos indivíduos resistentes na ausência de exposição à toxina (Roush, 2000).

A seguir, serão descritos de modo mais detalhado os principais fatores considerados no modelo determinístico de Caprio (Caprio, 1998b).

2.2.1.1 Fatores genéticos

Os principais fatores genéticos da população da praga alvo que governam a evolução da resistência são a frequência inicial do alelo de resistência (*FreqInicial*) e dominância funcional da resistência (*DFRes*). A frequência inicial depende do equilíbrio entre as taxas de mutação e seleção anteriores à exposição à toxina. A dominância funcional é expressa pela relação entre a sobrevivência dos heterozigotos e homozigotos e implicitamente incorpora a influência da dose (Bourguet et al., 2000; Roush, 2000). Outros fatores genéticos importantes são o modo de herança (monogênica ou poligênica) e o grau de endogamia.

2.2.1.1.1 Frequência inicial do alelo de resistência

É a frequência do alelo responsável pela expressão da resistência à toxina Bt numa população não exposta anteriormente à toxina. Genes que permitem a sobrevivência de insetos quando expostos a certas toxinas existem normalmente em populações de pragas, mesmo antes da ocorrência de qualquer seleção (Georghiou & Taylor, 1977). A frequência inicial de genes de resistência à toxina Bt têm sido considerada como variando entre 10^{-13} a 10^{-2} com base em pressupostos teóricos sobre equilíbrio entre mutação e seleção (Roush & Daly, 1990). Com base nesses pressupostos, Bourguet et al. (2003) estimaram a probabilidade de *FreqInicial* exceder 10^{-3} como variando entre 40 e 70%. Esses pressupostos estão relacionados com o balanço entre a geração de novos alelos (taxa de mutação), a desvantagem seletiva de genótipos heterozigotos.

Apesar de existirem alguns dados sobre o custo de adaptação de indivíduos resistentes heterozigotos na ausência de pesticidas, não existem dados sobre taxa de mutação. Acredita-se, no entanto, que a mutação do alelo susceptível (*S*) para o alelo de resistência (*R*) ocorra em baixas frequências e que nos estágios iniciais do desenvolvimento da resistência, a maioria dos alelos *R* esteja presente nos heterozigotos (McKenzie, 1996).

Considerando que a resistência de insetos a toxina Bt é governada por herança monogênica, as populações das pragas alvo serão constituídas por indivíduos com os

genótipos *SS*, *SR* ou *RR*. Sob o pressuposto de alta dose, toxina Bt é expressa nos tecidos da planta em dose suficiente para matar todos os heterozigotos. Assim, os indivíduos *RR* e *SR* serão susceptíveis à toxina e os indivíduos *RR*, resistentes.

A resistência evoluirá mais rapidamente, quando *FreqInicial* for alta, mas essa relação não é linear. O valor de *FreqInicial* antes da aplicação do pesticida é raramente conhecida, mas trabalhos recentes sugerem que, pelo menos em algumas espécies de lepidópteros deve ser da ordem de 10^{-4} a 10^{-3} . Gould et. al. (1997) obtiveram uma estimativa de $1,5 \times 10^3$ para a frequência inicial do alelo *R* em populações de *H. virescens* coletadas em quatro estados dos EUA em 1993, antes da liberação do plantio de culturas transgênicas naquele país. Huang et al. (1999) detectaram genes de resistência em laboratório numa colônia de *O. nubilalis* recentemente coletada do campo, com apenas algumas centenas de indivíduos. Esses resultados indicam que nessa particular população tais alelos não eram raros.

A frequência inicial é um parâmetro sobre o qual as práticas de manejo da resistência não interferem, exceto em casos de liberação de insetos com genótipos conhecidos. Por ser a resistência uma característica rara, é difícil estimar *FreqInicial* com um nível de precisão satisfatório utilizando amostragem aleatória simples. Isso requereria tamanhos de amostra extremamente altos.

Para o planejamento e implementação do manejo da resistência com base científica consistente é essencial a informação precisa sobre *FreqInicial*. Andow & Alstad (1998) desenvolveram o método *F₂ screen* com maior eficiência para estimar frequências de alelos raros em populações naturais. Um método para construir intervalos de confiança para *FreqInicial* foi desenvolvido por Schneider, 1999. Utilizando o método *F₂ screen*, Bourguet et al. (2003) estimaram *FreqInicial* em populações da broca europeia do colmo (*O. nubilalis*) na França e nos EUA como sendo inferiores a $9,2 \cdot 10^{-4}$ e $4,23 \cdot 10^{-4}$, respectivamente, com probabilidade de 95%.

2.2.1.1.2 Dominância da resistência

Grau de dominância é uma medida da posição do fenótipo do heterozigoto relativa aos dois correspondentes homozigotos. Bourguet et al. (2000) ressalta que a

dominância da resistência à toxina Bt não é propriedade intrínseca do um alelo *R*, pois a manifestação do fenótipo depende de parâmetros ambientais. Um alelo que confere resistência a uma determinada toxina Bt, pode ser recessivo para alta dose e dominante para uma dose moderada ou baixa. É portanto inapropriado falar de dominância de um alelo de resistência sem especificar parâmetros ambientais, pois a dominância descreve a relação entre fenótipos, que variam de acordo com a medida de resistência utilizada e com o ambiente de cultivo da planta transgênica (Bourguet & Raymond, 1998).

As distâncias entre os fenótipos dos homozigotos e heterozigotos pode ser mensurada utilizando diferentes critérios, tais como concentração correspondente à mortalidade de 50% da população (concentração letal 50 - CL_{50}), mortalidade para uma dose preestabelecida ou ainda adaptação da praga alvo em área transgênica comparada com área não transgênica, denominada adaptação relativa (Bourguet et al., 2000).

Bourguet & Raymond (1998) propuseram uma modificação da fórmula de Falconer & Mackay (1996) para quantificação do grau de dominância da resistência em casos de herança monogênica. A medida proposta por esses autores varia entre 0 e 1, e é dada por:

$$D_Y = \frac{Y(RS) - Y(SS)}{Y(RR) - Y(SS)} \quad (1)$$

em que *Y* pode ser o logaritmo da CL_{50} , a mortalidade correspondente a uma dose pré-especificada ou ainda a adaptabilidade relativa. Um nível de dominância $D=0$ indica completa recessividade e $D=1$, completa dominância.

A resistência à toxina Bt tem sido definida têm sido definida como recessiva, com base em curvas dose-resposta (Bourguet & Raymond, 1998; Frutos et al.,1999); no entanto, como a dominância depende da dose, é inapropriado se referir a dominância ou recessividade do alelo *R* sem estabelecer a dose da toxina Bt expressa nos tecidos da planta. Para que o pressuposto de recessividade seja satisfeito, estabeleceu-se a estratégia de alta dose, isto é, a concentração da toxina deve ser alta o suficiente para matar todos os heterozigotos, assim, teoricamente, a mortalidade dos indivíduos *SS* seria igual à dos *RS* e a resistência será necessariamente recessiva. Estimativas de dominância funcional da resistência à toxina Bt, relativos à CL_{50} , para várias espécies de pragas são apresentados em Bourguet et al. (2000). As estimativas obtidas variaram entre 0 e 0,88.

Bourguet et al.(2000) justificam a variabilidade dos níveis de resistência à toxina Bt pelos diferentes mecanismos geradores de resistência. Os principais mecanismos relatados são a modificação dos sítios receptores da toxina Bt e alteração da atividade proteolítica no trato digestivo médio da praga alvo. A maioria dos casos de resistência ao Bt deve-se à modificação dos sítios receptores da toxina; a resistência gerada pela perda de afinidade da toxina com seus receptores é de natureza recessiva, pois a formação de apenas alguns poros na membrana celular é suficiente para causar a ruptura celular e morte dos heterozigotos, onde houve perda de afinidade em apenas 50% dos receptores. Assim, o mortalidade dos heterozigotos é semelhante à mortalidade dos homozigotos susceptíveis, o que caracteriza o nível de dominância recessiva.

Roush (2000) ressalta que a o grau de dominância da resistência às toxinas Bt expressas em plantas transgênicas depende de características intrínsecas do mecanismo de resistência e da dose da toxina expressa na planta. Na estratégia refúgio/alta dose, a dose da toxina deve ser alta o suficiente para que a resistência seja recessiva, isto é, os indivíduos heterozigotos (*RS*) tenham fenótipo semelhante aos homozigotos susceptíveis (*RR*) não sobrevivendo àquela dose.

Um estudo publicado na revista Science (Huang et al., 1999) alerta para a ameaça ao manejo da resistência em insetos representada pelas culturas Bt que expressem a toxina em dose baixa ou moderada. Os autores observaram que resistência a doses moderadas de Bt não é uma característica recessiva, mas parcialmente dominante, em populações da broca européia do colmo criadas em laboratório. Esse fato aumenta a probabilidade de a frequência de indivíduos resistentes aumentar rapidamente na população, devido à sobrevivência de heterozigotos que apresentam alta frequência na população quando comparados aos homozigotos recessivos.

2.2.1.1.3 Custo adaptativo

Em alguns casos, os insetos resistentes (*RR*) não tem a mesma adaptabilidade dos susceptíveis (*SS*) quando alimentados com dieta sem a toxina Bt. Essa menor adaptabilidade pode se traduzir em maior mortalidade, crescimento mais lento, menor número de descendentes, menor mobilidade, entre outros. Isso pode reduzir a

probabilidade de os indivíduos *RR* transmitirem seus genes para as gerações seguintes, o que seria vantajoso para o manejo da resistência. No entanto, o custo adaptativo também pode ser considerado uma desvantagem: se a duração da fase imatura dos indivíduos *RR* for menor que a dos *SS*, não haverá sincronia para acasalamento entre os indivíduos *RR* da área da cultura Bt com os indivíduos *SS* do refúgio, o que inviabilizaria a estratégia de refúgio (ILSI - HESI, 1998). Os resultados de ensaios sobre custo adaptativo relativo à resistência à toxina Bt são controversos (Tabashnik et al., 1994; Tang et al., 1997).

2.2.1.1.4 Número de genes envolvidos

Groeters & Tabashnik (2000) com base em simulações utilizando modelos de genética populacional, sugerem que a resistência é afetada por vários genes, mas a distribuição dos efeitos entre os *loci* não é uniforme. Na maioria dos casos, um ou poucos *loci* são responsáveis pela resistência. No entanto, os mesmos autores sugerem que a distribuição dos efeitos entre alelos principais e secundários têm impacto relativamente pequeno na taxa de evolução da resistência. Assim, na maioria dos modelos que simulam a evolução da resistência considera-se que a herança é monogênica.

2.2.1.2 Fatores associados à bioecologia da população da praga alvo

Os fatores relacionados à bioecologia da população da praga alvo incluem sobrevivência e capacidade reprodutiva de cada um dos genótipos em plantas tóxicas e não tóxicas, intervalo entre gerações, habilidade de dispersão dos insetos nas fases de larva e de pré e pós-acasalamento e capacidade migratória.

2.2.1.2.1 Mortalidade biótica e abiótica

Todos os fatores causadores de mortalidade que afetam o crescimento populacional dos diferentes genótipos da praga de modo não equitativo são importantes no manejo da resistência. Em algumas pragas alvo, o desenvolvimento das larvas é mais lento em plantas expressando a toxina Bt tornando-as alvo mais fácil de predadores e parasitóides o que leva a taxas de sobrevivência diferenciadas (ILSI – HESI, 1998).

2.2.1.2.2 Dispersão da praga alvo

Para definir o arranjo espacial apropriado do refúgio para uma praga alvo é necessário ter informação sobre o movimento de larvas e adultos nas fases de pré e pós-acasalamento. Segundo Mallet & Porter (1992), o movimento de larvas entre plantas transgênicas e não transgênicas e o conseqüente padrão temporal de exposição à(s) toxina(s) Bt pode alterar a taxa de evolução da resistência. O movimento das larvas inviabiliza a estratégia de mistura de sementes transgênicas e não transgênicas. A largura mínima das faixas nos refúgios com arranjo em faixas intercaladas na área da cultura transgênica é limitada baseada na capacidade de dispersão das larvas, além de alguns fatores operacionais de manejo da cultura. Os arranjos espacial dos refúgios deve ser estabelecido considerando também o raio de alcance do vôo dos adultos recentemente emergidos para aumentar a probabilidade de acasalamentos aleatórios.

A maior parte dos estudos de dispersão com pragas alvo das toxinas Bt foram realizados para a broca européia do colmo devido à sua importância econômica nos EUA. No entanto, informações sobre os padrões de dispersão para as principais pragas alvo, nos ambientes de cultivo de cada cultura inseticida são imprescindíveis para o estabelecimento de práticas eficientes de manejo da resistência.

Estudos de captura e recaptura desenvolvidos pela Universidade de Nebraska com adultos da dessa espécie, antes do acasalamento, indicaram que a maioria dos adultos não dispersam para muito longe do seu local de emergência (Estados Unidos, 2001b). Num estudo com dispersão pré-acasalamento com esta mesma espécie, conduzido por Hunt et al.¹ citado por Estados Unidos (2001a), a maioria dos insetos (70-98%) foi recapturada num raio de 1500 pés (450 m) do local de liberação. Num estudo similar, Showers et al. (2001) mostraram que os machos podem dispersar distâncias significativas (superiores a 800m) à procura de fêmeas para acasalar; no entanto, grande parte dos machos foi recapturada a apenas 200m do ponto de liberação. Esses resultados

¹ HUNT, T.; WITOWSKI, J.; HIGHLEY, L. Mark-recapture study examining adult European corn borer dispersal to and among attraction sites: addendum to 1997 annual report. Unpublished data submitted to USEPA (Part of Mycogen and Monsanto's 1998 IRM research report) MRID#s 448545-01 & 447753-01. 1998.

levaram à recomendação de que os refúgios devem ser localizados no máximo a ½ (meia) milha (804,5 m) da área da cultura transgênica (Estados Unidos, 2001b).

Outro aspecto importante da ecologia de *O. nubilalis* é o uso de locais de agregação para acasalamento, tais como áreas com agrupamentos plantas daninhas próximas à área da cultura do milho. A maioria das fêmeas acasala na segunda noite após a eclosão da pupa e têm baixo índice de dispersão, principalmente em áreas irrigadas (Estados Unidos, 2001b). Um estudo realizado por Hellmich et al. (1999) mostrou que é possível manipular locais de agregação para aumentar a probabilidade de acasalamento entre ECB susceptíveis e potencialmente resistentes.

A dispersão pós-acasalamento é outro fator a ser considerado no planejamento do refúgio. Influencia diretamente o padrão de oviposição nas duas áreas. Após o acasalamento, as fêmeas dispersam para encontrar plantas de milho adequadas para oviposição.

A maioria das fêmeas vai ovipositar nas áreas da cultura próximas ao local de acasalamento se nessas áreas houver hospedeiros adequados. A oviposição inicia-se logo após o acasalamento e ocorre principalmente à noite. Os ovos são postos de forma agregada com no mínimo seis unidades; mais de um agregado é depositado por noite (Mason, 1996).

Segundo Beck (1987) as fêmeas da broca européia do colmo geralmente preferem áreas de milho com plantas altas e vigorosas para oviposição. Esse fato tem uma importante implicação no manejo do refúgio: para evitar possível discriminação de hospedeiro, o híbrido utilizado no refúgio deve ser similar ao híbrido Bt em termos de crescimento, maturidade, produtividade e práticas de manejo (data de semeadura, manejo de plantas daninhas, adubação e irrigação). Diferenças significativas de oviposição não tem sido observadas entre áreas de milho Bt e não Bt quando características fenológicas e de manejo são similares (Orr & Landis, 1997; Hellmich et al., 1999). Dentro de um campo de milho adequado para oviposição, acredita-se que esta ocorre de forma aleatória e não restrita às linhas vizinhas aos locais de agregação de plantas daninhas utilizados para oviposição (Shelton et al., 1986).

2.2.1.2.3 Sincronia de acasalamentos

Para que o refúgio seja efetivo no sentido de retardar a evolução da resistência é necessário que os insetos no refúgio e na área da cultura Bt atinjam a fase adulta ao mesmo tempo de modo que os indivíduos homozigotos susceptíveis do refúgio tenham alta probabilidade de acasalar com os homozigotos recessivos e com os heterozigotos da área da cultura Bt (Gould, 1998). Isto é particularmente crítico em regiões onde não há sobreposição de gerações. Nesses casos, recomenda-se que o refúgio deve ser plantado com variedade similar à transgênica diferindo apenas pela expressão da toxina e esta variedade deve receber todos os tratos culturais idênticos aos utilizados na área da cultura transgênica (Estados Unidos, 2001a,b). A sincronia de acasalamentos é um aspecto importante a ser investigado na avaliação da adequabilidade do uso de outras plantas hospedeiras da praga alvo como refúgio. Além de possíveis barreiras genéticas entre raças da mesma espécie de uma praga que se desenvolvem em diferentes hospedeiros, diferentes tempos de duração da fase imatura podem inviabilizar os acasalamentos entre indivíduos provenientes de *habitats* diferentes. Em regiões onde há sobreposição de gerações da praga, este aspecto é potencialmente menos importante, mas precisa ser investigado.

Outro fator que pode contribuir para a assincronia de acasalamentos é a exposição da praga a doses subletais. Mascarenhas & Luttrell (1997) observaram que nessa situação os algumas espécies podem apresentar desenvolvimento retardado e conseqüentemente maior duração da fase imatura. Essa potencial falta de sincronia para acasalamento terá conseqüências significativas na evolução da resistência. Por outro lado, o desenvolvimento retardado da praga na área da cultura Bt pode ter efeitos positivos como ação mais intensa de fatores de mortalidade e redução da taxa de crescimento populacional (ILSI/HESI, 1998).

2.2.1.2.4 Número de gerações da praga alvo por ano

Quanto maior o número de gerações da praga por ano, maior taxa de evolução da resistência em termos de aumento da frequência do alelo R por ano, mantidos constantes outros fatores que influenciam essa taxa (ILSI/HESI, 1998). Como o intervalo entre

gerações é inversamente proporcional à temperatura ambiente, dentro de certos limites, regiões mais quentes, com cultivos contínuos de culturas Bt durante todo o ano constituem-se em cenários potenciais de alto risco de evolução da resistência.

2.2.1.2.5 Diversidade de hospedeiros da praga alvo

Pragas com grande diversidade de hospedeiros, como *Spodoptera frugiperda* (Cruz, 1995) apresentam aspectos particulares quanto a evolução da resistência. Em áreas cultivadas com milho e algodão Bt, aumenta a exposição a toxina e conseqüentemente o risco de resistência. Nos EUA, o requerimento de refúgio para o milho Bt em tais regiões é de 50%, ao invés de 20% em áreas onde não há cultivo de algodão Bt (Estados Unidos, 2001a). Outro aspecto importante para pragas polífagas é a possibilidade de uso de hospedeiros alternativos como refúgio. Na região cotonicultora brasileira denominada Meio-Oeste, na hipótese de introdução do milho Bt, a possibilidade de uso do algodão convencional como refúgio para *S. frugiperda* deve ser investigada. Plantas daninhas também podem ser uma alternativa, mas muitos aspectos necessitam ser investigados tais como o possível isolamento reprodutivo entre linhagens da praga que se desenvolvem nas diferentes espécies, a preferência das fêmeas por hospedeiros para oviposição e a adaptabilidade da praga nos diferentes hospedeiros. Em estudos desenvolvidos por Losey et al. (2001), o nível de infestação e a sobrevivência de larvas da broca européia do colmo foram significativamente maiores em milho não Bt que em plantas daninhas hospedeiras. Esses autores concluíram que parece ser improvável que refúgios constituídos de outras plantas hospedeiras sejam eficientes na região Nordeste dos EUA. Pragas provavelmente monófagas, como por exemplo o curuquerê do algodoeiro (*A. argilacea*) (Polak et al. 2000), requerem obrigatoriamente refúgios constituídos de algodão que não expresse a toxina Bt.

2.2.1.3 Fatores operacionais

Os fatores operacionais são aqueles manipulados pelo homem como o número de toxinas inseridas, modo de expressão da toxina na planta e praticas utilizadas para manejo da resistência.

2.2.1.3.1 Número de genes Bt inseridos na planta

Estudo de simulação realizado por Caprio (1998a) para avaliar a influência da herança monogênica ou poligênica sobre a taxa da evolução da resistência de *O. nubilalis* à toxina Bt expressa em algodão indicou que quando múltiplos genes são inseridos, e não há resistência cruzada, a taxa de evolução da resistência é reduzida, principalmente devido a baixa frequência da indivíduos resistentes as múltiplas toxinas. Nesse estudo, o tempo até a evolução da resistência foi mais que o dobro no cenário com dois genes inseridos. Os materiais genéticos de milho Bt desenvolvidos até hoje expressam apenas uma toxina em cada material; em algodão a variedade Bollgard II foi modificada com a inserção de genes responsáveis pela expressão de duas toxinas, *CryIAc* e *Cry2Ab*.

2.2.1.3.2 Expressão da toxina Bt na planta transgênica

O modo de expressão da toxina na planta, regulado por características do tipo de gene Bt inserido e por fatores ambientais afeta a evolução da resistência. A expressão pode variar quanto à concentração nos tecidos, órgãos da planta onde a toxina está presente e duração da produção de toxina ao longo do ciclo da cultura (ILSI – HESI, 1998). Os híbrido de milho resultantes do evento 176, nos quais foi inserida a toxina Bt *CryIAb*, conferiam alto grau de controle da primeira geração da broca européia do colmo, mas controle menos eficiente da segunda geração, pois a concentração da toxina decrescia com a senescência da planta (Estados Unidos, 2001b). Devido ao alto risco de desenvolvimento da resistência associado à expressão de doses moderadas e baixas no final do ciclo, o registro desse híbrido foi cancelado (Andow & Hutchinson, 1998). Experimentos conduzidos por Gore et al. (2001) apresentaram altos níveis de sobrevivência de larvas da lagarta do capulho em flores das cultivares Bollgard e Bollgard II a expressão da toxina Bt e conseqüentemente, a sobrevivência das larvas parece ser afetada por fatores bioquímicos e nutricionais da planta.

2.2.1.3.3 Manejo da resistência

Manejo da resistência de insetos é o termo usado para descrever um conjunto de práticas cujo objetivo é reduzir o potencial para o desenvolvimento de resistência das pragas a inseticidas. A principal estratégia adotada para manejo da resistência e uso de refúgios estruturados e materiais genéticos que expressam a(s) toxina(s) em alta dose (FIFRA, 1998; Gould, 1998). O tamanho e arranjo do refúgio são fatores chave no manejo da resistência. Estão intrinsecamente relacionados com a habilidade de dispersão da praga (ILSI – HESI, 1998). O uso de controle químico ou biológico no refúgio influencia sua eficiência pois altera o número de indivíduos susceptíveis disponíveis para acasalamento com os resistentes na área da cultura transgênica. A rotação de culturas também pode ser empregada com o mesmo objetivo. Pode ser feita entre diferentes espécies hospedeiras ou não hospedeiras da praga alvo ou ainda entre materiais genéticos transgênicos e não transgênicos da mesma espécie.

2.2.2 Estratégias de manejo da resistência

Há basicamente dois tipos de estratégias para manejo da resistência de pragas alvo em culturas transgênicas inseticidas: prevenção ou remediação. As estratégias preventivas incluem: (i) expressão de toxinas em alta dose e adoção de refúgios estruturados (ii) expressão de múltiplas toxinas Bt na mesma planta, (iii) expressão de toxinas Bt em baixas doses e controle biológico (iv) toxinas com expressão seletiva e (v) rotação de culturas transgênicas Bt e não transgênicas (Andow & Alstad, 1998; Gould, 1998; Schütte, 2000). Segundo o relatório do *Science Advisory Panel* (FIFRA, 1998), refúgios estruturados para uma determinada praga alvo incluem todas as culturas hospedeiras adequadas para este fim, plantadas e manejadas pelo homem.

Algumas das estratégias descritas acima podem ser combinadas entre si, como por exemplo, a estratégia alta dose/refúgio estruturado com híbridos expressando múltiplas toxinas. Agentes de controle biológico como parasitóides do gênero *Trichogramma*, baculovírus, fungos entomófagos ou ainda a liberação de indivíduos estéreis da pragas alvo podem ser utilizados, apenas na área da cultura transgênica, quando o híbrido expressar baixa dose da toxina (Schütte, 2000). É necessário que não

haja preferência dos agentes por presas ou hospedeiros susceptíveis em relação aos resistentes. Dependendo da mobilidade do agente, isso pode não ser possível. Se os insetos susceptíveis forem atingidos antes do acasalamento, a eficiência do refúgio será comprometida.

O objetivo das ações preventivas é adiar a evolução da resistência e se baseiam em projeções obtidas com o uso de modelos de simulação (Andow & Alstad, 1998). Os modelos se baseiam em fundamentos teóricos de ecologia e genética de populações e requerem informação sobre parâmetros como frequência inicial de alelos de resistência, expressão gênica e adaptabilidade dos diferentes genótipos da praga no ambiente de cultivo da variedade transgênica.

As estratégias de remediação requerem monitoramento, em campo, das frequências dos alelos de resistência e as ações de manejo dependem dos resultados desse monitoramento. Esse tipo de estratégia só é possível de implementar em situações onde os alelos de resistência foram identificados e suas frequências de ocorrência na população da praga podem ser estimadas. Quando métodos eficientes para estimar a frequência dos alelos de resistência na população fundadora (*FreqInicial*) ainda não eram disponíveis, esse tipo de estratégia apresentava sérias limitações, devido à dificuldade em se obter estimativas confiáveis dessas frequências. Pelo fato de esses alelos serem relativamente raros, os tamanhos de amostra exigidos para estimar *FreqInicial* com uma precisão aceitável, utilizando os métodos convencionais, tornavam o monitoramento economicamente inviável. Se o número de insetos coletado para estimar *FreqInicial* fosse menor que o requerido, a resistência só seria detectada quando esta atingisse níveis elevados, o que comprometeria o sucesso das ações de manejo para remediação (Andow & Alstad, 1998).

Com o objetivo de melhorar as estimativas de *FreqInicial*, Andow & Alstad (1998) desenvolveram um método denominado *F2 screen* para estimar a frequência de alelos raros de resistência que se constitui das seguintes etapas: (i) fêmeas acasaladas são amostradas de populações naturais; (ii) a progênie de cada fêmea (F1) é criada em laboratórios e os indivíduos acasalados entre irmãos; (iii) As larvas da geração F2 são submetidas a um procedimento discriminante adequado para detecção de resistência; e

(iv) Utilizando métodos de estatística bayesiana *FreqInicial* é estimada com um intervalo de confiança.

Andow & Hutchinson (1998) apresentam uma revisão sobre as estratégias preventivas, baseada em Gould (1998), descritas a seguir de modo sucinto.

2.2.2.1 Variedades expressando toxinas em altas doses e adoção de refúgio

Essa estratégia, denominada alta dose/refúgio estruturado, como o próprio nome indica, refere-se ao uso de um híbrido ou variedade que expresse a toxina Bt em alta concentração em todos os tecidos da planta combinado com a adoção de refúgios estruturados. Por ser a estratégia mais adotada, será descrita detalhadamente na seção 2.2.3.

2.2.2.2 Materiais genéticos expressando múltiplas toxinas

Quando duas ou mais toxinas são expressas na mesma variedade transgênica e os alelos de resistência são herdados e atuam de modo independente a teoria prevê que a evolução da resistência pode ser significativamente retardada. No algodão Bollgard II™ foi utilizada essa estratégia, com a inserção das toxinas *CryIAc* e *Cry2Ab*. No entanto, quando ocorre resistência cruzada, como tem sido observado em algumas pragas com relação às toxinas *CryIAb* e *CryIAc*, essa estratégia se torna ineficiente.

2.2.2.3 Genótipos expressando toxinas em baixas doses e controle biológico

É uma abordagem similar ao uso de resistência parcial no melhoramento genético clássico. Deve ser combinado com outros métodos de controle, tais como inimigos naturais. Essa estratégia é necessária quando a toxina não é expressa em dose suficientemente alta, como é o caso dos híbridos de milho MON810 e Bt11 para o controle de *S. frugiperda*. Essa estratégia requer refúgios muito maiores que aqueles recomendados para híbridos que expressam a toxina em alta dose para a praga de interesse.

2.2.2.4 Rotação de culturas transgênicas Bt e não transgênicas

O efeito da rotação de culturas sobre a evolução da resistência não é muito claro. A rotação de milho transgênico com outra cultura não hospedeira da praga alvo, assegura que os indivíduos resistentes necessitam migrar para outra área para reproduzir. Se o acasalamento ocorrer na área de origem, antes da dispersão, não haverá efeito na evolução da resistência; se ocorrer após a dispersão, com indivíduos susceptíveis, o efeito será benéfico.

2.2.2.5 Expressão seletiva de toxinas

A produção de toxinas em apenas alguns tecidos da planta e/ou declínio da concentração ao longo do ciclo da cultura pode reduzir a pressão de seleção sobre a praga alvo e retardar o surgimento de resistência. Essa estratégia só funciona quando parte da população da praga não é exposta à toxina, ou seja, os tecidos que não expressam a toxina funcionam como refúgio. Em milho, esse tipo de manejo para *O. nubilalis* não seria efetivo, pois as insetos se alimentam de diferentes tecidos da planta, sequencialmente, durante sua fase imatura. Se a concentração da toxina não for uniformemente alta, haverá intensa seleção para resistência. Em alguns híbridos de milho, como o proveniente do evento 176, onde o declínio da concentração da toxina ocorre após a liberação do pólen, como o a segunda geração de algumas pragas alvo poderá ser exposta a baixas doses, aumentando o risco de resistência.

2.2.3 A estratégia refúgio/alta dose

A estratégia atualmente em uso nos EUA, Canadá e Austrália, recomendada pelas agências governamentais de proteção ao ambiente para manejo da resistência em culturas Bt é a estratégia alta dose/refúgio estruturado (ILSI-HESI, 1998; Andow et al., 1998; Estados Unidos, 2001a,b; FIFRA, 2001). Em 1998, o *Scientific Advisory Panel* da FIFRA (FIFRA, 1998), definiram as estratégias de manejo para mitigar o desenvolvimento de resistência de insetos às toxinas Bt expressas em plantas transgênicas. Durante este evento, foi estabelecido que os programas de manejo integrado da resistência deveriam ter como base a estratégia alta dose/refúgio

estruturado. Os refúgios são áreas ocupadas por plantas hospedeiras da praga alvo, preferencialmente, do mesmo híbrido ou variedade da cultura transgênica, mas que não expressem a toxina (ILSI-HESI, 1998; Andow et al., 1998). Espera-se que o refúgio gere um número de insetos suficiente para diluir os alelos de resistência e mesmo assim mantenha alta produtividade. Modelos bioeconômicos auxiliam na definição de refúgios economicamente eficientes, atendendo a restrições ambientais. Hurley et al. (1997) compararam diferentes arranjos de refúgios e concluíram que o arranjo em faixas é o que implica em menores custos.

2.2.3.1 Pressupostos básicos

Essa estratégia é fundamentada em três pressupostos básicos: (i) os tecidos da planta devem ser altamente tóxicos, assim a resistência será funcionalmente recessiva, isto é, todos os insetos heterozigotos para essa característica serão mortos; (ii) os alelos de resistência devem ser suficientemente raros ($p < 1/1000$), de modo que a fração de alelos nos indivíduos homozigotos resistentes (RR) na população fundadora seja mínima ($p^2 < 10^{-6}$), o que implicará em poucos homozigotos (RR) sobreviventes na área da cultura transgênica (Roush, 1994); e (iii) o arranjo do refúgio deve ser tal que os insetos homozigotos resistentes (RR) da área da cultura transgênica tenham alta probabilidade de acasalar com os homozigotos susceptíveis (SS) do refúgio (ILSI/HESI, 1998; FIFRA, 2001; Estados Unidos, 2001a,b; Tabashnick, 1990; Alstad & Andow, 1995; Gould, 1998).

2.2.3.2 Comparação de cenários

A escolha de cenários mais eficientes para a estratégias alta dose/refúgio é feita utilizando projeções da evolução da resistência obtidas com o uso de modelos de simulação (Andow & Alstad, 1998; Glare & O'Callaghan, 2000; Estados Unidos, 2001a,b). Os diferentes cenários são constituídos por combinações de tamanho (porcentagem da área ocupada pelo refúgio), localização e arranjo espacial do refúgio e tipo de manejo de pragas utilizado nessa área.

Um estudo para avaliar o efeito de tamanho e arranjo do refúgio sobre a evolução da resistência da traça das crucíferas (*Plutella xylostella*) à toxina Bt expressa em brócolis transgênico foi realizado em casa de vegetação. Populações da traça com baixo valor de p foram introduzidas em gaiolas com várias proporções de brócolis transgênicos e não transgênicos. Após várias gerações, as larvas da traça foram testadas para resistência.

Nas gaiolas com 0% de refúgio, ocorreu rápido desenvolvimento da resistência; com o aumento do refúgio, a evolução da resistência foi mais lenta. A localização do refúgio também afetou consideravelmente a evolução da resistência: com plantas misturadas aleatoriamente, a evolução foi muito mais rápida que em refúgios separados. Esses resultados indicam que os refúgios devem ser separados para insetos que podem se movimentar entre plantas no estágio de larva. Foi avaliado também o efeito de tratar ou não o refúgio com inseticidas. Concluiu-se que o prejuízo em curto prazo causado pelo maior número de insetos no refúgio será compensado pela redução da resistência e da densidade de larvas na área total, em longo prazo. Este estudo forneceu a primeira evidência empírica da utilidade do refúgio em culturas Bt.

2.2.3.3 Requerimentos de refúgio para milho e algodão

Neste item serão descritas as estratégias de manejo da resistência utilizando área de refúgio atualmente recomendadas para culturas Bt nos EUA, Canadá e Austrália. Nos EUA são cultivados milho e algodão Bt, no Canadá, apenas milho e na Austrália apenas algodão.

As estratégias de manejo requeridas para as culturas de milho e algodão Bt nos EUA são detalhadamente descritas em Estados Unidos (2001a) e em boletins com orientações sobre manejo da resistência divulgados pelas das companhias que comercializam sementes das culturas Bt². Algumas exigências dependem da cultura e da

² (i) 2003 Yieldgard® corn borer insect resistance management. http://www.monsanto.com/monsanto/us_ag/content/biotech_traits/yieldgard/_MC_291_YieldGard.pdf (19 mar 2003)
(ii) Yieldgard® rootworm insect resistance management. http://www.monsanto.com/monsanto/us_ag/content/biotech_traits/yieldgardRootworm/irm.pdf (19 mar 2003)
(iii) Bt cotton refuge requirements for the 2001 growing season. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_cotton_refuge_2001.htm (19 mar. 2003)
(iv) 2003 IRM guide:us_ag/content/biotech_traits/rr_bollgard_cotton/2003_bollgard.pdf (12 mar 2003)
(v) 2003 Yieldgard® corn borer product use guide: insect resistance management (IRM) requirements. http://www.pioneer.com/usa/agronomy/insects/yg_pug.pdf (19 mar. 2003)

região de cultivo. Outras, são comuns a ambas as culturas, em todas as regiões, tais como: (i) os refúgios podem ser externos, blocos dentro da área da cultura transgênica, ou faixas intercaladas; (ii) os refúgios externos devem estar localizados a uma distância máxima de $\frac{1}{4}$ de milha da área da cultura transgênica; (iii) quando se utiliza o arranjo espacial em faixas, cada faixa deve ser constituída de no mínimo quatro linhas, de preferência seis linhas; (iv) em alguns casos, os refúgios podem ser tratados com inseticidas, exceto com formulações que contenham a toxina Bt; (v) os materiais genéticos cultivados na área de refúgio devem ter características de desenvolvimento e maturação similares aos materiais Bt cultivados na área restante e (vi) todos os tratamentos culturais no refúgio, tais como adubação, irrigação, controle de plantas invasoras e manejo de pragas não alvo da toxina Bt devem ser semelhantes aos adotados na área da cultura transgênica. Quando milho e algodão são cultivados na mesma região, são requeridos refúgios maiores, devido à possibilidade de algumas pragas alvo serem expostas à(s) toxina(s) Bt nas áreas de ambas as culturas, o que aumenta o risco de resistência.

Para o milho Bt expressando as toxinas *Cry1Ab* ou *Cry1F*, devem ser adotados refúgios estruturados correspondentes a 50% da área total, nas regiões cotonicultoras e de 20% nas outras regiões. Esses refúgios podem ser tratados com inseticidas quando a infestação atingir o nível de dano econômico para a praga em questão. Para o MON863 que expressa a toxina *Cry3Bb1* para controle da larva-alfinete o refúgio recomendado é de 20% em qualquer região pois este inseto não é praga do algodão.

Há várias opções de refúgio para o algodão Bt: (i) refúgio externo correspondente a 5% da área total, sem uso de nenhum inseticida para controle da lagarta das maçãs (*H. virescens*), lagarta do capulho (*H. zea*) ou lagarta rosada (*P. gossypiella*); (ii) refúgio externo correspondente a 25% da área total, com possível uso de inseticidas para controle das lagartas citadas no item anterior; (iii) refúgio correspondente a 5% da área total, constituído de blocos contíguos dentro da área do algodão Bt. Para grandes áreas, múltiplos blocos devem ser utilizados, de modo a satisfazer o requerimento de distância mínima de $\frac{1}{4}$ de milha. O refúgio pode ser tratado com inseticidas para o controle das lagartas citadas em (i) sempre que o campo inteiro for tratado. O refúgio não deve ser tratado independentemente da área de algodão Bt; e

(iv) programa de refúgio comunitário, que deve satisfazer aos os mesmos requerimentos das opções (i) ou (ii) ou uma combinação apropriada das duas opções.

No Canadá, o algodão Bt não é cultivado. Para o milho Bt, as recomendações do *Canadian Food Inspection Agency* são semelhantes às adotadas nos EUA para as regiões não cotonicultoras³.

Na Austrália, o plano para manejo da resistência inclui vários elementos: (i) restrições quanto à época de plantio, (ii) restrições quanto à área plantada, (iii) limitações relativas à pulverização de inseticidas, (iv) destruição de pupas e uso de plantas armadilha e (v) controle de plantas voluntárias⁴.

O algodão *Ingard* não deve ser plantado depois de 15 de Novembro para evitar que a maturação tardia e exposição da cultura a alta infestação de *H. armigera* no final do verão. A área cultivada com algodão Bt não pode exceder 400 ha ou 30% da área plantada em cada fazenda. Culturas como milho, sorgo e guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) podem ser utilizadas como refúgio, além do algodão não Bt. Para cada cultura, a porcentagem de refúgio em relação à área de algodão Bt depende da capacidade da cultura refúgio fornecer adultos da praga alvo para acasalamento com os adultos produzidos na área do algodão Bt. As recomendações de refúgio são distintas para algodão irrigado e não irrigado. Para as áreas irrigadas, as opções de refúgio são: (i) para cada 100 ha de algodão Bt, 100 ha de algodão convencional irrigado com manejo de *Helicoverpa spp.* e outras pragas; (ii) 10 ha de algodão convencional irrigado sem nenhum controle de *Helicoverpa spp.*; (iii) 20 ha de milho convencional irrigado, semeado em três diferentes datas, sem controle de *Helicoverpa spp.*; (iv) 15 ha de milho convencional irrigado, semeado em três diferentes datas, sem controle de *Helicoverpa spp.* ou (v) 5 ha de feijão de pombo irrigado sem controle de *Helicoverpa spp.*, semeado até uma semana após a semeadura do algodão para assegurar diversos ciclos de florescimento durante o ciclo do algodão. Para o algodão de sequeiro, apenas as opções (i) e (ii) são recomendadas, pois a sobrevivências das outras culturas em sequeiro é muito incerta. Práticas como destruição das pupas em diapausa no solo durante os meses

³ (i) Insect resistance management for Bt corn <http://www.ontariocorn.org/ocpmag/magh401pg30.htm>

(ii) Insect resistance management of Bt corn in Canada. http://www.agbios.com/docroot/articles/cfia_irm.pdf

⁴ <http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-nz/research-and-development/biotechnology/using-bt-toxins-in-new-zealand/technical-paper-02-20-bt-toxins.pdf>

de inverno em algumas regiões ou uso de armadilhas para capturar insetos que emergem após a colheita em outras também são recomendadas para reduzir a taxa de evolução da resistência.

2.3 Modelos para simular a evolução da resistência à toxina Bt expressa em culturas transgênicas

O uso de modelos de simulação como ferramentas para auxiliar na escolha de estratégias de manejo eficientes para reduzir o risco de resistência à toxina Bt foi amplamente discutido no painel (*Scientific Advisory Panel Meeting*) promovido pela FIFRA (*Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act*) sobre avaliação de riscos e benefícios de culturas Bt inseticidas (FIFRA, 2001). Concluiu-se que a utilização de tais modelos é a única abordagem com rigor científico que permite integrar toda a informação biológica disponível e que sem esses modelos as agências reguladoras teriam pouca base científica para escolher entre diferentes opções de manejo. Devido à complexidade da evolução da resistência, experimentos para estudar a evolução desse processo em condições de campo são praticamente impossíveis do ponto de vista operacional (Peck et al., 1999). Além disso, em muitos países a legislação não permite a realização de experimentos com culturas transgênicas. Em tais situações, a modelagem é a única alternativa possível para fornecer projeções com base científica sobre os riscos associados ao processo.

Modelos matemáticos são simplificações de sistemas reais úteis e constituem-se em ferramentas que auxiliam a tomada de decisão em situações complexas. De uma maneira geral, os modelos matemáticos podem ser empíricos ou mecanísticos. Os modelos empíricos são essencialmente descrições de dados observados, enquanto os modelos mecanísticos são concebidos no intuito de descrever processos com base no conhecimento científico dos seus mecanismos (Thornley & Johnson, 1990).

Uma das vantagens dos modelos em relação a processos subjetivos é que as pressuposições dos modelos são explícitas e portanto sujeitas a questionamentos. Hawthorne (1998) comenta que o uso de modelos preditivos permite que diferentes alternativas de manejo sejam classificadas com relação ao risco de ocorrência de falhas

no controle ou ainda diferentes espécies ou populações sejam comparadas quanto às taxas de evolução da resistência a um determinado pesticida. Como ferramenta heurística, a modelagem desse processo facilita o entendimento do papel de cada um dos fatores envolvidos na evolução da resistência e de como genética e ecologia populacional da praga alvo se interrelacionam.

Os modelos que simulam a evolução da resistência de insetos a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas baseiam-se em fundamentos teóricos de ecologia e genética de populações e requerem informação sobre parâmetros como frequência inicial de alelos de resistência, expressão gênica e adaptabilidade dos diferentes genótipos da praga no ambiente de cultivo da variedade transgênica (Comins, 1997; Gould, 1986; Roush, 1994; Alstad & Andow, 1995; Caprio, 1998ab).

2.3.1 Classificação dos modelos

Os modelos matemáticos de simulação podem ser classificados de acordo com diversos critérios: (i) biológicos versus bioeconômicos – com relação à incorporação de aspectos econômicos; (ii) determinísticos versus estocásticos - tratamento da variabilidade e/ou incerteza associada aos processos modelados; (iii) espaciais versus não espaciais - padrões espaciais; e (iv) estáticos versus dinâmicos – dependendo da possibilidade de alterar variáveis de decisão ao longo do tempo, de acordo com resultados intermediários gerados pelo modelo.

A seguir será feita uma breve caracterização de alguns tipos de modelos baseada em Brown & Rothery (1993), Peck et al. (1999), Livingston (2000) e num glossário de termos do *Defense Modeling and Simulation Office*⁵. Essas classificações são válidas para qualquer área de aplicação de modelos; aqui o enfoque será direcionado ao modelos que simulam evolução da resistência de insetos a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas.

⁵ <https://www.dmsi.mil/public/library/policy/guidance/p500059m.pdf>.

2.3.1.1 Modelos determinísticos versus modelos estocásticos

Nos modelos determinísticos, a informação sobre os parâmetros de entrada é representada por meio de estimativas pontuais tais como média ou mediana, sem considerar a incerteza a elas associadas. Requerem menor esforço computacional e algoritmos mais simples e fornecem estimativas também pontuais para as 'saídas' do modelo. Na maioria das situações, existe alto grau de incerteza sobre os parâmetros de entrada, o que torna esse tipo de modelo pouco útil para previsões e subsídios para tomadas de decisão. No entanto, são importantes ferramentas para entendimento dos processos envolvidos. O efeito de variações nos valores pontuais dos parâmetros de entrada sobre as saídas do modelo indicam que tipo de informação é crucial para a obtenção de estimativas confiáveis. Um modelo de simulação é dito estocástico algum dos processos envolvidos são modelados utilizando ferramentas probabilísticas ou se um ou mais dos seus parâmetros de entrada são tratado como variáveis aleatórias. No primeiro caso os modelos são estritamente estocásticos, isto é, processos estocásticos são utilizados na modelagem; no segundo caso, o caráter estocástico é incorporado através da análise de incertezas: as incertezas associadas a cada um dos parâmetros-chave são representadas por distribuições de probabilidade.

2.3.1.2 Modelos biológicos versus modelos bioeconômicos

Na maioria dos modelos atualmente disponíveis, os cenários são comparados utilizando como critérios o número de anos para atingir uma frequência crítica de indivíduos RR ou alternativamente, a frequência de indivíduos RR na população após um período de tempo estipulado. Alguns modelos, como o desenvolvido por Livingston (2000), que incorporam aspectos que permitem a comparação de cenários com relação a parâmetros econômicos (p.e., receita líquida, margem bruta, valor presente do lucro) considerando uma taxa de evolução da resistência aceitável são classificados como bioeconômicos.

2.3.1.3 Modelos estáticos versus modelos dinâmicos

Modelos dinâmicos são quase sempre utilizados para descrever sistemas ao longo do tempo. Caracterizam-se pela possibilidade de alteração das variáveis de decisão serem alteradas ao longo do tempo. Num modelo dinâmico que simula a evolução da resistência, o tamanho da área de refúgio ou a decisão de aplicar ou não inseticidas no refúgio pode ser alterada a cada estação de semeadura, dependendo da estimativa da frequência inicial do alelo na população da praga no final da estação anterior.

2.3.1.4 Modelos (explicitamente) espaciais versus modelos não espaciais

No contexto de avaliação da eficiência de refúgios, os modelos explicitamente espaciais consideram o arranjo espacial cultura transgênica/não transgênica de forma explícita. A simulação é feita para uma área de dimensões conhecidas, subdividida em quadrículas definidas por uma grade geralmente regular. Os eventos relacionados à bioecologia da praga alvo, tais como oviposição e dispersão são modelados de forma explícita em cada quadrícula da área considerada. Os diferentes arranjos espaciais de refúgios são simulados se definido em cada quadrícula da área hipotética se essa é cultivada com cultura transgênica ou não transgênica. Nos modelos não espaciais como o determinístico de Caprio (1998b) e o de Guse et al. (2002), aspectos relativos ao arranjo espacial do refúgio são incorporados em índices de dispersão. Pode-se considerar, por exemplo que com um refúgio em faixas intercaladas, o índice de dispersão pós-acasalamento é superior à esperada na estratégia refúgio em bloco contínuo.

2.3.2 Principais modelos

Diversos autores desenvolveram modelos matemáticos para simular a evolução da resistência de pragas alvo a culturas Bt (Alstad & Andow, 1995; Peck & Ellner, 1997; Onstad & Gould, 1998; Caprio, 1998ab; Peck et al., 1999; Livingston, 2000; Guse et al., 2002). A seguir serão descritos de modo sucinto, em ordem cronológica, alguns destes modelos. O modelo determinístico de Caprio (Caprio, 1998b) será descrito detalhadamente na seção Material e Métodos.

A maioria dos modelos assume a herança da resistência à toxina Bt na praga alvo é governada por um único *locus* com dois alelos (*S* e *R*), sendo a população da praga formada por indivíduos susceptíveis (*SS*), heterozigotos (*SR*) e resistentes (*RR*). Considera-se ainda é que este gene autossômico, sem epistasia, sem ligação com outros *locus*.

2.3.2.1 Modelo de Alstad & Andow (1995)

O modelo simula a dinâmica populacional e a evolução da resistência de *O. nubilalis* numa área com milho transgênico Bt e não transgênico. O milho Bt foi plantado mais cedo de modo que na época da infestação, as plantas de milho Bt estavam num estágio mais atrativo para os insetos. Assume-se que os insetos não têm preferência por plantas não tóxicas para depositar seus ovos. A mortalidade durante a diapausa é considerada independente da densidade. Em cada geração são considerados quatro passos: (i) a migração de adultos para área do milho transgênico reduz a frequência de alelos R na população, retardando a evolução da resistência.

2.3.2.2 Modelo de Onstad & Gould (1998)

É um modelo biológico, determinístico, estático, não espacial. Baseou-se num modelo de dinâmica populacional de *Ostrinia nubilalis* desenvolvido por Onstad (1988). Simula evolução da resistência de *O. nubilalis* ao milho Bt sob vários arranjos de refúgio: mistura de sementes, linhas intercaladas, blocos adjacentes e rotação do milho transgênico e não transgênico. O desenvolvimento da praga é modelado por uma função dependente da temperatura. Considera-se que a concentração da toxina nos tecidos da planta de milho declina após a antese, com conseqüente redução da mortalidade dos três genótipos da praga.

2.3.2.3 Modelo de Caprio (1998a)

É um modelo estocástico complexo, explicitamente espacial, com grande número de parâmetros, que trata os eventos dispersão, mortalidade, acasalamento e reprodução em escala diária considerando o arranjo espacial do refúgio e a distribuição espacial dos

insetos. Esse modelo simula o comportamento de indivíduos num área constituída de uma malha (20 x 20) de 400 quadrículas (habitats). A dispersão, mortalidade, acasalamento e reprodução são modelados em escala diária. Aspectos econômicos não considerados neste modelo. A modelagem probabilística de alguns eventos bioecológicos da praga é descrita a seguir.

A dispersão foi modelada através de um processo de caminhada aleatório de comprimento variável. Em cada habitat, considera-se a que o número de insetos que se movem para os *habitats* adjacentes, a cada dia, tem distribuição binomial com parâmetros N e p_d , em que N é o número de insetos no naquele habitat no início do dia e p_d a probabilidade de dispersão. Uma outra variável aleatória representa o comprimento do caminho aleatório.

Taxas diárias de mortalidade devido a causas naturais, que variam com a idade do inseto, são consideradas para simular a sobrevivência em cada habitat, ao longo do tempo. A cada dia, o número de insetos mortos num particular habitat é simulado considerando uma distribuição binomial, conforme proposto em Caprio & Tabashnik (1992). Os parâmetros dessa distribuição são a mortalidade específica para aquela idade e habitat (p_m) e número de inseto vivos naquele habitat no início do período (N). Considera-se que a mortalidade devido à toxina ou à aplicação de inseticidas ocorre no primeiro dia de exposição.

As fêmeas são acasaladas uma única vez a cada cinco dias. Todos os machos no habitat são considerados aptos para acasalar. Cada fêmea tem a igual probabilidade de acasalar com qualquer um dos machos do habitat, independente do seu genótipo e do genótipo do macho. O número médio de ovos postos por fêmea foi modelado pela distribuição de Poisson. Todos os indivíduos adultos sobreviventes num determinado dia eram considerados aptos para reproduzir. Assumiu-se que a dispersão por si não afeta a capacidade reprodutiva e que o custo de adaptação associado aos alelos de resistência é nulo, isto é, os indivíduos resistentes e susceptíveis têm a mesma capacidade reprodutiva.

2.3.2.4 Modelo de Caprio (Caprio, 1998b)

É um modelo biológico, determinístico, relativamente simples que corresponde a uma versão simplificada do modelo estocástico desenvolvido pelo mesmo autor. Requer um pequeno número de parâmetros, os eventos de interesse são modelados em escala de geração da praga alvo, ao invés de escala diária e os aspectos relacionados ao arranjo espacial do refúgio não são explicitamente considerados, mas embutidos nos índices de dispersão pré e pós-acasalamento. Aspectos econômicos não são considerados. Ao final de cada geração da praga, a frequência do alelo R ($FreqR$) que confere resistência à toxina Bt é estimada, considerando parâmetros bioecológicos da praga e diferentes estratégias de manejo da resistência, definidas pelo tamanho da área de refúgio e método de controle da praga na referida área.

2.3.2.5 Modelo de Peck et al. (1999)

É um modelo biológico, estocástico, estático, explicitamente espacial, desenvolvido para modelar a evolução da resistência em populações de *Heliothis virescens* em extensas áreas cultivadas com algodão transgênico. Considera a estrutura etária de adultos e larvas, o intervalo entre gerações, o movimento de larvas entre plantas dentro de um mesmo campo, e a seleção diferenciada nas áreas cultivadas com plantas transgênicas e não transgênicas.

A área é composta por um arranjo de $M \times M$ quadrículas de modo a simular campos individuais de cultivo. Os eventos são modelados em escala diária. Cada quadrícula, contém uma proporção p de plantas tóxicas e $(1-p)$ de plantas não tóxicas (refúgio). O número de N de insetos adultos em cada campo (quadrícula), no passo inicial, é obtido de uma distribuição de probabilidade com média N_A e variância S_A . A frequência média do alelo de resistência R nessas populações é q_0 . Como não existem estudos teóricos ou empíricos que estimem a variância de q_0 entre campos para insetos com mobilidade limitada, foram feitas 460 realizações do modelo numa área sem plantas tóxicas de modo que diferentes estimativas de q para um dado valor médio q_0 fossem obtidas com base no equilíbrio mutação/seleção. A frequência média q_0 . Foi fixada em 0,03 porque valores inferiores causaram extinção dos alelos R devido à natureza

estocástica do modelo ou ocorreram problemas para simular a evolução da frequência q devido a restrições de tempo computacional.

2.3.2.6 Modelo de Livingston (2000)

É um modelo bioeconômico, determinístico, dinâmico não espacial. Seu objetivo é determinar uma estratégia de refúgio para algodão que maximize o valor presente do lucro médio por unidade de área cultivada, considerando a restrição de níveis de resistência aceitáveis em horizontes de planejamento de 20, 30 ou 40 anos. A produtividade do algodão em áreas livres de pragas é considerada constante para o algodão Bt e não Bt. Reduções na produtividade e custos de tratamento com inseticidas são funções crescentes do nível de infestação de *H. zea* e *H. virescens* e do nível de resistência dessas pragas a piretróides. A ligação entre o nível de resistência das pragas alvo à toxina Bt e o lucro do produtor é estabelecido pela relações entre (i) taxa de sobrevivência anual das larvas e níveis médios anuais de infestação de larvas; (ii) níveis de infestação das pragas e custos médios anuais de tratamento com piretróides; e (iii) taxas de sobrevivência, níveis de infestação e tratamento com piretróides e perdas anuais devido a danos de pragas. Nesse modelo, dito bioeconômico, o modelo genético que simula a evolução da resistência das pragas alvo à toxina Bt é associado a um modelo econômico de maximização de lucro sujeito a restrições ambientais.

2.3.2.7 Modelo de Guse et al. (2002)

É um modelo biológico, determinístico, explicitamente espacial. A modelagem da evolução da resistência em populações de *O. nubilalis* e *D. grandiosella* é feita numa área hipotética de 260 ha com cultivo contínuo de milho irrigado com pivô central. Parte da área é plantada com milho não transgênico (refúgio). Diferentes arranjos espaciais de refúgios são considerados, em blocos contínuos ou faixas intercaladas. A sobrevivência é considerada dependente da densidade em algumas fases da praga e independente em outras. Durante a fase imatura, assume-se que os insetos permanecem no seu habitat de origem; os adultos movimentam-se entre os *habitats* durante o acasalamento e a

oviposição; a intensidade dessa movimentação é regulada pelos índices de dispersão pré e pós-acasalamento.

2.4 Avaliação do risco de resistência

Avaliação de risco é um dos componentes de um paradigma maior chamado análise de risco, que compreende: avaliação, gerenciamento e comunicação do risco (Covello & Mumpower, 1985; Norton, 1996; Asant-Duah, 1998); Conceitualmente, a definição de risco baseada em sua abordagem científica é simples e direta: a probabilidade de ocorrência de um efeito adverso; na prática, no entanto, o processo de avaliação de risco pode ser extremamente complicado e difícil (Peterson, 2001). Exige o uso de modelos conceituais racionais integrando aspectos sociais, culturais, econômicas e políticos. A avaliação é uma etapa fundamental para geração de informações necessárias ao gerenciamento e comunicação do risco associado à implementação de políticas públicas que envolvem a risco tecnológico (Covello & Mumpower, 1985).

A análise de risco se estabeleceu como uma disciplina formal nos últimos vinte e cinco anos é hoje é considerada crucial para tomada de decisões sobre a adoção de modernas tecnologias tais como culturas transgênicas (Peterson, 2001). A avaliação de risco pode ser definida como a base formal para a quantificação objetiva do risco de modo que incertezas e pressuposições inerentes ao processo gerador do risco sejam claramente consideradas e apresentadas. Envolve esforços multidisciplinares entre especialistas de diferentes áreas da ciência. O processo de avaliação de risco associado a agentes potencialmente tóxicos segue um fluxo lógico, que inclui os seguintes passos: (i) formulação do problema; (ii) identificação da possibilidade de dano; (iii) estimação da relações dose-resposta; (iv) quantificação da probabilidade de exposição; e (v) caracterização do risco (Norton, 1996; Asant-Duah, 1998).

Os métodos para incorporação de risco em planejamento agrícola têm sido objeto de interesse de pesquisadores há décadas (Whittaker & Thieme, 1996). Os fatores que influenciam as tomadas de decisão têm sempre alguma incerteza associada (Pecher & Hahn, 1999) o que torna imprescindível o uso de ferramentas de análise que considerem essa incerteza para uma abordagem realística do problema abordado.

O gerenciamento de risco ambiental fundamenta-se em resultados de avaliação de custos e benefícios de processos sobre os quais o conhecimento é incompleto. Em muitas situações, são utilizadas avaliações qualitativas, baseadas em julgamentos pessoais, com alto grau de subjetividade, passíveis da influência de interesses e experiências dos avaliadores. Segundo Burgman (2000), a análise de risco baseada em modelos matemáticos é de grande valor em situações onde os dados são escassos e o nível de entendimento dos processos ainda é pobre. O uso de modelos matemáticos é a melhor forma de integrar a informação disponível. Têm a vantagem de evitar elementos arbitrários de avaliações subjetivas, permitir debates relativamente transparentes, consistentes e livres de ambigüidades.

Um dos principais aspectos a serem considerados na avaliação de risco da adoção de culturas transgênicas inseticidas é resistência das pragas alvo às toxinas expressas na cultura transgênica. Na avaliação de risco de resistência, o efeito adverso é caracterizado como uma alta frequência do alelo de resistência (*R*) na população da praga. Essa avaliação exige o uso de ferramentas que possibilitem integrar aspectos da genética, biologia e ecologia da praga alvo, aspectos genéticos e de manejo da cultura transgênica. É uma ferramenta de suporte à decisão sobre estratégias de manejo a serem adotadas para prevenir ou pelo menos adiar a evolução da resistência.

2.4.1 Definição de risco

Para discutir o risco associado às culturas Bt é necessário antes definir risco e seus componentes. Segundo Peterson (2001), existem duas maneiras distintas de abordar o tema risco: risco visto como uma percepção ou risco sob o ponto de vista científico.

2.4.1.1 Risco como percepção

O público de um modo geral têm a percepção de que produtos oriundos de culturas transgênicas são perigosos. Pesquisas conduzidas nos últimos vinte anos têm mostrado de forma consistente que a visão do público sobre o risco de tecnologias modernas é diferente da avaliação de especialistas (Peterson, 2001). Enquanto os especialistas avaliam risco em termos de eventos nocivos caracterizados de forma

precisa, o público considera fatores de abrangência ampla tais como o potencial catastrófico, o entendimento geral que as pessoas têm sobre o processo ou atividade causadora do risco, equidade, clareza dos benefícios, confiança nas instituições, possíveis efeitos retardados, efeitos sobre crianças ou gerações futuras. Em geral, as percepções do público sobre risco são produto de viés intuitivo e interesses econômicos que frequentemente refletem valores culturais.

O público usa essas características para julgar a aceitabilidade de um risco, ao invés de estimativas baseadas em experimentos. Por exemplo, o público considera alimentos oriundos de plantas transgênicas como mais perigosas para a saúde que compostos carcinogênicos naturais existentes em alimentos ou bebidas oriundas de plantas não transgênicas. As preocupações do público sobre produtos biotecnológicos são tipicamente não centrados em aspectos técnicos, mas em preocupações sobre ética, moralidade, segurança e benefícios. A comunidade científica e dos órgão de regulamentação ambiental tendem a focar sua preocupação em assuntos técnicos tais como o escape de transgenes por meio de polinização cruzada com espécies selvagens, produção de toxinas não desejáveis ou seleção para resistência de insetos, por exemplo. O uso de biotecnologia para produção de novos remédios é tipicamente mais aceito que na produção de alimentos. Isso porque os benefícios associados com produtos biotecnológicos na área médica são provavelmente mais aparentes e imediatos que em outras áreas de aplicação.

2.4.1.2 Risco como ciência

A avaliação de risco baseada em métodos científicos norteia-se no fato de que o risco é função do potencial de uma substância ou atividade de causar dano, expresso pela periculosidade e do grau de exposição. Exposição é a probabilidade e/ou magnitude do contato entre o agente causador do provável dano e a entidade sob risco. O conceito de risco está intrinsecamente relacionado com probabilidade; enquanto periculosidade relaciona-se com possibilidade. Em poucas palavras: risco é a probabilidade de ocorrência de um efeito adverso. Como a qualquer processo está associado um grau de

periculosidade, tudo implica em algum grau de risco. O risco varia com as diferenças de severidade do dano e probabilidade de exposição.

Risco pode ser abordado em diferentes escalas, dependendo da complexidade dos sistemas bioecológicos sobre os quais atuarão os possíveis efeitos adversos. Em nível crescente de complexidade, as entidades alvo de processos geradores de risco podem ser: indivíduos, população, comunidade, ecossistema, biosfera (Peterson, 2001).

2.4.2 A análise de incertezas como ferramenta para quantificação de risco

Incertezas são inerentes a todo processo de quantificação de risco no qual modelos matemáticos são utilizados para previsões além do domínio da observação direta (Hoffman & Kaplan, 1999; Abrahamsson, 2002). Inúmeras fontes de incerteza estão associadas ao uso de modelos matemáticos, não apenas pelo fato de os modelos serem representações imperfeitas de uma realidade mas também devido à incerteza associada aos dados de entrada, que influenciam diretamente a qualidade das previsões.

Nesse contexto, incerteza e variabilidade têm diferentes conceitos. Variabilidade representa a diversidade ou heterogeneidade numa população e é tipicamente representada por uma distribuição de frequências. É uma característica intrínseca da população e não pode ser reduzida por medições adicionais. Incerteza representa ignorância parcial ou falta de conhecimento perfeito por parte do analista e como tal pode ser reduzida com a coleta de novas informações (Anderson & Hattis, 1999; Isukapalli & Georgopolus, 2001, Abrahamsson, 2002).

2.4.2.1 Modelagem incorporando análise de incertezas

De acordo Abrahamsson (2002), a análise de incertezas associadas a parâmetros de um modelo é um processo que pode ser resumido em quatro etapas básicas: (i) Quantificação de incertezas associada a parâmetros de entrada mais importantes do modelo em termos de distribuições de probabilidade; (ii) Amostragem das distribuições dos parâmetros-chave num processo iterativo; (iii) Propagação dos efeitos das incertezas através do modelo; e (iv) Aplicação de técnicas estatísticas para analisar os resultados, caracterizados por meio de distribuições de probabilidade.

A quantificação de incertezas de um ou mais parâmetros do modelo em termos de distribuições de probabilidade pode ser feita utilizando análise de dados e/ou opinião de especialistas (Frey & Burmaster, 1999). Hoffman & Kaplan (1999) classificaram esses métodos em três categorias: (i) Uso de estatística clássica – distribuições de probabilidade são ajustadas aos dados disponíveis, utilizando critérios estatísticos para escolha do ajuste mais adequado. São raras as situações em que há dados suficientes e esses dados são relevantes com relação à abrangência espacial e temporal do problema sob análise, (ii) Julgamento de especialistas utilizando toda a informação disponível – distribuições de probabilidade subjetivas são especificadas por especialistas sobre um particular aspecto do processo modelado com base em toda a informação disponível sobre o parâmetro em questão. Esse método é o mais empregado quando na ausência de dados experimentais ou amostrais ou quando os conjuntos de dados são pouco relevantes para a magnitude do processo modelado; e (iii) Formalização da opinião de especialistas – especialistas com acesso a toda informação disponível sobre o assunto em questão são treinados por analistas. A opinião dos especialistas é formalizada e seus argumentos documentados. Eles são entrevistados, e fazem a defesa de seus argumentos antes da especificação de qualquer distribuição de probabilidade. Cada especialista especifica uma distribuição para cada parâmetro, estabelecendo seus percentis. Diferentes pesos podem ser considerados para a opinião de cada especialista. Esse método pode ser extremamente caro. É recomendável compará-lo com o custo de obtenção de dados adicionais para reduzir as lacunas de conhecimento.

A análise de incertezas requer procedimentos computacionalmente intensivos. Dependendo do número de parâmetros tratados como informação incerta e da complexidade dos algoritmos do modelo utilizados para processar essa informação, podem surgir restrições de ordem computacional essas se tornam mais críticas quando se deseja quantificar risco em diferentes locais e múltiplos cenários.

2.4.2.2 Fatores operacionais limitantes

Essas limitações estão relacionadas ao tempo de processamento, volume da dados gerados a ser armazenado e uso da informação incerta para calibração do modelo:

(i) tempo computacional de processamento; (ii) armazenamento dos resultados; e (iii) processamento de resultados com incertezas associadas⁶.

2.4.2.2.1 Tempo computacional de processamento

O uso desse tipo de modelo envolve a amostragem de valores dos parâmetros de entrada de suas respectivas distribuições e a execução do modelo múltiplas vezes, para cada conjunto de valores amostrados dos parâmetros.

2.4.2.2.2 Armazenamento dos resultados

Nesse tipo de modelo os resultados gerados são distribuições empíricas das variáveis de saída utilizadas para cálculo das diferentes métricas de risco, tais como probabilidade uma variável indicadora de exceder o valor da mediana histórica de uma série temporal, probabilidade de exceder um limite crítico relacionado a danos ambientais ou qualquer outra função da distribuição empírica da variáveis de interesse. Esse tipo de resultado requer alta capacidade de armazenamento de dados.

2.4.2.2.3 Processamento de resultados com incertezas associadas

É um desafio técnico compatibilizar dados de entrada com representação estocástica e métodos de calibração de modelos. Além disso, avaliar a concordância entre dados observados é estimado quando essas estimativas são representadas por distribuições de probabilidade exige técnicas estatísticas mais complexas que as utilizadas em modelos determinísticos.

2.4.2.3 Estratégias computacionais para análise de incertezas

Na maioria das situações, modelos são ferramentas indispensáveis exatamente pelo fato de os processos envolvidos serem relativamente complexos, com grande número de variáveis de entrada. Essas variáveis são geralmente de natureza diversa,

⁶ Groundwater vadose zone integration project preliminary SAC concepts for architecture platform and data management. Appendix G: uncertainty analysis. www.hanford.gov/cp/gpp/modeling/sacarchive/App%20G.pdf. 1999. (10 mai. 2003).

caracterizadas por distribuições não normais que podem ser contínuas ou discretas e suas inter-relações matematicamente representadas por funções não lineares.

Por esse motivo, as distribuições das variáveis de saída são obtidas através de processos iterativos que resultam numa distribuição empírica. Essa informação é utilizada para descrever o *range* das potenciais saídas do sistema, estimar percentis da referida distribuição ou ainda a probabilidade que uma variável de saída exceda um valor crítico.

Várias técnicas computacionais têm sido utilizadas para análise de incertezas. A seguir serão descritas de modo sucinto algumas mais comuns: (i) propagação analítica; (ii) Monte Carlo com amostragem aleatória; e (iii) Monte Carlo com técnicas de amostragem especializadas.

2.4.2.3.1 Propagação analítica

Somente em modelos muito simples, é possível derivar essas distribuições das variáveis de saída utilizando métodos analíticos. Isso é factível quando há um pequeno número de variáveis de entrada estocásticas e o modelo não é muito complexo, os algoritmos utilizados se restringem a transformações lineares das variáveis de entrada e estas são modeladas por distribuições normais. Na maioria das situações práticas, o problema de obter uma solução analítica é intratável.

2.4.2.3.2 Monte Carlo com amostragem aleatória

Nessa abordagem há dois passos básicos: no primeiro, um valor é gerado para cada parâmetro estocástico e o modelo é rodado obtendo-se um valor de saída; esse processo é freqüentemente denominado realização do modelo; o processo é então repetido para obtenção de outro valor de saída igualmente provável. Após o processo ser repetido um grande número vezes é produzido um conjunto de valores possíveis igualmente prováveis que constituem a distribuição empírica da variável de saída.

2.4.2.3.3 Monte Carlo com técnicas de amostragem especializadas

Diversas técnicas especializadas de amostragem têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir o número de realizações necessárias numa análise Monte Carlo para obter uma descrição satisfatória das distribuições das variáveis de saída. Uma dessas técnicas, desenvolvida por Iman & Conover (1986) foi denominada amostragem hipercubo latino (*Latin Hypercube Sampling*). A abordagem geral é a mesma utilizada na técnica Monte Carlo com amostragem aleatória mas as amostras de valores dos parâmetros estocásticos de entrada são obtidas de maneira diferente. Eles são escolhidos das mesmas FDP, mas o esquema amostral distribui os valores de tal forma que a mesma precisão das estimativas pode ser obtida com um número de realizações menor que no Monte Carlo tradicional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O modelo escolhido para incorporação de incertezas foi o modelo determinístico de Caprio (Caprio, 1998a), desenvolvido para simular a evolução da resistência num sistema simplificado, com menor número de parâmetros, quando comparado ao sistema simulado no modelo espacial estocástico do mesmo autor (Caprio, 1998a). Devido à sua parcimônia, permite a simulação rápida de cenários para combinações de uma grande amplitude de valores dos parâmetros. Uma discussão sobre o uso dos modelos estocástico e determinístico é apresentada em Caprio (2001).

Em todos os cenários, assumiu-se que o arranjo espacial do refúgio é tal que o índice de dispersão pré-acasalamento é máximo ($DispPRErand=1$). O valor do *CoefEndogamia* foi considerado nulo. Para escolher um parâmetro a ser tratado como variável aleatória na análise de incertezas foi realizada análise de sensibilidade das estimativas da frequência do alelo *R*, ao final de cada geração, a variações nos valores dos parâmetros *FreqInicial* e grau de dominância funcional da resistência (*DfRes*).

O efeito do tipo de distribuição de probabilidade utilizada para caracterizar a incerteza do parâmetro indicado pela análise de sensibilidade sobre as estimativas de risco foi avaliado em situações onde a variedade ou híbrido transgênico expressa a toxina Bt em alta dose para a praga alvo considerada. O risco de resistência na população da praga foi estimado em diferentes cenários, variando o tamanho da área de refúgio.

3.1 Modelo determinístico de Caprio

Os fundamentos teóricos do modelo determinístico de Caprio estão descritos de modo sucinto em Caprio (2000) e no relatório de um grupo de especialistas em manejo

da resistência em insetos indicado pelo subcomitê IRI (*Insect Resistance Management*) estabelecido pelo HESI/ILSI (*Health and Environmental Sciences Institute/International Life Sciences Institute*) para definir estratégias de manejo da resistência de pragas alvo a toxinas Bt expressas em milho transgênico.

Neste item serão descritos de modo detalhado os dados de entrada, pressupostos e equações gerais do modelo. Sua representação esquemática é apresentada na Figura 1.

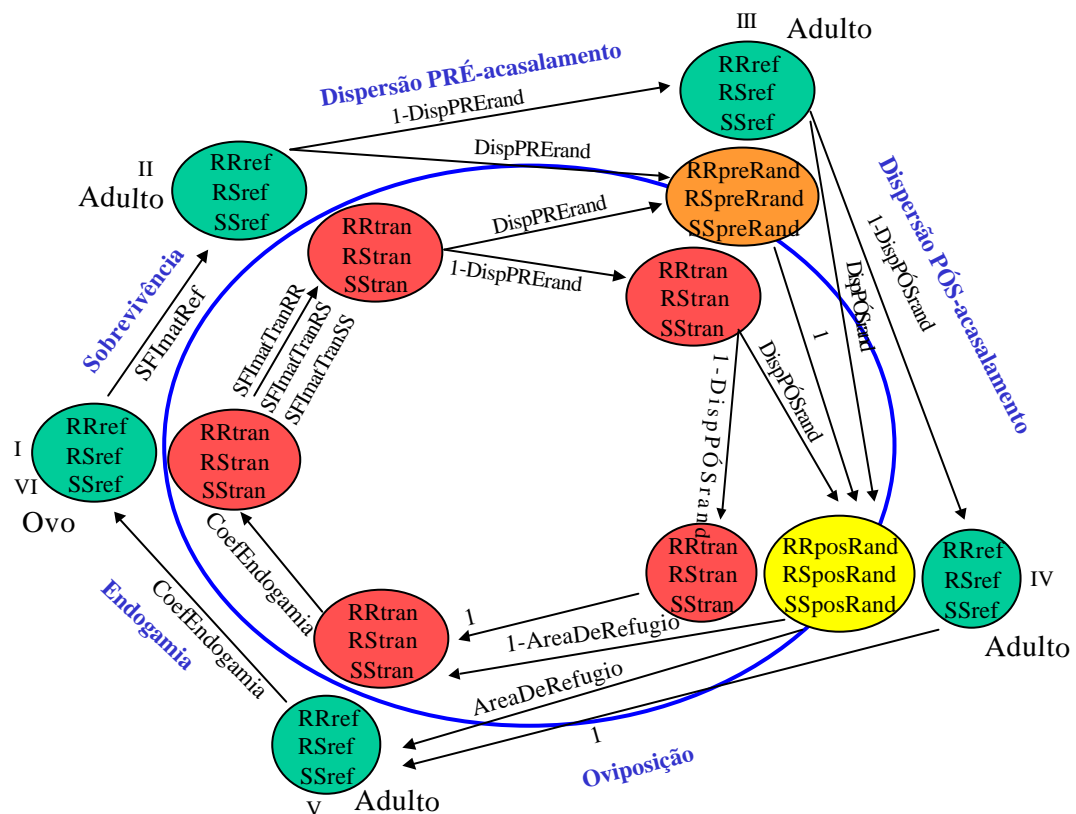


Figura 1 - Representação esquemática do modelo conceitual utilizado para simular a evolução da resistência da praga alvo à toxina Bt expressa em culturas transgênicas, base para elaboração do software RRiskBt (v.1.00)

3.1.1 Dados de entrada

Para simular a evolução da resistência a toxinas Bt na população de uma praga alvo, utilizando o modelo determinístico de Caprio, são necessárias informações

relacionadas à expressão da toxina na planta transgênica, à bioecologia da praga alvo e à estratégia de manejo escolhida (Tabela 1). Diferentes cenários podem ser construídos variando valores dos parâmetros e/ou variáveis de decisão. As variáveis de decisão estão relacionadas com os fatores operacionais que influenciam a evolução da resistência.

Tabela 5. Parâmetros bioecológicos da praga que são utilizados no modelo determinístico de Caprio

Parâmetro	Descrição
<i>FreqInicial</i>	Frequência inicial do alelo de resistência (R) na população da praga alvo
<i>FreqRCriticaTran</i>	Frequência crítica do alelo R na área da cultura transgênica
<i>SFImatRef</i>	Sobrevivência da praga alvo durante a fase imatura, na área de refúgio
<i>CoefEndogamia</i>	Coefficiente de endogamia da população da praga alvo.
<i>SFImatSStran</i>	Sobrevivência da subpopulação SS durante a fase imatura na área da cultura transgênica
<i>SFImatRRtran</i>	Sobrevivência da subpopulação RR durante a fase imatura na área da cultura transgênica
<i>SFImatRStran</i>	Sobrevivência da subpopulação RS durante a fase imatura na área da cultura transgênica
<i>DispPRErand</i>	Proporção de indivíduos de cada <i>habitat</i> que se dispersa de forma aleatória na área total antes do acasalamento
<i>DispPOSrand</i>	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

A principal variável de decisão nesse contexto é a proporção da área total ocupada pelo refúgio (*AreaDeRefugio*). Outras variáveis de decisão como aplicação de inseticidas no refúgio e arranjo espacial do refúgio são informadas de modo implícito, embutidas nos índices de sobrevivência e dispersão: o índice de sobrevivência da praga

alvo, durante a fase imatura, na área de refúgio depende da eficiência do inseticida aplicado, quando esta estratégia for adotada; o arranjo espacial do refúgio implicará em maior ou menor grau de dispersão nas fases de pré e pós-acasalamento, mensurado por meio de índices de dispersão. As variáveis de decisão e os parâmetros do modelo serão descritos a seguir.

3.1.1.1 Proporção da área total ocupada pelo refúgio (*AreaDeRefugio*)

Área preestabelecida para o refúgio, expressa como porcentagem da área total ocupada pela cultura transgênica e pelo refúgio. Considerando a hipótese de igual densidade da praga nos dois *habitats*, essa proporção corresponde à proporção inicial da população da praga alvo na área de refúgio.

3.1.1.2 Freqüência inicial do alelo de resistência (*R*) na área de refúgio (*FreqInicial*)

Freqüência do alelo que confere resistência à toxina Bt numa população não exposta anteriormente a essa toxinas.

3.1.1.3 Freqüência crítica do alelo *R* na área da cultura transgênica (*FreqRCriticaTran*)

Freqüência do alelo *R* acima da qual se considera que a tecnologia se tornou inviável devido ao nível de dano causado pela população de insetos resistentes. A vida útil da tecnologia, para uma determinada estratégia de manejo da resistência preestabelecida, pode ser estimada para diferentes valores de *FreqRCriticaTran*.

3.1.1.4 Sobrevivência da população da praga alvo durante a fase imatura na área de refúgio (*SFImatRef*)

Proporção de indivíduos que atingem a idade adulta (número de adultos/número de ovos) na área de refúgio. É resultante da sobrevivência em cada um dos instares da

fase imatura, influenciada por fatores como parasitismo, predação e eficiência do método utilizado para controle da praga alvo.

3.1.1.5 Sobrevivência das subpopulações *SS* (*SFImatSStran*), *RS* (*SFImatRStran*) e *RR* (*SFImatRRtran*) durante a fase imatura na área da cultura transgênica

Índices que quantificam a sobrevivência de cada uma das subpopulações (*SS*, *RS* e *RR*) durante a fase imatura na área da cultura transgênica. A relação entre esses índices depende do grau de dominância funcional da resistência que por sua vez depende da concentração da toxina expressa na planta transgênica.

3.1.1.6 Coeficiente de endogamia (*CoefEndogamia*)

Índice de redução da frequência relativa de heterozigotos entre duas gerações consecutivas. A endogamia altera as frequências genotípicas ao longo das gerações, mantendo constantes as frequências gênicas.

3.1.1.7 Proporção de indivíduos com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória (*DispPRErand*)

Proporção de indivíduos de cada *habitat* que tem dispersão pré-acasalamento aleatória na área total, relativa ao respectivo número total de indivíduos em cada *habitat*. Este tipo de dispersão, dito dispersão pré-acasalamento completamente aleatória, caracteriza-se pelo fato de a probabilidade de uma fêmea acasalar com qualquer macho da população (ou vice-versa), independente do habitat de origem é a mesma.

3.1.1.8 Proporção de indivíduos com dispersão pós-acasalamento completamente aleatória (*DispPOSrand*)

Antes do acasalamento, uma proporção de indivíduos do refúgio e uma igual proporção de indivíduos da área da cultura transgênica se dispersam de forma aleatória na área total (*DispPRErand*), os indivíduos remanescentes se dispersam de forma aleatória nos seus respectivos *habitats* de origem. A proporção de indivíduos de cada um

dos *habitats* com dispersão pré-acasalamento restrita ao *habitat* de origem que se dispersa de forma completamente aleatória após o acasalamento é denominada *DispPOSrand*.

A dispersão das fêmeas após o acasalamento influirá no padrão espacial de oviposição nos dois *habitats*. Quando a dispersão pós-acasalamento é completamente aleatória, a oviposição também será, isto é, a probabilidade de uma fêmea ovipositar numa particular planta, é a mesma para qualquer planta na área total, considerando a que a densidade de plantas é uniforme na área inteira. Com relação ao padrão espacial de oviposição, duas opções podem ser consideradas: (i) oviposição completamente aleatória: toda a população de fêmeas acasaladas tem dispersão pós-acasalamento completamente aleatória e conseqüente padrão espacial de oviposição completamente aleatório ($DispPOSrand=1$); ou (ii) oviposição aleatória parcialmente restrita ao *habitat* de origem: uma proporção pré-determinada de fêmeas ($0 < DispPOSrand < 1$) acasaladas no seu *habitat* de origem tem padrão espacial de oviposição completamente aleatório e as demais têm oviposição restrita ao *habitat* de origem; todas as fêmeas com dispersão pré-acasalamento completamente aleatório, tem padrão espacial de oviposição completamente aleatório.

3.1.2 Pressupostos do modelo

Nesse modelo, a evolução da frequência do gene de resistência na área da cultura transgênica e no refúgio é simulada considerando os pressupostos descritos a seguir.

3.1.2.1 Densidade inicial da praga alvo

Considerando que a densidade do inseto é a mesma nos dois *habitats* (refúgio e área da cultura transgênica), a proporção expressa em termos de tamanho da população corresponde à proporção expressa em termos de área (*AreaDeRefugio*).

3.1.2.2 Freqüência inicial do alelo de resistência

A freqüência do alelo R na geração inicial da praga alvo é considerada a mesma para o refúgio e área do milho transgênico.

3.1.2.3 Arranjo espacial das áreas de refúgio e da cultura transgênica

O arranjo espacial dos dois *habitats* deve ser tal que permita haver algum grau de dispersão completamente aleatória pré-acasalamento: indivíduos da área de refúgio podem se acasalar com indivíduos da área da cultura transgênica e vice-versa. Se não houver dispersão aleatória pré-acasalamento nem pós-acasalamento, o refúgio não será efetivo.

3.1.2.4 Sobrevivência dos genótipos SS , SR e RR durante a fase imatura

Na área de refúgio, todos os genótipos (SS , RS e RR) têm a mesma sobrevivência na fase imatura, ou seja o custo adaptativo associado ao alelo de resistência é considerado nulo. Na área da cultura transgênica, a sobrevivência dos três genótipos dependerá da concentração em a toxina Bt se expressa na planta. Na estratégia refúgio/alta dose, a concentração da toxina deve ser tal que mata todos os homozigotos susceptíveis e quase todos os heterozigotos. Assim, a sobrevivência do genótipo SS deve ser mínima, do genótipo RR próxima de 1; e o genótipo RS deve ter uma sobrevivência intermediária, que depende do grau de dominância do alelo R .

3.1.2.5 Dispersão pré-acasalamento

A proporção de indivíduos com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória (*DispPRErand*) é a mesma no refúgio e na área da cultura transgênica e é independente do genótipo.

3.1.2.6 Dispersão pós-acasalamento

Todos os indivíduos na subpopulação com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória (*SubPRErand*) têm dispersão pós-acasalamento também

completamente aleatória ($DispPOSrand=1$). Nas subpopulações com dispersão pré-acasalamento restrita ao habitat de origem ($SubPREref$ e $SubPREtran$), a proporção de indivíduos com dispersão pós-acasalamento completamente aleatória ($DispPOSrand$) é a mesma nos dois *habitats*.

3.1.2.7 Coeficiente de endogamia

O coeficiente de endogamia na população da praga alvo é o mesmo nos dois *habitats*.

3.1.3 Equações gerais do modelo

3.1.3.1 Cálculo das frequências relativas iniciais dos genótipos RR, RS e SS na população de ovos da primeira geração, em cada um dos *habitats*

Na geração inicial da praga, a frequência do alelo R de resistência à toxina Bt expressa na planta transgênica é denotada por $FreqInicial$. As frequências relativas iniciais dos genótipos RR , RS e SS na primeira geração (descendentes da geração inicial), em cada um dos *habitats*, são calculadas utilizando o valor de $FreqInicial$ e o valor estipulado para a porcentagem inicial de insetos na área de refúgio, expresso como porcentagem do número de insetos na área total ($AreaDeRefugio$). As frequências dos genótipos RR , RS e SS na área total são calculados considerando o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências em cada um dos *habitats*, expressas como frações da população total, são obtidas dividindo-se as correspondentes frequências dos genótipos na área total em partes proporcionais à população de insetos em cada *habitat*:

$$FreqRRtran = (1 - AreaDeRefugio).(FreqInicial)^2 \quad (2)$$

$$FreqRStran = (1 - AreaDeRefugio).2.(FreqInicial).(1 - FreqInicial) \quad (3)$$

$$FreqSStran = (1 - AreaDeRefugio).(FreqSref_0)^2 \quad (4)$$

$$FreqRRref = AreaDeRefugio.(FreqInicial)^2 \quad (5)$$

$$FreqRSref = AreaDeRefugio.2.(FreqInicial).(1 - FreqInicial) \quad (6)$$

$$FreqSSref = AreaDeRefugio.(FreqSref_0)^2 \quad (7)$$

Quando existe endogamia, as frequências genóticas dos descendentes da geração colonizadora, na fase de ovo, são alteradas. Se o coeficiente de endogamia for maior que zero, há uma redução na frequência relativa de heterozigotos:

$$FreqSSref = FreqSSref + (0,5.CofEndogamia).FreqRSref \quad (8)$$

$$FreqRRref = FreqRRref + (0,5.CofEndogamia).FreqRSref \quad (9)$$

$$FreqRSref = FreqRSref - CofEndogamia.FreqRSref \quad (10)$$

$$FreqSStran = FreqSStran + (0,5.CofEndogamia).FreqRStran \quad (11)$$

$$FreqRRtran = FreqRRtran + (0,5.CofEndogamia).FreqRStran \quad (12)$$

$$FreqRStran = FreqRStran - CofEndogamia.FreqRStran \quad (13)$$

3.1.3.2 Cálculo das frequências relativas iniciais dos genótipos RR, RS e SS na população de adultos da primeira geração, em cada um dos habitats

As frequências genóticas em cada um dos *habitats* são alteradas a cada geração, considerando a sobrevivência na fase imatura das subpopulações RR, RS e SS em cada *habitat*. Quando se opta pela estratégia de aplicar inseticida no refúgio, essa informação deve estar embutida no valor da sobrevivência para os diferentes genótipos na subpopulação da praga alvo no refúgio. Quanto maior a eficiência do produto aplicado, menor será o valor de *SFImatRef*.

$$FreqRRtran = FreqRRtran.SFImatRRtran \quad (14)$$

$$FreqSStran = FreqSStran.SFImatSStran \quad (15)$$

$$FreqRSRtran = FreqRSRtran.SFImatRStran \quad (16)$$

$$FreqRRref = FreqRRref.SFImatRef \quad (17)$$

$$FreqSSref = FreqSSref.SFImatRef \quad (18)$$

$$FreqRSRref = FreqRSRref.SFImatRef \quad (19)$$

As frequências genóticas dos adultos são ajustadas de modo a expressar o número de indivíduos de um particular genótipo, num determinado *habitat*, como fração do número total de indivíduos nos dois *habitats*. As frequências genóticas representam frações da população total ao invés de frações da população de cada *habitat* para facilitar os cálculos das frequências em subpopulações onde os insetos são oriundos dos dois *habitats*. O ajuste é feito dividindo-se cada frequência pela soma das frequências genóticas nos dois *habitats* ($FreqTotal$).

3.1.3.3 Cálculo das frequências genóticas nas subpopulações de adultos definidas pelo padrão de dispersão pré-acasalamento

A população de adultos em cada *habitat* é então alocada em subpopulações caracterizadas pelo padrão de dispersão pré-acasalamento, que pode ser completamente aleatório ou restrito ao *habitat* de origem. Uma proporção de indivíduos do refúgio ($DispPRErand$) e uma mesma proporção de indivíduos da área da cultura transgênica com dispersão pré-acasalamento completamente aleatória constituem a subpopulação $SubPRErand$. Os indivíduos com dispersão pré-acasalamento restrita ao *habitat* de origem constituirão as subpopulações $SubPREref$ e $SubPREtran$, no refúgio e área da cultura transgênica, respectivamente.

As frequências genóticas nessas três subpopulações são calculadas a partir das frequências dos genótipos RR , RS e SS na fase adulta em cada um dos *habitats* e do valor de $DispPRErand$, predefinido pelo usuário:

$$FreqRRdispPREref = (1 - DispPRErand).FreqRRref \quad (20)$$

$$FreqRSRdispPREref = (1 - DispPRErand).FreqRSRref \quad (21)$$

$$FreqSSdispPREref = (1 - DispPRErand).FreqSSref \quad (22)$$

$$FreqRRdispPRErand = DispPRErand.(FreqRRtran + FreqRRref) \quad (23)$$

$$FreqRSdispPRErand = DispPRErand.(FreqRStran + FreqRSref) \quad (24)$$

$$FreqSSdispPRErand = DispPRErand.(FreqSSStran + FreqSSref) \quad (25)$$

$$FreqRRdispPREtran = (1 - DispPRErand).FreqRRtran \quad (26)$$

$$FreqRSRdispPREtran = (1 - DispPRErand).FreqRSRtran \quad (27)$$

$$FreqSSdispPREtran = (1 - DispPRErand).FreqSSRtran \quad (28)$$

3.1.3.4 Cálculo das frequências gênicas dos adultos acasalados nas subpopulações *SubPRErand*, *SubPREref* e *SubPREtran*

As frequências gênicas são obtidas a partir das frequências genotípicas calculadas no item anterior em cada subpopulação:

$$FreqRdispPREref = FreqRRDispPREref + 0,5.FreqRSdispPREref \quad (29)$$

$$FreqSdispPREref = FreqSSDispPREref + 0,5.FreqRSdispPREref \quad (30)$$

$$FreqRdispPRErand = FreqRRDispPRErand + 0,5.FreqRSdispPRErand \quad (31)$$

$$FreqSdispPRErand = FreqSSDispPRErand + 0,5.FreqRSdispPRErand \quad (32)$$

$$FreqRdispPREtran = (FreqRRDispPREtran + 0,5.FreqRSdispPREtran) \quad (33)$$

$$FreqSdispPREtran = (FreqSSDispPREtran + 0,5.FreqRSdispPREtran) \quad (34)$$

As frequências gênicas são ajustadas para que representem a proporção de um particular alelo (*R* ou *S*) num determinado *habitat*, relativa ao número total de alelos naquele mesmo *habitat*. e não na área total. O ajuste é feito dividindo-se as frequências gênicas em cada *habitat* pelas respectivas soma de frequências no *habitat* ($FreqTotalDispPREref$, $FreqTotalDispPRErand$ e $FreqTotalDispPREtran$).

3.1.3.5 Cálculo das freqüências genóticas dos descendentes dos adultos acasalados, nas subpopulações SubPRErand, SubPREref e SubPREtran, na fase de ovo

Inicialmente, as freqüências genóticas dos descendentes são calculadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Depois são corrigidas considerando a possibilidade de endogamia que reduziria a freqüência de heterozigotos:

$$FreqRRpreRef = (FreqRdispPREref)^2 \cdot FreqTotalDispPREref \quad (35)$$

$$FreqSSpreRef = (FreqSdispPREref)^2 \cdot FreqTotalDispPREref \quad (36)$$

$$FreqRSpreRef = (2 \cdot FreqRdispPREref \cdot FreqSdispPREref) \cdot FreqTotalDispPREref \quad (37)$$

$$FreqRRpreRand = (FreqRdispPRErand)^2 \cdot FreqTotalDispPRErand \quad (38)$$

$$FreqSSpreRand = (FreqSdispPRErand)^2 \cdot FreqTotalDispPRErand \quad (39)$$

$$FreqRSpreRand = 2 \cdot FreqRdispPRErand \cdot FreqSdispPRErand \cdot FreqTotalDispPRErand \quad (40)$$

$$FreqRRpreTran = (FreqRdispPREtran)^2 \cdot FreqTotalDispPREtran \quad (41)$$

$$FreqSSpreTran = (FreqSdispPREtran)^2 \cdot FreqTotalDispPREtran \quad (42)$$

$$FreqRSpreTran = 2 \cdot FreqRdispPREtran \cdot FreqSdispPREtran \cdot FreqTotalDispPREtran \quad (43)$$

As freqüências genóticas dos descendentes, na presença de endogamia durante o acasalamento dos pais são alteradas da seguinte forma:

$$FreqSSpreRef = FreqSSpreRef + (0,5 \cdot CoefEndogamia) \cdot FreqRSpreRef \quad (44)$$

$$FreqRRpreRef = FreqRRpreRef + (0,5 \cdot CoefEndogamia) \cdot FreqRSpreRef \quad (45)$$

$$FreqRSpreRef = FreqRSpreRef - CoefEndogamia \cdot FreqRSpreRef \quad (46)$$

$$FreqSSpreRand = FreqSSpreRand + (0,5 \cdot CoefEndogamia) \cdot FreqRSpreRand \quad (47)$$

$$FreqRRpreRand = FreqRRpreRand + (0,5 \cdot CoefEndogamia) \cdot FreqRSpreRand \quad (48)$$

$$FreqRSpreRand = FreqRSpreRand - CoefEndogamia.FreqRSpreRand \quad (49)$$

$$FreqSSpreTran = FreqSSpreTran + (0,5.CoefEndogamia).FreqRSpreTran \quad (50)$$

$$FreqRRpreTran = FreqRRpreTran + (0,5.CoefEndogamia).FreqRSpreTran \quad (51)$$

$$FreqRSpreTran = FreqRSpreTran - CoefEndogamia.FreqRSpreTran \quad (52)$$

3.1.3.6 Cálculo das frequências genóticas dos descendentes nas subpopulações SubPOSrand, SubPOSref e SubPOStran, na fase de ovo

A subpopulação *DispPOSrand* é formada por: (i) fêmeas fecundadas da subpopulação *SubPRErand* que de acordo com a pressuposição 3.1.2.6, se dispersam de modo completamente aleatório, (ii) uma proporção (*DispPOSrand*) da subpopulação *SubPREref* e (iii) uma igual proporção da subpopulação *SubPREtran* que também se dispersa de modo completamente aleatório. Desta forma, as frequências genóticas na subpopulação *DispPOSrand* são dadas por:

$$FreqSSposRrand = DispPOSrand.(FreqSSpreRef + FreqSSpreTran) + FreqSSpreRand \quad (53)$$

$$FreqRSposRrand = DispPOSrand.(FreqRSpreRef + FreqRSpreTran) + FreqRSpreRand \quad (54)$$

$$FreqRRposRrand = DispPOSrand.(FreqRRpreRef + FreqRRpreTran) + FreqRRpreRand \quad (55)$$

As subpopulações *SubPOSref* e *SubPOStran* são constituídas, respectivamente, por frações das subpopulações *SubPREref* e *SubPREtran* cuja dispersão pós-acasalamento é restrita ao *habitat* de origem, isto é, não tem dispersão pós-acasalamento completamente aleatória. Assim, as frequências genóticas na subpopulação de ovos oriundos das fêmeas em *SubPREref* e *SubPREtran* são obtidas multiplicando-se as frequências das subpopulações de ovos em *SubPREref* e *SubPREtran*, respectivamente, por $(1-DispPOSrand)$:

$$FreqSSposRref = (1 - DispPOSrand).FreqSSpreRef \quad (56)$$

$$FreqRSposRref = (1 - DispPOSrand).FreqRSpreRef \quad (57)$$

$$FreqRRposRref = (1 - DispPOSrand).FreqRRpreRef \quad (58)$$

$$FreqSSposRtran = (1 - DispPOSrand).FreqSSpreTran \quad (59)$$

$$FreqRSposRtran = (1 - DispPOSrand).FreqRSpreTran \quad (60)$$

$$FreqRRposRtran = (1 - DispPOSrand).FreqRRpreTran \quad (61)$$

3.1.3.7 Cálculo das frequências genóticas nas subpopulações de ovos no refúgio e na área da cultura transgênica, oriundos da oviposição das fêmeas das subpopulações SubPOSrand, SubPOSref e SubPOStran

Considera-se que a probabilidade de uma fêmea da *SubPOSrand* ovipositar no refúgio é igual à proporção da área total ocupada pelo refúgio (*AreaDeRefugio*) e conseqüentemente, de ovipositar na cultura transgênica é ($1 - AreaDeRefugio$). Assim, as subpopulações de ovos com genótipos *RR*, *RS* ou *SS*, no refúgio se constituem dos ovos com os respectivos genótipos oriundos de fêmeas de *SubPOSref* e contribuição de fêmeas de *SubPOSrand*. De modo similar, na área da cultura transgênica, as subpopulações de ovos com uma particular genótipo são formadas pelos ovos oriundos das fêmeas de *SubPOStran* e por uma fração dos ovos das fêmeas de *SubPOSrand* com aquele mesmo genótipo. Assim, as frequências dos genótipos *SS*, *RS* e *RR* em cada *habitat* são dadas por:

$$FreqSStran = (1 - AreaDeRefugio).FreqSSposRand + FreqSSposTran \quad (62)$$

$$FreqRStran = (1 - AreaDeRefugio).FreqRSposRand + FreqRSposTran \quad (63)$$

$$FreqRRtran = (1 - AreaDeRefugio).FreqRRposRand + FreqRRposTran \quad (64)$$

$$FreqSSref = AreaDeRefugio.FreqSSposRand + FreqSSposRef \quad (65)$$

$$FreqRSref = AreaDeRefugio.FreqRSposRand + FreqRSposRef \quad (66)$$

$$FreqRRref = AreaDeRefugio.FreqRRposRand + FreqRRposRef \quad (67)$$

As frequências acima ainda são expressas em relação à área total, não havendo necessidade de ajuste.

3.1.3.8 Cálculo das frequências gênicas nas subpopulações de ovos no refúgio e na área da cultura transgênica, oriundos da oviposição das fêmeas das subpopulações SubPOSrand, SubPOSref e SubPOStran

As frequências gênicas das populações de ovos em cada *habitat* são calculadas a partir das respectivas frequências genotípicas e ajustadas para que expressem frequências gênicas relativas ao total de alelos no *habitat*, e não na área total:

$$FreqRref = (FreqRRref + 0,5.FreqRSref).(1/FreqTotalRef) \quad (68)$$

$$FreqSref = (FreqSSref + 0,5.FreqRSref).(1/FreqTotalRef) \quad (69)$$

$$FreqRtran = (FreqRRtran + 0,5.FreqRStran).(1/FreqTotalTran) \quad (70)$$

$$FreqStran = (FreqSStran + 0,5.FreqRStran).(1/FreqTotalTran) \quad (71)$$

$FreqTotalRef$ e $FreqTotalTran$ são as somas das frequências genotípicas nos respectivos *habitats*, calculadas no item anterior. Nesse passo, obtém-se a frequência do alelo R ao final de cada geração, utilizado para quantificar a evolução da resistência. As frequências dos alelos R e S em cada *habitat* são utilizadas no passo inicial da iteração seguinte.

3.2 Análise de sensibilidade do modelo determinístico

Foram realizadas análises de sensibilidade para a frequência do alelo *R* ao longo das gerações ($FreqR$) e para o número de gerações da praga até que $FreqR$ atinja a frequência crítica ($Nger$). Em todos os casos foram considerados os parâmetros $FreqInicial$ e $DFres$, escolhidos com base nos resultados de Storer et al. (2003). Esses autores, examinando o efeito dos parâmetros de um modelo de simulação estocástico espacial da evolução de resistência de *H. Zea* a toxinas Bt expressas em milho e algodão transgênico, concluíram que os parâmetros que causam maior impacto nas estimativas de $FreqR$ são $FreqInicial$ e $DFres$. Em todas as análises, foi quantificada a variação na

variável resposta de interesse em função da variação de um parâmetro, considerando os demais fixos.

O parâmetro $DFRes$ não aparece explicitamente nos dados de entrada, mas é função dos índices de sobrevivência dos diferentes genótipos. Na análise de sensibilidade de $FreqR$ (ou $NGer$) a variações em $DFRes$, os índices de sobrevivência dos genótipos RR e SS na área da cultura transgênica ($SFImatRRtran$ e $SFImatSStran$) foi considerados 1 e 0,001, respectivamente. A relação entre os índices de sobrevivência dos três genótipos depende de $DFRes$, que por sua vez depende da concentração da toxina expressa nos tecidos da planta e de fatores ambientais (Bourguet et al., 2000). O índice de sobrevivência na subpopulação com genótipo SR ($SFImatRS$) para cada valor de $DFRes$ foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$SFImatRS = SFImatSS + DFRes.(SFImatRR - SFImatSS) \quad (72)$$

O intervalo de valores possíveis para $FreqInicial$ ($0, 2 \cdot 10^{-3}$) foi estabelecido com base em Bourguet et al. (2003). A escolha deste intervalo será discutida na seção referente à análise de incertezas associada a $FreqInicial$. Para $DFRes$ o intervalo foi obtido variando a sobrevivência dos indivíduos SR entre 0,001 e 0,005, considerando que a variedade ou híbrido transgênico expressa a toxina em alta dose, o que corresponde a valores de $DFRes$ de 0 e $4 \cdot 10^{-3}$, respectivamente.

Em cada cenário caracterizado pelo tamanho do refúgio, foram escolhidas seis gerações para a análise sensibilidade de $FreqR$ a variações em $FreqInicial$: a primeira geração, a geração na qual $FreqR$ atinge a frequência crítica, a geração imediatamente anterior a esta, e mais três gerações intermediárias. Foram construídos gráficos de $FreqR$ em função de $FreqInicial$ para cada uma das gerações. O mesmo procedimento foi utilizado para $DFRes$.

Para $NGer$, foram construídos isoladamente gráficos em função de $FreqInicial$ e da $DFRes$ em cada cenário. Foram ajustados modelos de regressão não linear para descrever o efeito de $FreqInicial$ sobre $NGer$ para $DFRes$ fixada em $1,001 \cdot 10^{-3}$.

3.3 Caracterização da incerteza associada à frequência inicial do alelo R

As distribuições de probabilidade utilizadas para caracterizar a incerteza associada a *FreqInicial* foram Uniforme, Triangular simétrica e Normal truncada simétrica.

As funções densidade de probabilidade são caracterizadas na Tabela 6. Essas distribuições foram escolhidas devido à facilidade de parametrização baseada em informação subjetiva.

Inicialmente, escolheu-se o conjunto de valores possíveis para *FreqInicial*, como o intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$, comum a todas as distribuições. Como todas são distribuições simétricas, a média ($\mu=1,0 \cdot 10^{-3}$), coincide com a mediana e assim a probabilidade de *FreqInicial* ser inferior a 10^{-3} é 50%. Esses valores são coerentes com informações de Bourguet et al. (2003) que estimaram a probabilidade de *FreqInicial* exceder 10^{-3} numa população qualquer como variando entre 40 e 70%, com base em pressupostos sobre o equilíbrio entre mutação e seleção.

Nas distribuições Uniforme e Triangular simétrica, os valores do desvio padrão, função dos valores extremos a e b anteriormente estabelecidos, são $0,5773 \cdot 10^{-3}$ e $0,4082 \cdot 10^{-3}$, respectivamente. Para as distribuição Normal truncada, foi estabelecido um valor de desvio padrão com magnitude semelhante ao desvio da distribuição Triangular. Uma caracterização detalhada da parametrização das distribuições utilizadas é apresentada na Tabela 8.

Tabela 6. Funções densidade de probabilidade correspondentes às distribuições utilizadas para representar a incerteza associada ao parâmetro *FreqInicial*

Distribuição de probabilidade	Função densidade ¹
Uniforme (a,b)	$f(x) = \frac{1}{b-a}, \quad a < x < b, \quad a < b \in R \quad (73)$
Triangular simétrica (a,b)	$f(x) = \begin{cases} 0, & x \leq a \\ \frac{4 \cdot (x-a)}{(b-a)^2}, & a < x \leq (a+b)/2 \\ \frac{4 \cdot (x-a)}{(b-a)^2}, & (a+b)/2 < x < b \\ 0, & x \geq b \end{cases} \quad (74)$
Normal truncada simétrica (a,b, μ, σ^2)	$f(x) = \begin{cases} 0, & x \leq a \\ \frac{1}{\sqrt{2\pi s^2}} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-m}{s}\right)^2\right\}}{\{P(x < a) + P(x > b)\}}, & a < x < b, \quad m \in R, \quad s^2 > 0 \\ 0, & x \geq b \end{cases} \quad (75)$

¹ KORTUM, F. Lecture 4: selection. (2002) www.econ.umn.edu/~kortum/courses/fall02/lecture4k.pdf

Tabela 7. Média e variância das distribuições para representar a incerteza associada ao parâmetro *FreqInicial*

Distribuição	Parâmetro	
	<u>Média</u>	
Uniforme	$m_{UN} = \frac{(a+b)}{2}$	(76)
Triangular simétrica	$m_{TS} = \frac{(a+b)}{2}$	(77)
Normal truncada simétrica	$m_{NTS} = \frac{(a+b)}{2}$	(78)
	<u>Variância</u>	
Uniforme	$s_{UN}^2 = \frac{(b-a)^2}{12}$	(79)
Triangular simétrica	$s_{TS}^2 = \frac{(b-a)^2}{24}$	(80)
Normal truncada simétrica ¹	$s_{NTS}^2 = s^2 \left\{ 1 - \left[\frac{b \cdot f(b) - a \cdot f(a)}{F(b) - F(a)} \right] - \left[\frac{f(b) - f(a)}{F(b) - F(a)} \right]^2 \right\}$	(81)

¹ f é a função densidade da Normal padrão e F a respectiva distribuição acumulada. σ^2 é a variância da normal não truncada correspondente.

Tabela 8. Parametrização das distribuições de probabilidade utilizadas para caracterizar a incerteza associada à *FreqInicial*: (i) Uniforme: UN(a,b), (ii) Triangular simétrica: TS(a,b) e (iii) Normal truncada simétrica: NTS(a, b, μ , σ^2)

Distribuição	Mínimo (a)	Máximo (b) (x 10 ⁻³)	Mediana (m) (x 10 ⁻³)	Média (μ) (x 10 ⁻³)	Variância (σ^2) (x 10 ⁻⁶)
UN	0	2,00	1,00	1,00	0,3333
TS	0	2,00	1,00	1,00	0,1666
NTS ¹	0	2,00	1,00	1,00	0,1453

¹ Variância estimada por simulação

3.4 Estimação do risco de resistência ao longo das gerações

Os seguintes passos foram utilizados para estimar o risco de resistência ao longo das gerações em cada cenários (Tabela 9): (i) mil valores de *FreqInicial* foram amostrados da distribuição Uniforme (a,b) utilizando algoritmo implementado no software *RRiskBt*; (ii) para cada valor de *FreqInicial* amostrado, a frequência do alelo *R* ao final de cada geração (*FreqR*) foi estimado utilizando o módulo determinístico do software *RRiskBt*; considerando os dados de entrada apresentados na Tabela 5; e (iii) a probabilidade de *FreqR* exceder a frequência crítica de 0,50 ao final de cada geração da praga, medida que quantifica o risco de resistência, foi estimada utilizando as respectivas distribuições de probabilidade empíricas de *FreqR*.

Tabela 9. Descrição dos cenários utilizados para geração das distribuições empíricas de *FreqR* ao longo das gerações, com diferentes combinações de valores de sobrevivência da praga alvo (*SFimatRef*, %) durante a fase imatura na área de refúgio (*AreaDeRefugio*, %)

Cenário	<i>AreaDeRefugio</i>	Distribuição	<i>SFimatRef</i>
I	0	Uniforme	-
	0	Triangular simétrica	-
	0	Normal truncada simétrica	-
II	5	Uniforme	100
	5	Triangular simétrica	100
	5	Normal truncada simétrica	100
III	20	Uniforme	20 ¹
	20	Triangular simétrica	20
	20	Normal truncada simétrica	20

¹ Considera-se aplicação de inseticida com 80% de eficiência para a fase imatura da praga alvo.

O mesmo processo foi repetido para as distribuições Triangular simétrica e Normal truncada. Os valores de *FreqInicial* gerados para cada uma das respectivas distribuições foram armazenados nos arquivos *Uniforme.txt*, *Triangular.txt* e *Normal.txt*. Foram calculados percentis 5, 25, 75 e 95 de distribuições de probabilidade

empíricas de $FreqR$ e construídos os respectivos histogramas utilizando o procedimento PROC CAPABILITY do SAS System (SAS, 1998). A média e variância foram calculadas usando o PROC UNIVARIATE (SAS, 1998).

3.5 Programa computacional

O modelo foi implementado num *software* desenvolvido em linguagem de programação Visual Basic. Nesse software, a evolução da resistência pode ser simulada incorporando ou não a análise de incertezas. No primeiro caso (modelo determinístico), todos os dados de entrada, previamente descritos na Tabela 5, são valores pontuais dos parâmetros ou variáveis de decisão. No segundo (modelo determinístico com análise de incertezas), a informação sobre o parâmetro frequência inicial do alelo R é representada por uma distribuição de probabilidade. Foi também incluído um módulo de análise de sensibilidade. A seguir são descritas as principais características dos dois tipos de modelo.

3.5.1 Modelo determinístico

Quando a simulação é feita utilizando o modelo determinístico, são gerados os seguintes resultados: (i) tabela com os valores de $FreqR$ e as frequências dos indivíduos resistentes homozigotos ($FreqRR$) a cada geração até que $FreqR$ exceda a $FreqCritica$ e um gráfico mostrando a evolução de $FreqR$ ao longo das gerações da praga alvo (Figura 2) e um arquivo de saída com as variáveis $SFimatSSTran$, $SfimatSRTran$, $SfimatSRTran$, $SFimatSSRef$, $AreaDeRefugio$, $CoefEndogamia$, número de ordem da geração da praga (G) e $FreqR$.

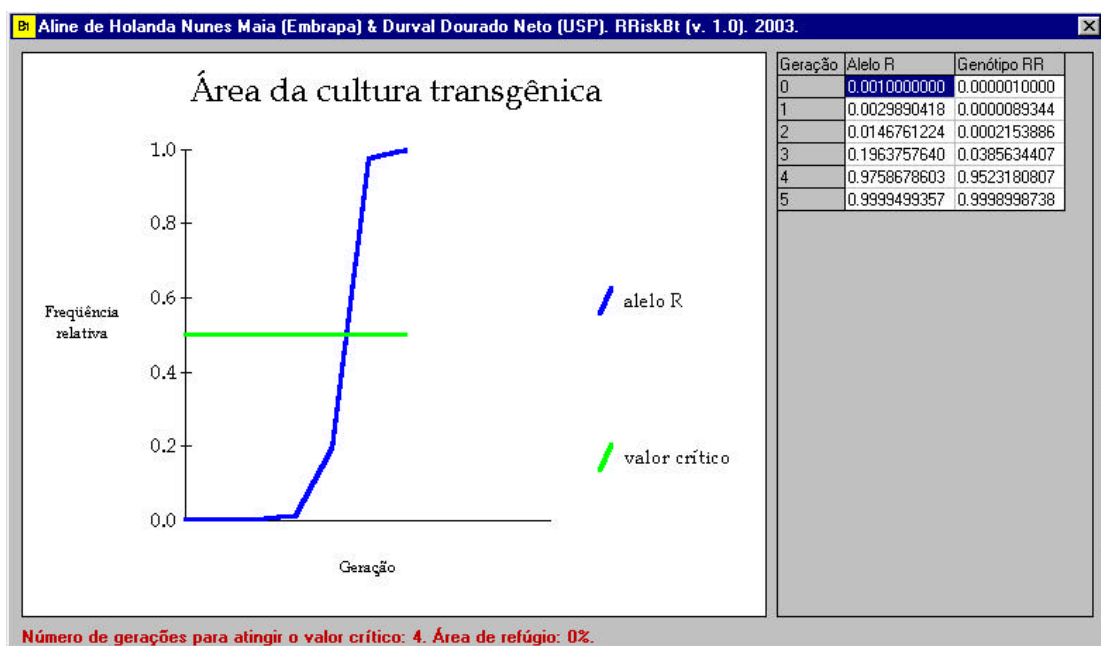


Figura 2 - Exemplo de saída do modelo determinístico: tabela com os valores de $FreqR$ ao longo das gerações da praga e gráfico de evolução da resistência

3.5.2 Análise de sensibilidade

No módulo análise de sensibilidade do software RRiskBt referente às variáveis resposta $FreqR$ ou $NGer$, há duas opções disponíveis: (i) sensibilidade a variações em $FreqInicial$ para um valor fixo de $DFRes$ e (ii) sensibilidade a variações em $DFRes$ para um valor fixo de $FreqInicial$.

Em cada uma das opções, são gerados dois arquivos em formato ASCII. O primeiro se refere à análise de sensibilidade de $FreqR$, contendo as seguintes informações: número do elemento da amostra, $DFRes$, $FreqInicial$ e valores de $FreqR$ ao longo das gerações até que seja atingido o valor 0,99. O segundo se refere à análise de sensibilidade de $NGer$, contendo as seguintes informações: número do elemento da amostra, $DFRes$, $FreqInicial$, $NGer$ e o valor de $FreqR$ na geração em que foi atingida a frequência crítica.

3.5.3 Análise de incertezas

No modelo que incorpora análise de incertezas, os dados de entrada são da mesma natureza dos utilizados no modelo determinístico, exceto o parâmetro frequência inicial (*FreqInicial*) que pode ser representado por diferentes distribuições de probabilidade: Uniforme, Triangular simétrica ou Normal truncada simétrica. Para qualquer uma das distribuições escolhidas, é necessário informar os valores máximo e mínimo do intervalo de valores possíveis de *FreqInicial*. Para gerar uma amostra da distribuição Normal truncada simétrica, gera-se uma amostra da correspondente distribuição não truncada excluindo a cada passo os valores que não pertencem ao intervalo (a,b). Utiliza-se o mesmo valor de variância da Triangular simétrica ou da Uniforme, que dependem apenas dos valores extremos do seu domínio (a e b).

São gerados os seguintes resultados (i) arquivo com os n ($n=100, 500, 1000$ ou 5000) valores de *FreqInicial* amostrados da distribuição escolhida; (ii) histograma de frequências dos valores de *FreqInicial*; (iii) arquivo com os valores de *FreqR* para cada geração da praga correspondentes a cada valor amostrado de *FreqInicial*; (iv) gráfico do risco de resistência em função do número de ordem da geração; (v) tabela com a informação utilizada para gerar o gráfico; e (vi) arquivo com a 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.

Sub-rotinas em Visual Basic foram implementadas para gerar amostras das distribuições Triangular simétrica e Normal truncada simétrica a partir de distribuições Uniformes, utilizando algoritmos descritos em na Tabela 10.

Tabela 10. Algoritmos¹ implementados no *software* RRiskBt para obtenção de amostras das distribuições Triangular simétrica e Normal truncada simétrica

<u>Distribuição de probabilidade e descrição do algoritmo</u>
<p><u>Uniforme (a,b)</u></p> <p><i>Passo 1. Geração de um valor (U1) de uma distribuição uniforme (0,1)</i></p> <p><i>Passo 2. Cálculo de FreqInicial = U1 * (b - a) + a</i></p>
<p><u>Triangular simétrica (a,b)</u></p> <p><i>Passo 1. Geração de um valor (U1) de uma distribuição uniforme (0,1)</i></p> <p><i>Passo 2. Geração de um valor (U2) de uma distribuição uniforme (0,1)</i></p> <p><i>Passo 3. Cálculo de FreqInicial = a + (b - a) * ((U1 + U2) / 2)</i></p>
<p><u>Normal truncada simétrica (a,b,μ,σ²)</u></p> <p><i>Passo 1. Geração de um valor (U1) de uma distribuição uniforme (0,1)</i></p> <p><i>Passo 2. Geração de um valor (U2) de uma distribuição uniforme (0,1)</i></p> <p><i>Passo 3. Cálculo da variável auxiliar V1 = 2 * U1 - 1</i></p> <p><i>Passo 4. Cálculo da variável auxiliar V2 = 2 * U2 - 1</i></p> <p><i>Passo 5. Cálculo da variável auxiliar S = V1 ^ 2 + V2 ^ 2</i></p> <p><i>Passo 6. Cálculo da variável auxiliar Z = V1 * Sqr(-2 * Log(S) / S)</i></p> <p><i>Passo 7². Cálculo de FreqInicial = μ + Z * σ</i></p>

¹ <http://www.xycoon.com> (20 jan. 2003)

² Se FreqInicial estiver fora do intervalo (a,b), todo procedimento é repetido

Quando diferentes cenários são simulados variando a área de refúgio ou utilizando diferentes distribuições para *FreqInicial*, o arquivo descrito no item (vi) armazena, de forma cumulativa, todas as informações geradas em cada simulação. Essa informação é útil para comparação de estratégias de manejo da resistência com base em medidas de risco relativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelo determinístico

Nos cenários sem área de refúgio (I), com área de refúgio de 5% (II) e com área de refúgio de 20% e aplicação de inseticida (III) *FreqR* atingiu o valor 0,50 em 4, 43 e 41 gerações da praga alvo, respectivamente. Os valores de *FreqR* estimados para essas gerações foram 0,9759; 0,7477 e 0,6889 e nas gerações imediatamente anteriores foram 0,1964; 0,3070 e 0,2644, respectivamente.

4.2 Análise de sensibilidade do modelo determinístico

Os resultados da análise de sensibilidade de *FreqR* e *NGer* a variações em *FreqInicial* e *DFRes* correspondentes aos cenários I a III são apresentados nas seções seguintes. As gerações escolhidas para análise de sensibilidade de *FreqR*, de acordo com os resultados do modelo determinístico, são listadas na Tabela 11.

Tabela 11. Gerações da praga alvo utilizadas na análise de sensibilidade de *FreqR* aos parâmetros *FreqInicial* e *DFRes*

Cenário	Parâmetro	Gerações
I	<i>FreqInicial</i>	1, 3, 4, 5, 6 e 15
II	<i>FreqInicial</i>	1, 15, 42, 43, 100 e 367
III	<i>FreqInicial</i>	1, 15, 40, 41, 100 e 292
I	<i>DFRes</i>	1, 2, 3, 4, 5 e 6
II	<i>DFRes</i>	1, 8, 15, 42, 43 e 61
III	<i>DFRes</i>	1, 8, 15, 40, 41 e 61

Os resultados da análise de sensibilidade de $FreqR$ a variações em $FreqInicial$ no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ em seis gerações (Tabela 11) considerando $DFRes$ igual a 0,00101 indicam o mesmo padrão em todos os cenários (Figura 5, Figura 4 e Figura 5). Inicialmente a relação entre $FreqR$ e $FreqInicial$ é quase linear, indicando que variações de mesma magnitude em $FreqInicial$ em qualquer faixa do intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ tem a mesma influência sobre as estimativas de $FreqR$. Ao longo das gerações, o padrão torna-se sigmóide: variações em $FreqInicial$ no início ou fim do intervalo têm menor impacto nas estimativas de $FreqR$ que numa faixa intermediária.

Na geração em que $FreqR$ atinge o valor 0,99 segundo o modelo determinístico, a sensibilidade de $FreqR$ aos valores de $FreqInicial$ é nula. Na geração em que isso ocorre, independente do valor de $FreqInicial$ no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ uma fração superior a 99% da população da praga será constituída de indivíduos resistentes. Mesmo em situações onde há pouca informação sobre $FreqInicial$ é possível estimar o número de gerações em que 99% da população será resistente ($NGer_{max}$), independente do valor desse parâmetro dentro do intervalo considerado. Nos cenários I, II e III, os valores de ($NGer_{max}$) foram 15, 367 e 292, respectivamente (Figura 5, Figura 4 e Figura 5).

No cenário I, observa-se que para $FreqInicial$ igual ao ponto médio do intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$, na geração 3, $FreqR$ é inferior a 0,50 e na geração 4 já ultrapassou esse valor (Figura 3), o que é consistente com o resultado do modelo determinístico para esse mesmo cenário, em que o número de gerações para atingir a frequência crítica é igual a 4. Nos resultados para os demais cenários, essa correspondência se mantém (Figura 4 e Figura 5).

A influência de variações em $FreqInicial$ sobre $NGer$ está caracterizada na Figura 6. Nos três cenários, a sensibilidade apresentou o mesmo padrão, caracterizado pelo decréscimo da sensibilidade ao longo do intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$, descrito pelo seguinte modelo potencial:

$$NGer = \mathbf{a}(FreqInicial)^{-\mathbf{b}} \quad (82)$$

em que \mathbf{a} e \mathbf{b} são parâmetros empíricos do modelo. Os valores de \mathbf{b} para os cenários I, II e III foram 0,2524; 0,4857 e 0,4870, respectivamente, indicando menor de sensibilidade de $NGER$ a $FreqInicial$, em termos absolutos, no cenário com refúgio 0% (Cenário I)

quando comparado aos cenários II e III, que apresentaram níveis de sensibilidade semelhantes.

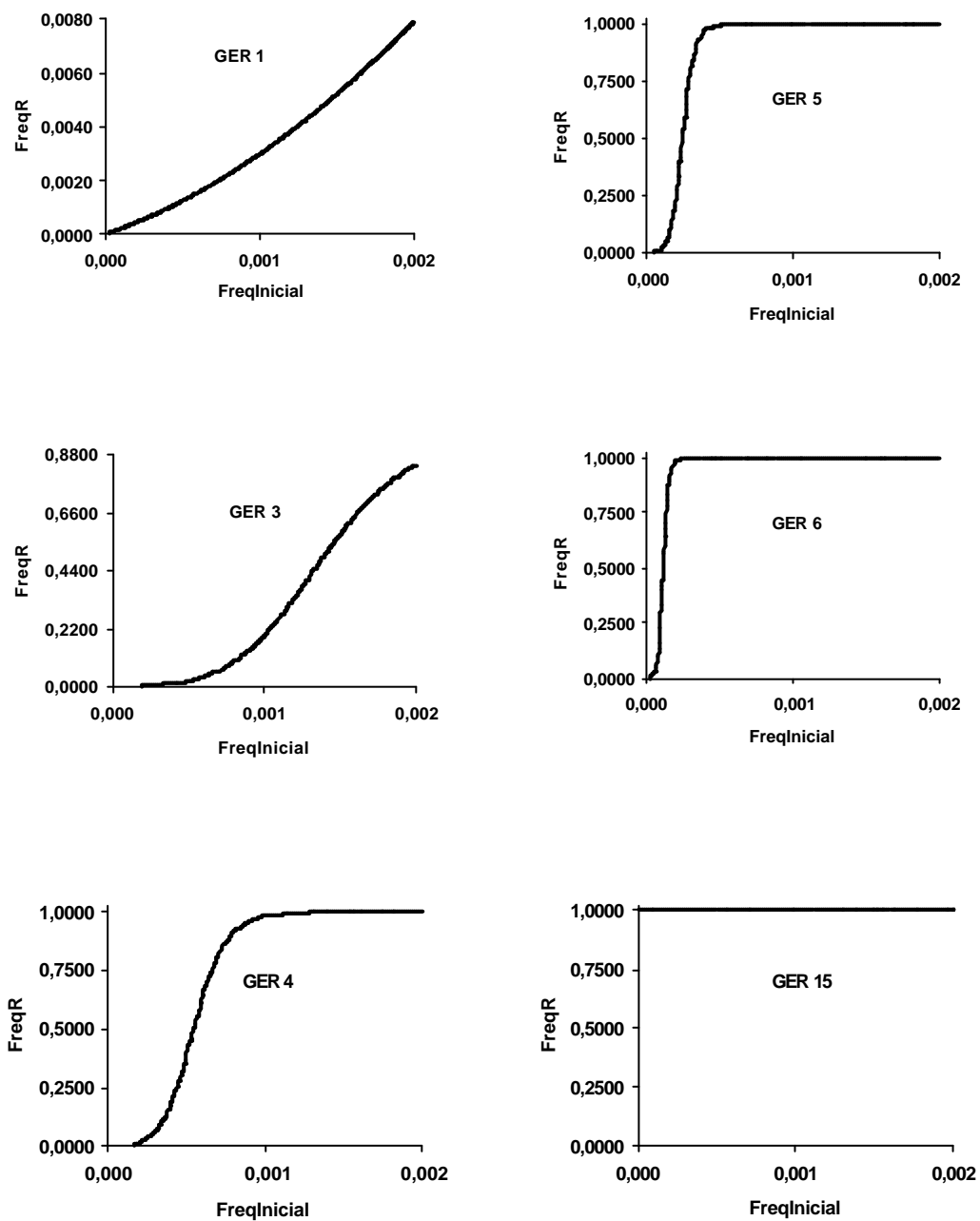


Figura 3 - Sensibilidade da estimativa de *FreqR* a variações de *FreqInicial* no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 3, 4, 5, 6 e 15, no cenário sem área de refúgio

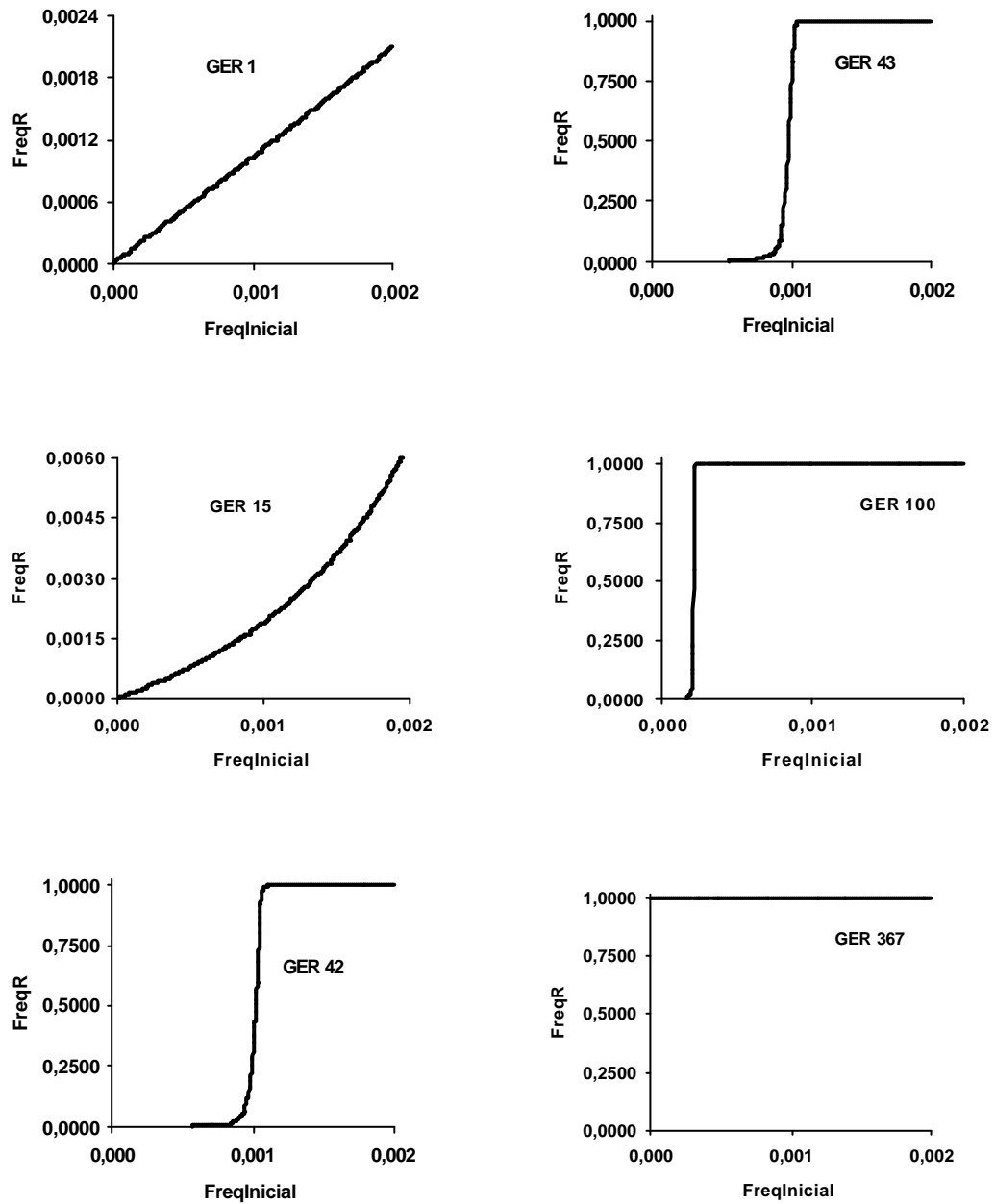


Figura 4 - Sensibilidade da estimativa de *FreqR* a variações de *FreqInicial* no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 15, 42, 43, 100 e 367, no cenário com área de refúgio igual a 5%

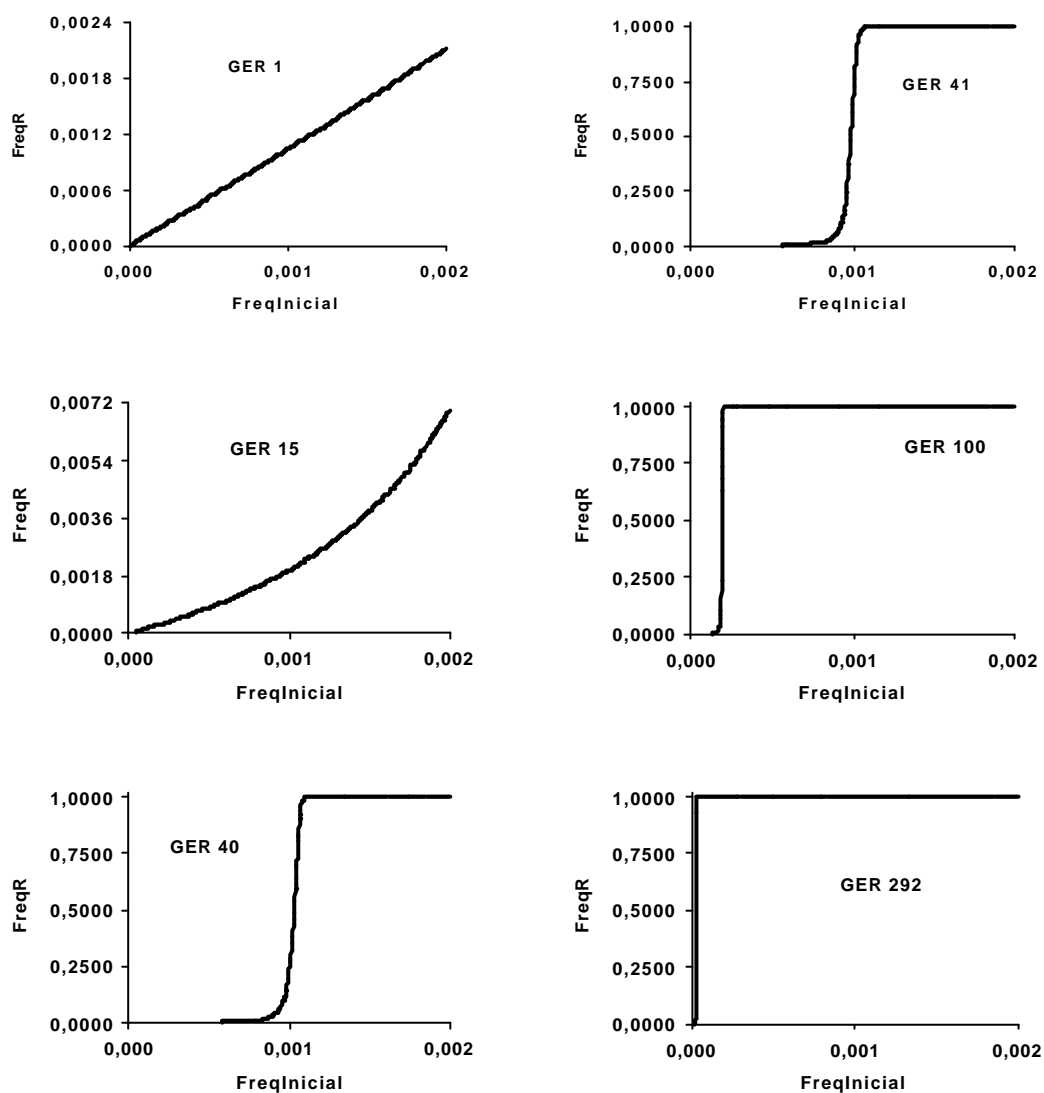


Figura 5 - Sensibilidade da estimativa de $FreqR$ a variações de $FreqInicial$ no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 15, 40, 41, 100 e 292, no cenário com área de refúgio igual a 20%, com aplicação de inseticida

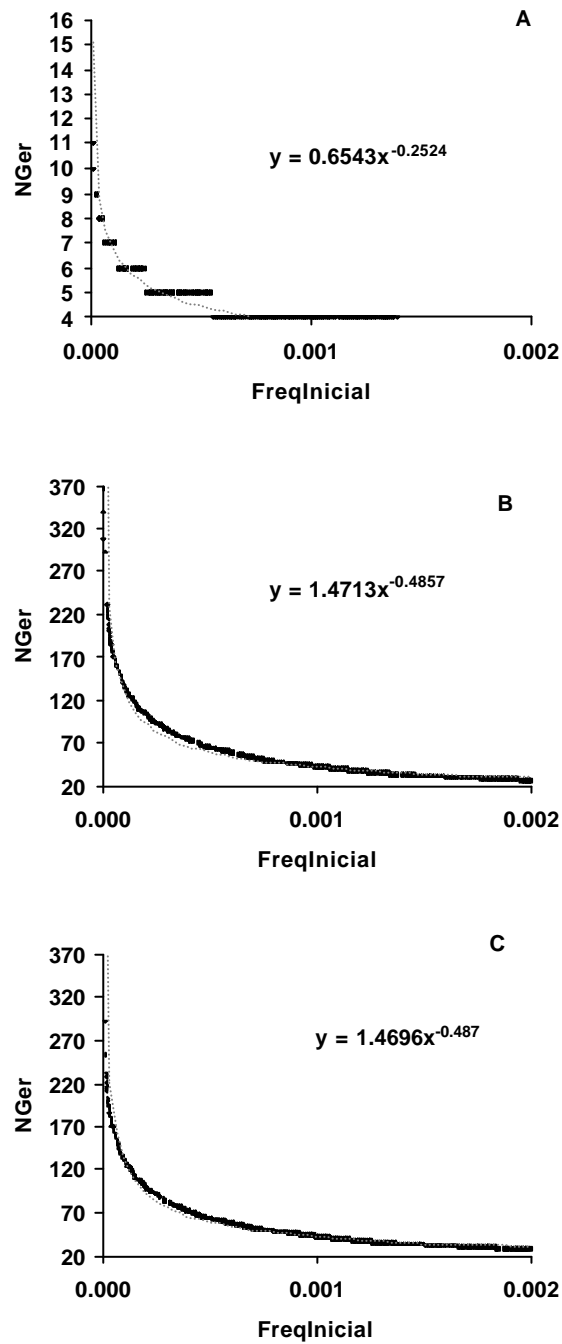


Figura 6 - Sensibilidade da estimativa de N_{Ger} a variações de $Freq_{Inicial}$ no intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ nos cenários sem área de refúgio (A), refúgio de 5% (B) e refúgio de 20% com e aplicação de inseticida

Os valores de sensibilidade relativa média, razão entre a amplitude do intervalo de $NGer$ e a estimativa de $NGer$ obtida utilizando o modelo determinístico ($NGer^*$), foram 2,00; 7,86 e 6,28 para os cenários I, II e III, respectivamente, indicando que também em termos relativos, a sensibilidade de $NGer$ a $FreqInicial$ é menor no cenário I.

A sensibilidade de $FreqR$ a variações em $DFRes$, muda ao longo das gerações, comportamento também observado com relação a $FreqInicial$. No cenário I, os padrões de variação de $FreqR$ diferiram, em algumas gerações, dos padrões observados nos cenários II e III. Nesses cenários, ocorreram padrões lineares seguidos de padrões sigmoidais (Figura 7, Figura 8 e Figura 9), semelhantes aos observados nas curvas de sensibilidade a $FreqInicial$.

Observa-se que $FreqR$ não tende a zero quando $DFRes$ decresce para zero, como ocorre para $FreqInicial$. $DFRes$ nula ocorre quando a mortalidade dos indivíduos SR é igual a dos SS o que não implica em $FreqR$ nula ao longo das gerações.

Tabela 12. Sensibilidade de $NGer$ a variações nos parâmetros $FreqInicial$ e $DFRes$ expressa como a razão entre a amplitude de $NGer$ e a estimativa de $NGer$ obtida utilizando o modelo determinístico ($NGer^*$)

Cenário	Parâmetro	Mínimo	Máximo	Amplitude	$NGer^*$	Sensibilidade relativa média
I	$FreqInicial$.	3	11	8	4	2,00
I	$DFRes$	3	4	1	4	0,25
II	$FreqInicial$.	27	365	338	43	7,86
II	$DFRes$	27	60	33	43	0,767
III	$FreqInicial$.	26	390	364	41	6,280

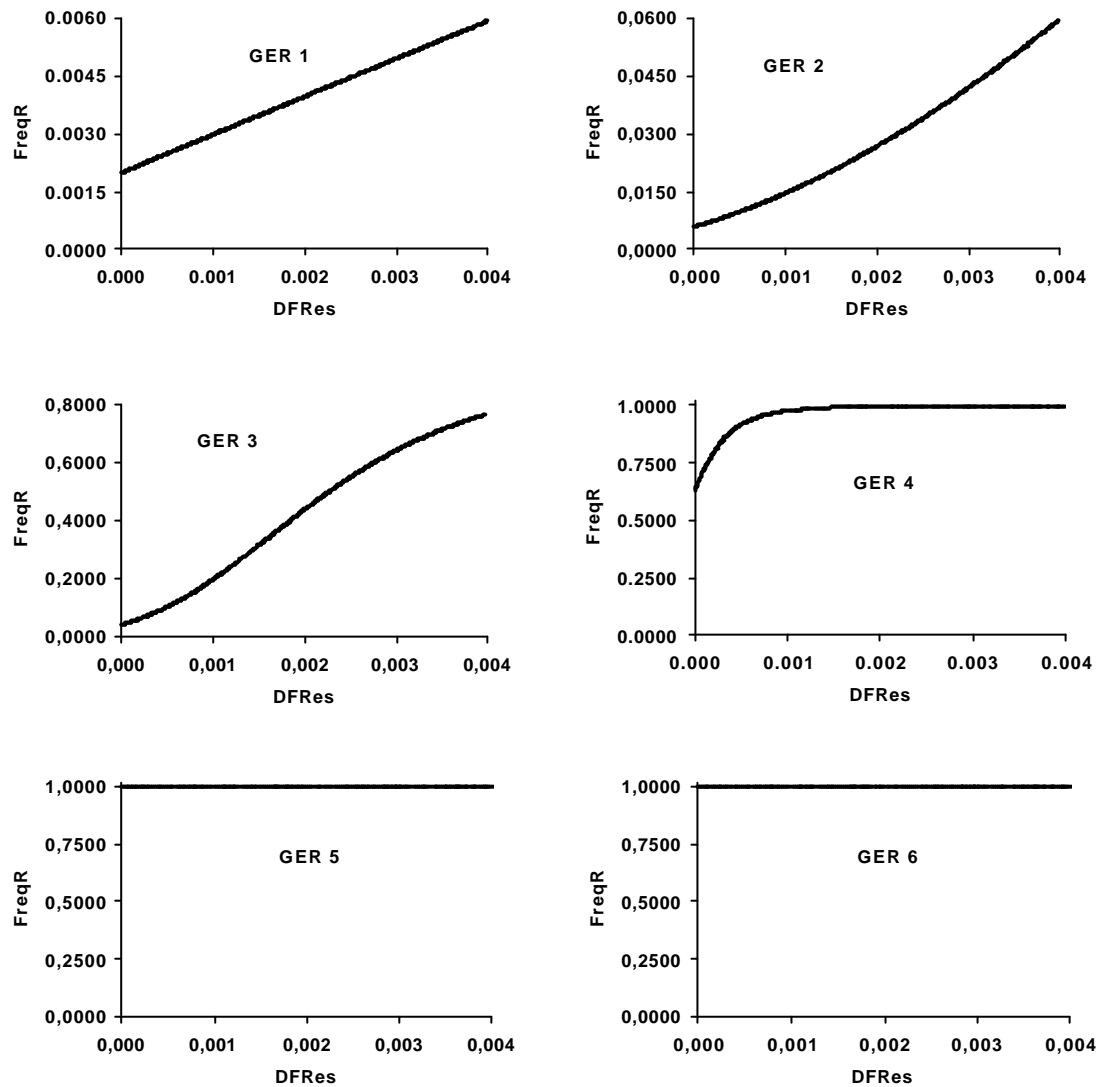


Figura 7 - Sensibilidade da estimativa de $FreqR$ a variações de $DFRes$ no intervalo $(0, 4 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1 a 6, no cenário sem área de refúgio

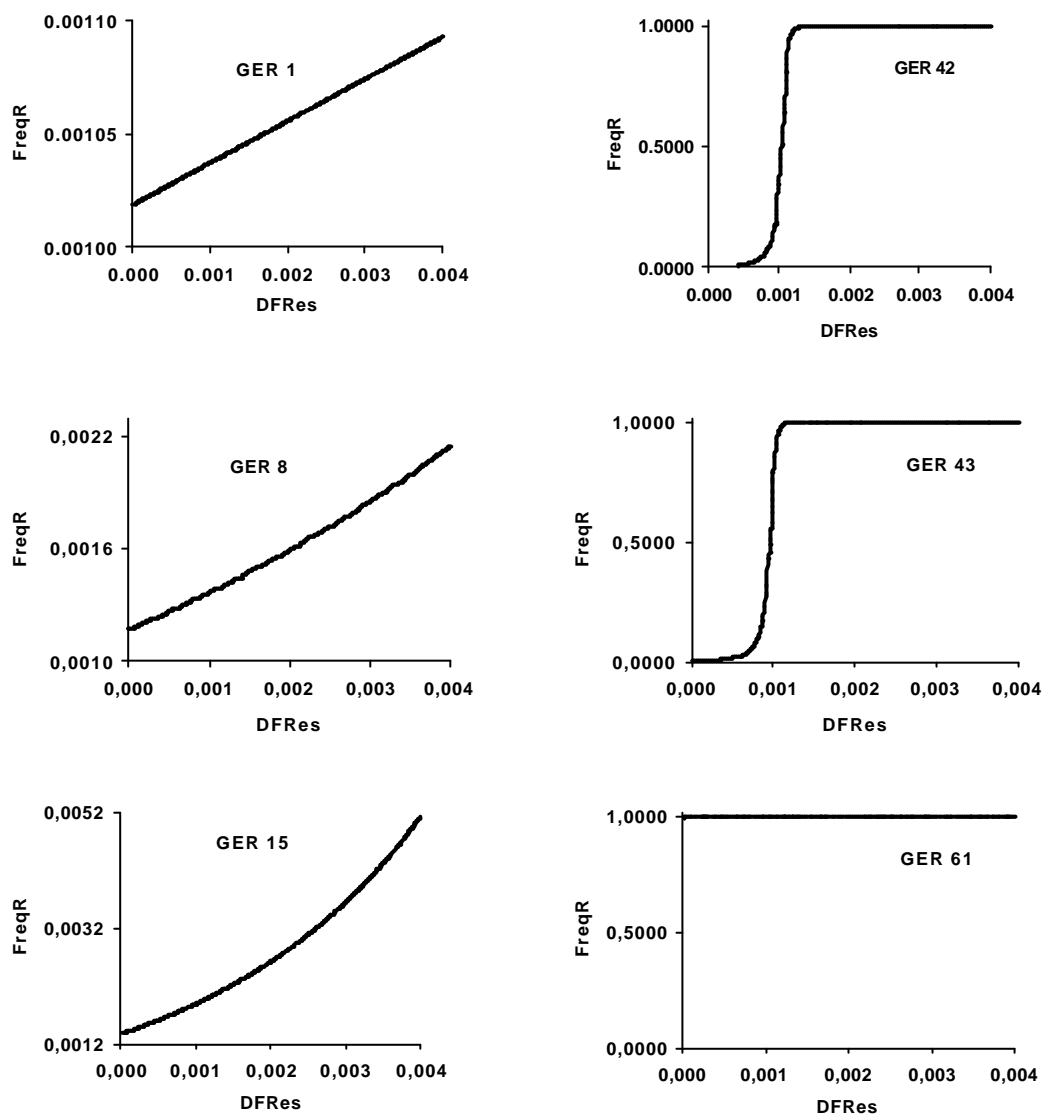


Figura 8 - Sensibilidade da estimativa de $FreqR$ a variações de $DFRes$ no intervalo $(0, 4 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 8, 15, 42, 43 e 61 no cenário com área de refúgio igual a 5%

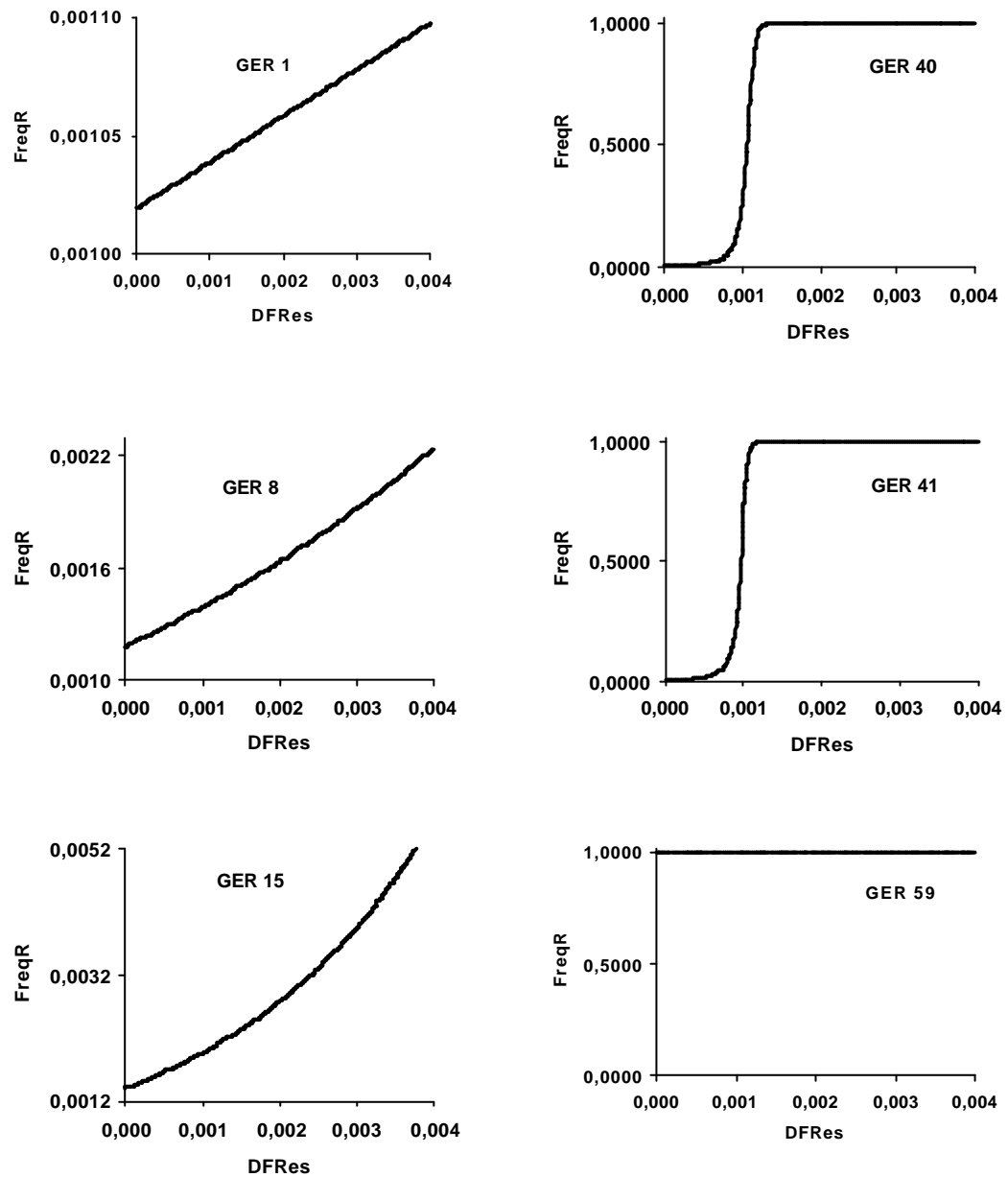


Figura 9 – Sensibilidade da estimativa de $FreqR$ a variações de $DFRes$ no intervalo $(0, 4 \cdot 10^{-3})$ para as gerações 1, 8, 15, 40, 41 e 59, no cenário com área de refúgio igual a 20%, com aplicação de inseticida

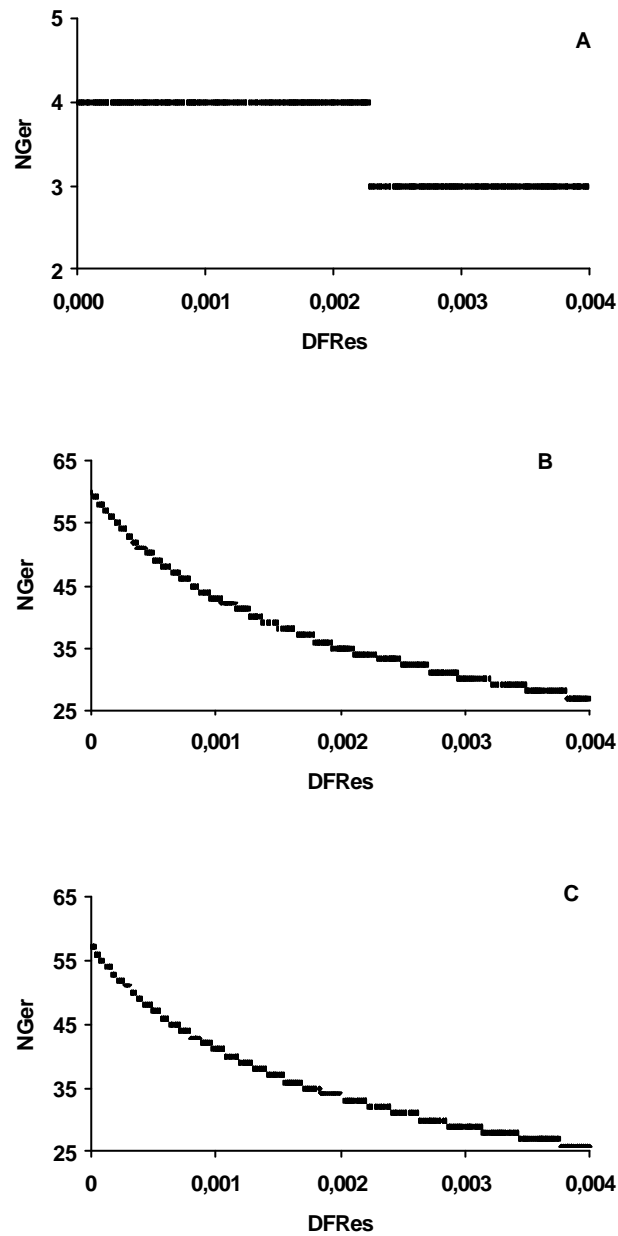


Figura 10 – Sensibilidade da estimativa de $NGer$ a variações no parâmetro dominância funcional da resistência ($DFRes$) no intervalo $(0, 4 \cdot 10^{-3})$ nos cenários sem área de refúgio (A), refúgio de 5% (B) e refúgio de 20% com e aplicação de inseticida (C)

Nos cenários I, II e III, após as gerações 5, 61 e 59, respectivamente, as estimativas de *FreqR* são superiores a 0,99 e não são mais afetadas por variações em *DFres* no intervalo $(0, 4.10^{-3})$.

A sensibilidade de *NGer* a variações em *DFres* nos cenários I, II e II é apresentada na Figura 10. No cenário I, o número de gerações até *FreqR* atingir 0,50 variou apenas de 3 a 4 quando *DFres* variou de 0 a 4.10^{-3} , o que corresponde a um valor de sensibilidade relativa média de 0,25. Em todos os cenários, as sensibilidades relativas médias foram significativamente inferiores às respectivas sensibilidades relativas referentes a *FreqInicial* (Tabela 12), apesar de a amplitude do intervalo de variação estabelecido para *DFres* $(0, 4.10^{-3})$ ser o dobro da amplitude do intervalo para *FreqInicial* $(0, 2.10^{-3})$.

A análise de sensibilidade do modelo determinístico mostrou que as estimativas da frequência do alelo *R* e de *NGer* têm maior sensibilidade a variações nos valores de *FreqInicial* que a variações em *DFres*, considerando os intervalos de valores possíveis estabelecidos para esses parâmetros. Assim, a incorporação de incerteza ao modelo foi feita tratando o parâmetro *FreqInicial* como variável aleatória.

4.3 Valores simulados do parâmetro frequência inicial do alelo R

A caracterização da incerteza associada ao parâmetro *FreqInicial*, representada por diferentes distribuições de probabilidade, é apresentada na Figura 11. Os valores mínimo e máximo, média e variância das distribuições empíricas de *FreqInicial* são apresentados na Tabela 13; os percentis, na Tabela 14.

Tabela 13. Valores mínimo e máximo, média e variância das distribuições empíricas: Uniforme: UN(a,b), Triangular simétrica TS(a,b) e Normal truncada simétrica NTS(a, b, μ , σ^2) de *FreqInicial* obtidas com uma amostra de 1000 valores das respectivas distribuições teóricas (Tabela 8)

Distribuição	Amostra ¹	Mínimo (a) (x 10 ⁻³)	Máximo (b) (x 10 ⁻³)	Média (μ) (x 10 ⁻³)	Variância (σ^2) (x 10 ⁻⁶)
UN	1	0,0007	1,9979	0,9795	0,3333
UN	2	0,0023	1,9969	0,9885	0,3333
UN	3	0,0001	2,0000	0,9896	0,3410
TS	1	0,0789	1,9316	1,0205	0,1640
TS	2	0,0279	1,9847	0,9829	0,1720
TS	3	0,0536	1,9848	1,0115	0,1670
NTS	1	0,0291	1,9590	1,0066	0,1410
NTS	2	0,0129	1,9996	0,9835	0,1510
NTS	3	0,0226	2,000	0,9953	0,1440

¹ Amostras das distribuições de *FreqInicial* geradas para os cenários com refúgio 0% (I), 5 % (II) e 20 % (III).

Na distribuição Uniforme, devido às altas probabilidade associada aos extremos, quando comparadas às outras distribuições, o mínimo obtido nos conjunto de valores simulados foi inferior aos demais e o máximo, superior. As variâncias das amostras da distribuição Normal truncada foram inferiores às das correspondente distribuições não truncadas. As médias das amostras da distribuição Normal truncada foram similares ao valor teórico da Normal não truncada pelo fato de o truncamento ser bilateral simétrico.

Tabela 14. Percentis das distribuições empíricas de *FreqInicial* (%) construídas com os n=1000 valores amostrados das distribuições Uniforme (UN), Triangular simétrica (TS) e Normal Truncada Simétrica (NTS)

Probabilidade (%)	Amostra ¹	Percentis da distribuição de <i>FreqInicial</i> ($\times 10^{-3}$)		
		UN	TS	NTS
5	1	0,0985	0,3444	0,3876
5	2	0,1051	0,3130	0,3332
5	3	0,0861	0,3377	0,3804
25	1	0,4693	0,7250	0,7228
25	2	0,5095	0,6772	0,7211
25	3	0,4748	0,7063	0,7244
50	1	0,9875	1,0113	1,0010
50	2	0,9693	0,9815	0,9873
50	3	1,0070	1,006	0,9900
75	1	1,4678	1,3182	1,2704
75	2	1,2374	1,2698	1,2374
75	3	1,5021	1,3015	1,2542
95	1	1,8938	1,6874	1,6448
95	2	1,8892	1,7044	1,6199
95	3	1,8912	1,6811	1,6285

¹ Amostras das distribuições de probabilidade de *FreqInicial* geradas para os cenários com refúgio 0% (I), 5% (II) e 20% (III).

Observa-se que os valores de média e variância das distribuições empíricas nas três amostras apresentaram os padrões esperados: (i) médias similares para todas as distribuições, (ii) variâncias na distribuição uniforme com o dobro da magnitude das variâncias na distribuição triangular e (iii) variâncias na distribuição Normal truncada inferiores às variâncias na distribuição triangular (Tabela 13).

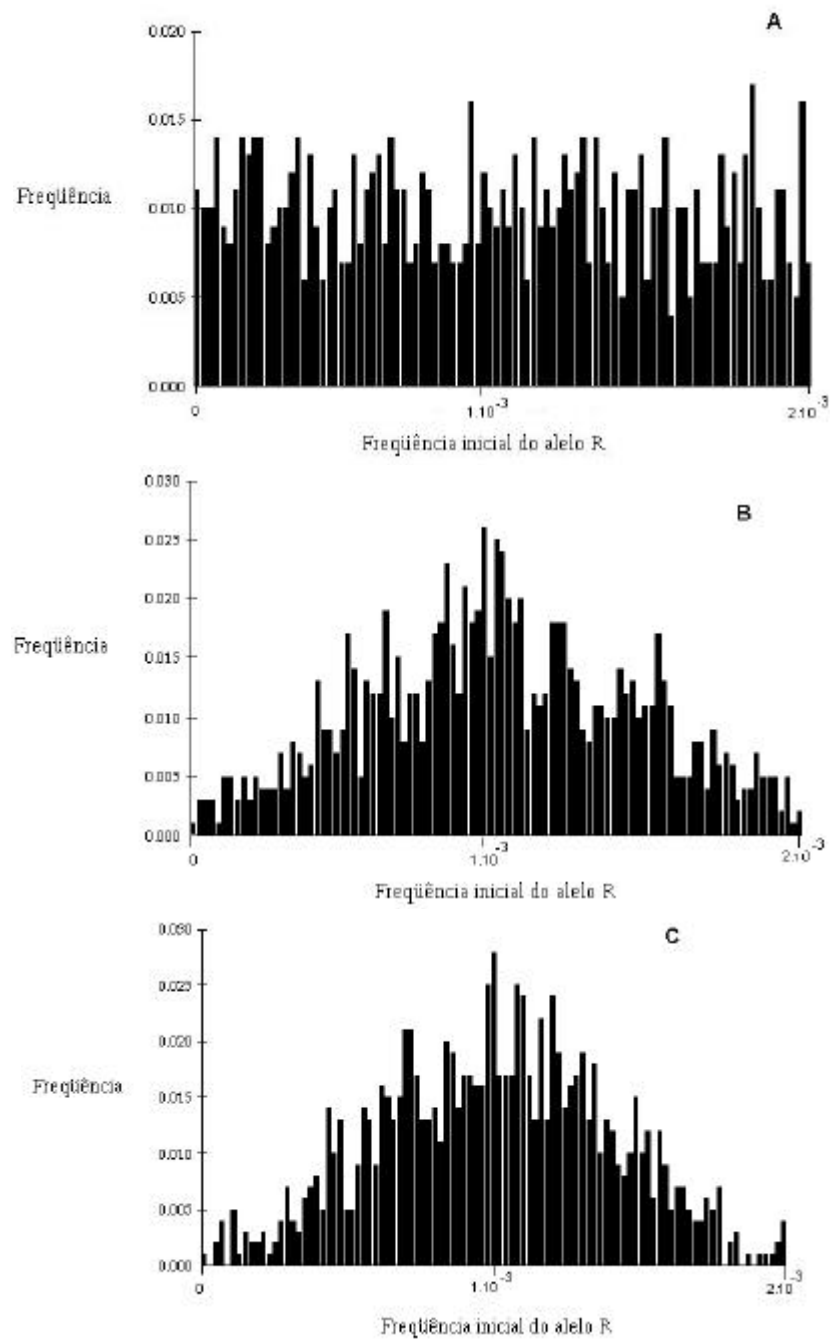


Figura 11 - Distribuições empíricas construídas com os valores amostrados das distribuições Uniforme (A), Triangular simétrica (B) e Normal truncada simétrica (C) utilizadas para caracterizar a incerteza associada à frequência inicial do alelo R na população da praga alvo

4.4 Evolução da resistência ao longo das gerações

Os resultados das simulações da evolução da resistência no cenário sem área de refúgio, considerando as distribuições Uniforme, Triangular simétrica e Normal truncada simétrica utilizadas para caracterizar a incerteza de *FreqInicial*, representados pelas respectivas distribuições empíricas da frequência do alelo *R* ao final de quatro gerações selecionadas, são apresentados a seguir (Figura 12, Figura 13 e Figura 14). Estatísticas descritivas que caracterizam essas distribuições são apresentadas na Tabela 13.

Nos três cenários, os percentis 5 e 25 da distribuição uniforme foram sempre inferiores aos percentis correspondentes das distribuições triangular simétrica e normal truncada simétrica; para os percentis 75 e 95 ocorreu o inverso, exceto nos casos em que o percentil em questão vale 1. Esse padrão é explicado pelo fato de a distribuição uniforme atribuir altos pesos a valores extremos (Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17).

As medianas (percentil 50) das três distribuições apresentaram a mesma ordem de magnitude em função de as distribuições serem simétricas e apresentarem o mesmo domínio (Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17).

No cenário sem refúgio, para todas as distribuições de *FreqInicial* consideradas, observa-se que na geração 3, a porcentagem de valores simulados de *FreqR* inferiores à frequência crítica de 50% é maior que a de valores superiores. Na geração 4, ocorre o inverso (Figura 12, Figura 13 e Figura 14). Nesse cenário, a geração 4 corresponde à geração na qual a frequência crítica é atingida na simulação utilizando o modelo determinístico (NGer*). Nos outros cenários essa transição também ocorre entre a geração anterior a NGer* e NGer*, conforme indicam as medianas de tais gerações (Tabela 15, Tabela 16 e Tabela 17). Assim, o risco de resistência é sempre inferior a 0,50 nas gerações anteriores a NGer* e superior a 50% para as gerações subsequentes.

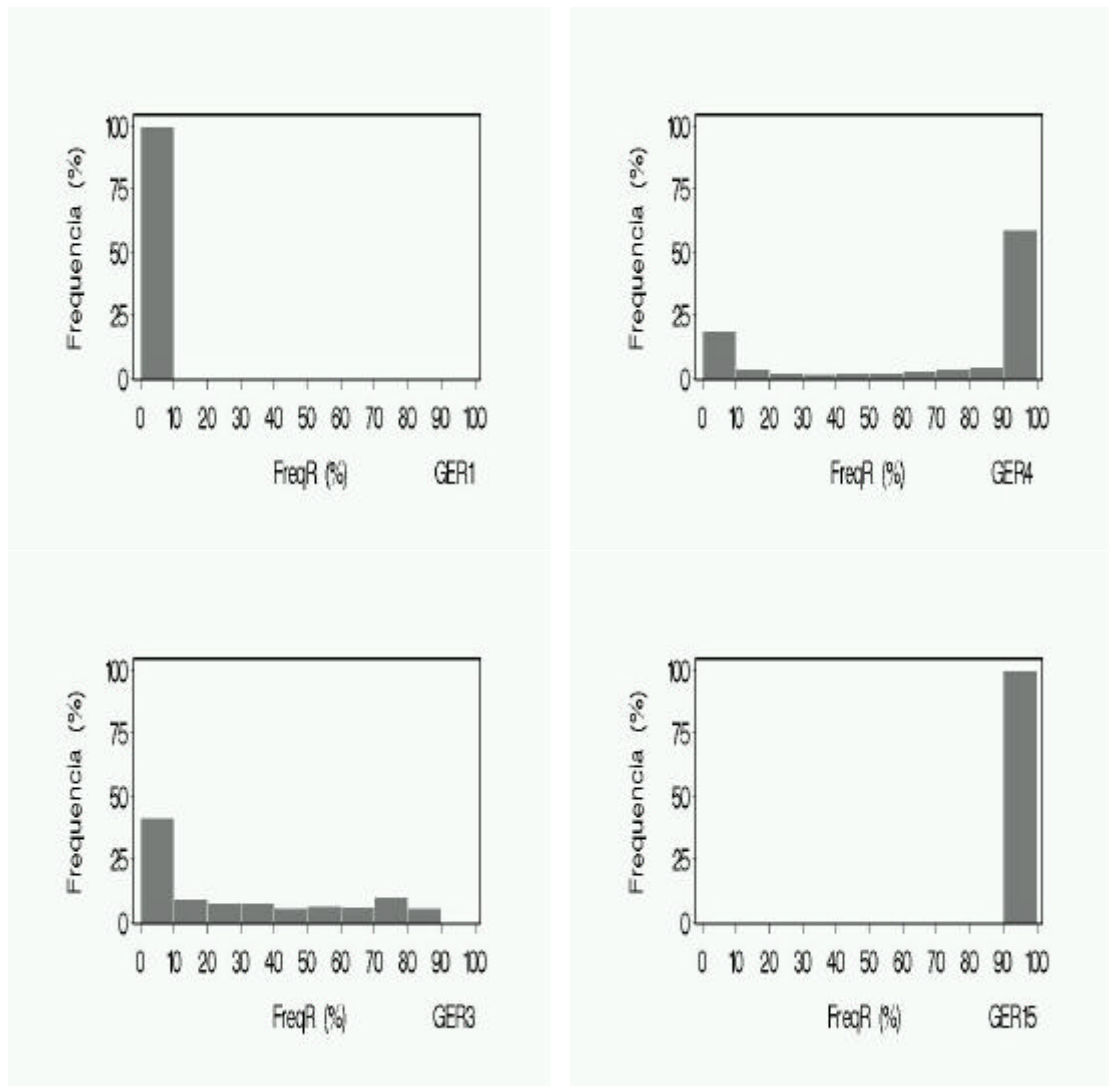


Figura 12 - Distribuições empíricas de *FreqR* ao longo das gerações 1, 3, 4 e 15, referentes ao cenário sem refúgio construídas a partir de uma amostra de 1000 valores da distribuição Uniforme $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ para *FreqInicial*

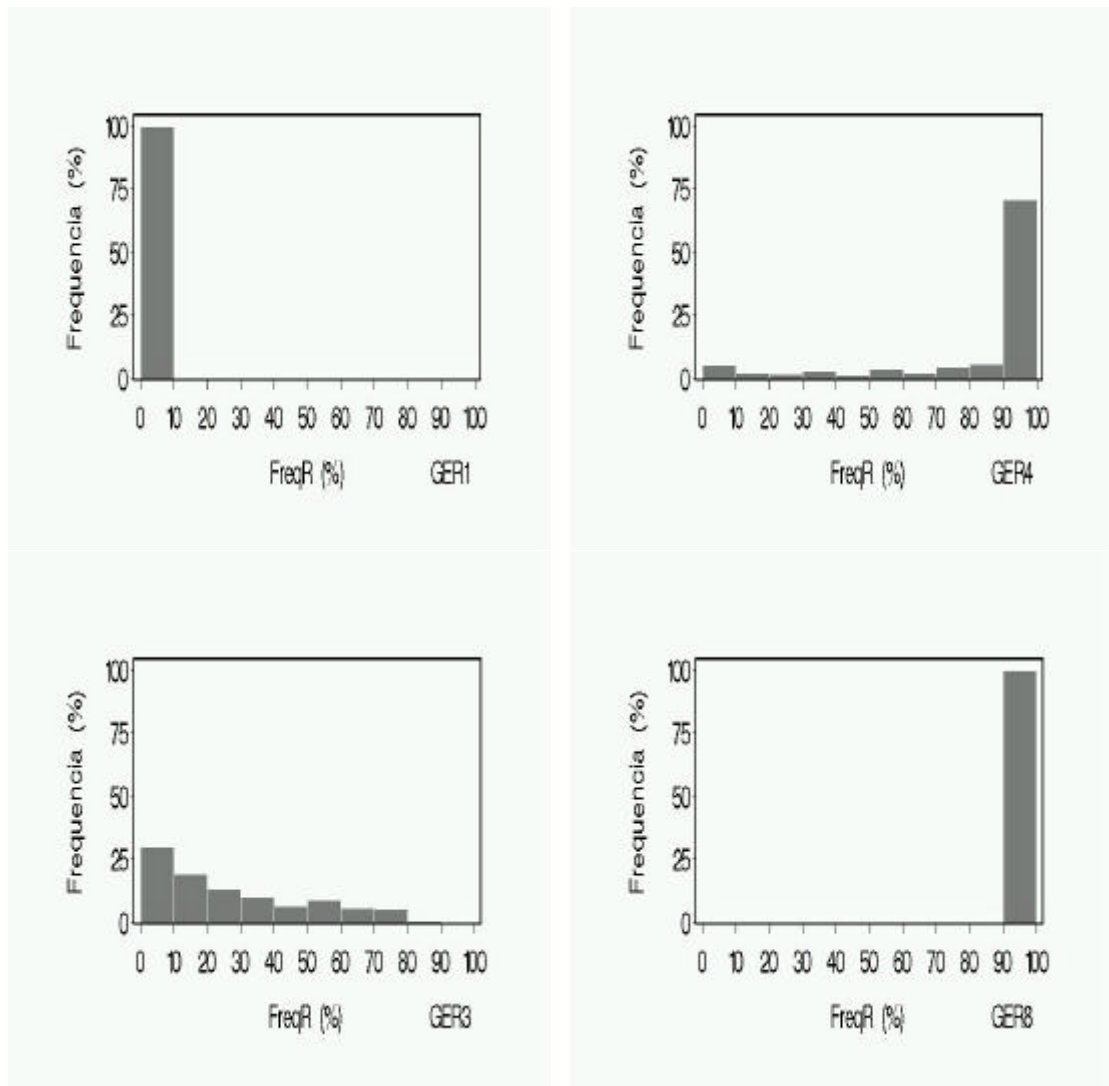


Figura 13 - Distribuições empíricas de *FreqR* ao longo das gerações 1, 3, 4 e 8 referentes ao cenário sem refúgio construídas a partir de uma amostra de 1000 valores da distribuição Triangular simétrica $(0, 2 \cdot 10^3)$ para *FreqInicial*

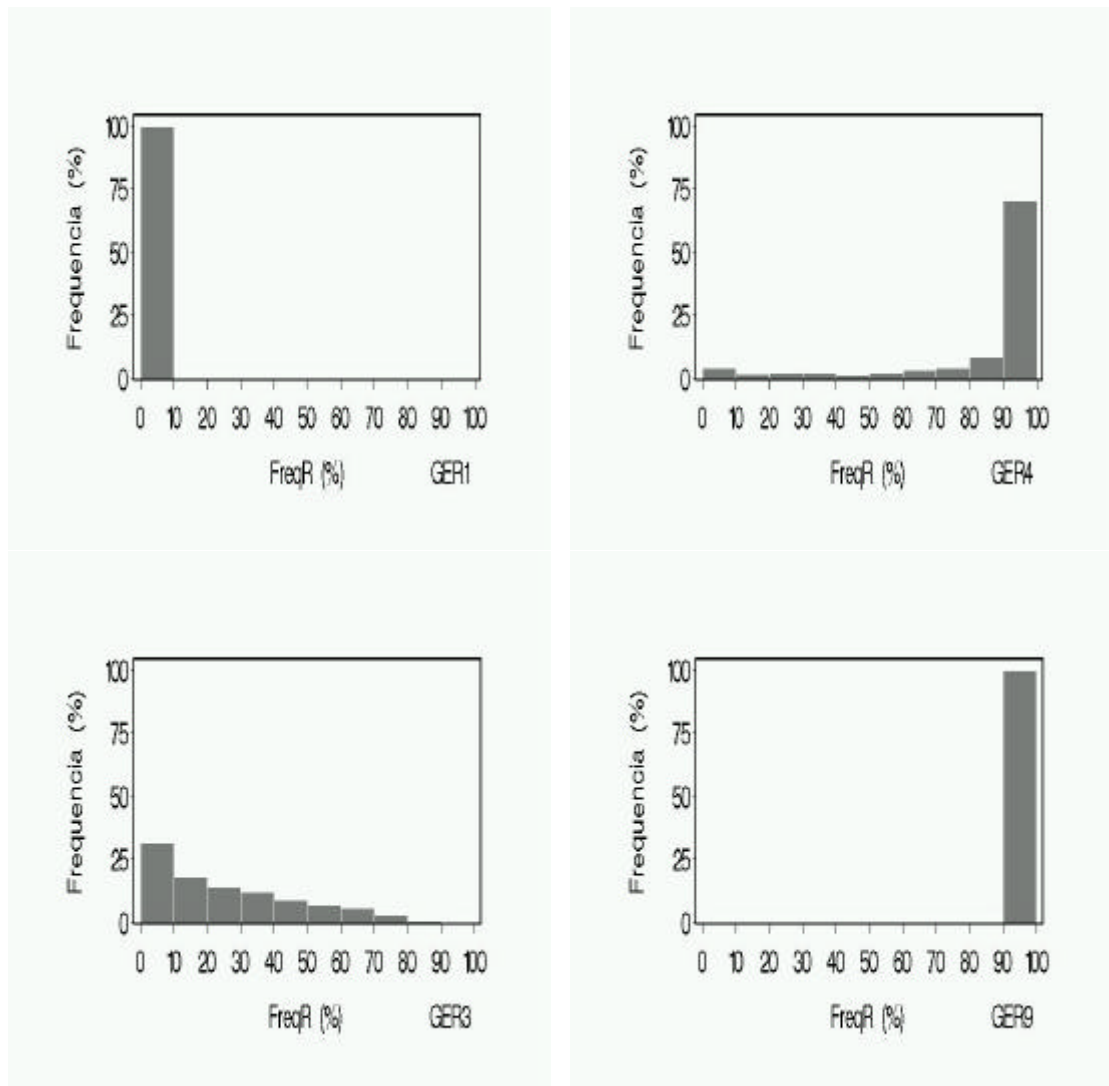


Figura 14 - Distribuições empíricas de *FreqR* ao longo das gerações 1, 3, 4 e 9 referentes ao cenário sem refúgio construídas a partir de uma amostra de 1000 valores da distribuição Normal truncada simétrica ($1 \cdot 10^{-3}$, $0,1453 \cdot 10^{-6}$, 0, $2 \cdot 10^{-3}$) para *FreqInicial*

Tabela 15. Percentis 5, 25, 50, 75 e 95% das distribuições de *FreqR*, para as gerações 1, 3, 4 e 8 da praga alvo, correspondentes às distribuições Uniforme, Triangular simétrica e Normal Truncada Simétrica, em cenários sem área de refúgio

Distribuição	Geração	Probabilidades (%)				
		5	25	50	75	95
Uniforme	1	0,0002	0,0016	0,0029	0,0051	0,0073
Uniforme	3	0,0011	0,0201	0,1887	0,5564	0,8055
Uniforme	4	0,0035	0,3067	0,9738	0,9978	0,9995
Uniforme	8	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Triangular simétrica	1	0,0008	0,0020	0,0030	0,0043	0,0063
Triangular simétrica	3	0,0095	0,0703	0,2035	0,4364	0,7160
Triangular simétrica	4	0,0985	0,8359	0,9775	0,9958	0,9990
Triangular simétrica	8	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Normal truncada simétrica	1	0,0009	0,0020	0,0030	0,0041	0,0058
Normal truncada simétrica	3	0,0125	0,0710	0,2025	0,3971	0,6646
Normal truncada simétrica	4	0,1527	0,8388	0,9773	0,9947	0,9987
Normal truncada simétrica	8	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Tabela 16. Percentis 5, 25, 50, 75 e 95% das distribuições de *FreqR*, para as gerações 15, 42, 43 e 203 da praga alvo, correspondentes às distribuições Uniforme, Triangular simétrica e Normal Truncada Simétrica, em cenários com área de refúgio de 5%, sem aplicação de inseticida

Distribuição	Geração	Probabilidades (%)				
		5	25	50	75	95
Uniforme	15	0,0001	0,0008	0,0018	0,0035	0,0056
Uniforme	42	0,0002	0,0026	0,1349	1,0000	1,0000
Uniforme	43	0,0003	0,0027	0,3539	1,0000	1,0000
Uniforme	203	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Triangular simétrica	15	0,0005	0,0011	0,0018	0,0027	0,0045
Triangular simétrica	42	0,0010	0,0058	0,1835	1,0000	1,0000
Triangular simétrica	43	0,0011	0,0065	0,4984	1,0000	1,0000
Triangular simétrica	203	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Normal truncada simétrica	15	0,0005	0,0012	0,0019	0,0026	0,0042
Normal truncada simétrica	42	0,0012	0,0075	0,2147	1,0000	1,0000
Normal truncada simétrica	43	0,0012	0,0086	0,5770	1,0000	1,0000
Normal truncada simétrica	203	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Tabela 17. Percentis 0, 25, 50, 75 e 95% das distribuições de *FreqInicial*, para as gerações 5, 7, 9 e 11 da praga alvo, correspondentes às distribuições Uniforme, Triangular simétrica e Normal Truncada Simétrica em cenários com área de refúgio de 20%, com aplicação de inseticida

Distribuição	Geração	Probabilidades (%)				
		5	25	50	75	95
Uniforme	15	0,0001	0,0007	0,0020	0,0038	0,0061
Uniforme	40	0,0002	0,0022	0,3187	1,0000	1,0000
Uniforme	41	0,0002	0,0023	0,7712	1,0000	1,0000
Uniforme	161	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Triangular simétrica	15	0,0005	0,0012	0,0020	0,0030	0,0047
Triangular simétrica	40	0,0012	0,0068	0,3096	1,0000	1,0000
Triangular simétrica	41	0,0012	0,0078	0,7593	1,0000	1,0000
Triangular simétrica	161	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Normal truncada simétrica	15	0,0006	0,0013	0,0019	0,0028	0,0044
Normal truncada simétrica	40	0,0014	0,0076	0,2021	1,0000	1,0000
Normal truncada simétrica	41	0,0015	0,0089	0,5565	1,0000	1,0000
Normal truncada simétrica	161	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

4.5 Estimativas de risco de resistência em diferentes cenários

As curvas que descrevem o risco de resistência ao longo das gerações da praga alvo para os cenários I, II e III, considerando distribuições Uniforme (UN), Triangular simétrica (TS) e Normal truncada simétrica (NTS), são apresentadas na Figura 15. Observa-se que as curvas para as distribuições Triangular simétrica e Normal são quase coincidentes. Quando se considera a distribuição Uniforme, o risco é superior ao estimado considerando as outras distribuições até a geração $NGer^*$. Para as gerações subsequentes a relação se inverte.

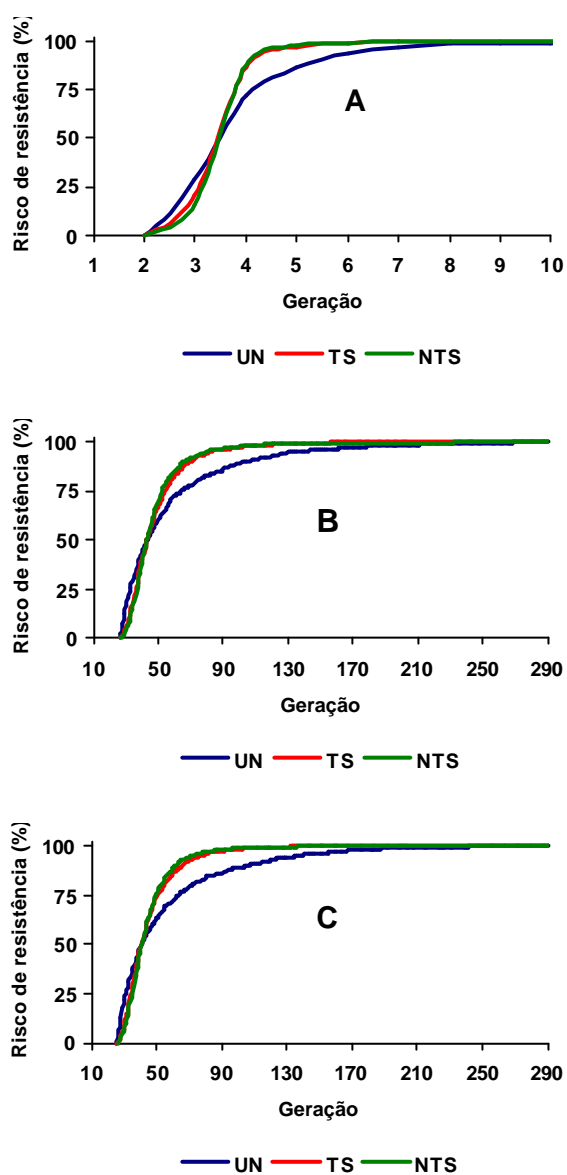


Figura 15 - Risco de resistência à toxina Bt expressa em culturas transgênicas na população de uma praga alvo, em função do número de gerações da praga, para 0 (A), 5% (B) e 20% (C) de área de refúgio, considerando as diferentes distribuições para caracterizar a incerteza de *FreqInicial*: Uniforme (UN), Triangular simétrica (TS) e Normal truncada simétrica (NTS)

Na distribuição Uniforme, a probabilidade associada aos valores extremos superiores do intervalo $(0, 2 \cdot 10^{-3})$ de valores possíveis estabelecido para *FreqInicial* é maior que na Normal truncada simétrica ou Triangular simétrica. Isso resulta em maior proporção de valores extremos na amostra de mil valores de *FreqInicial* utilizada na análise de incertezas.

A frequência crítica é atingida em poucas gerações nas simulações correspondentes aos valores extremos superiores de *FreqInicial*. Isso implica em maior proporção de valores *FreqR* superiores à frequência crítica e conseqüentemente maior risco de resistência nas gerações iniciais quando a distribuição uniforme é utilizada. Por outro lado, a maior porcentagem de valores extremos inferiores na amostra de valores da distribuição Uniforme resulta em estimativas de risco inferiores às obtidas quando se utilizam as distribuições Normal truncada simétrica ou Triangular simétrica, nas gerações subseqüentes a *NGer**. A partir da geração em que *FreqR* é superior a 0,99 na simulação considerando a distribuição Uniforme, todas as estimativas de risco têm a mesma magnitude.

4.6 Considerações finais

Em situações em que o objetivo é a obtenção de estimativas de risco, o tipo de distribuição que caracteriza a incerteza associada aos parâmetros dos modelos é fundamental, pois as probabilidades associadas a valores extremos influenciam fortemente as estimativas de risco. Parâmetros caracterizados por distribuições com medidas de tendência central similares, mas diferentes formas, podem resultar em estimativas de risco muito diversas.

Uma relevante característica dessa abordagem é que a incerteza associada a um determinado parâmetro pode ser feita com base na informação de especialistas. A evolução do conhecimento sobre os parâmetros do modelo pode ser incorporada, alterando-se as funções de distribuição de probabilidade que os caracterizam. Isso é particularmente importante na avaliação de risco da resistência a toxinas Bt onde há escassez de resultados experimentais sobre os parâmetros genéticos e bioecológicos da maioria das pragas alvo.

A abordagem aqui apresentada permite a obtenção de estimativas de risco, o que não é possível com o mero uso de modelos determinísticos. Essas estimativas são expressas como a probabilidade de $FreqR$ exceder uma frequência crítica, ao invés de informar apenas o valor médio de $FreqR$. Utilizando esse conjunto de ferramentas, estratégias de manejo da resistência podem ser definidas buscando minimizar o risco de evolução da resistência.

5 CONCLUSÕES

As estimativas do risco de resistência, considerando a distribuição Normal para *FreqInicial*, são similares às aquelas considerando a distribuição Triangular quando as referidas distribuições têm a mesma variância.

O uso da distribuição Uniforme, ao invés da Normal ou Triangular em função da falta de informação sobre *FreqInicial*, leva à superestimação das estimativas de risco de resistência nas gerações iniciais e subestimação nas gerações subsequentes à geração na qual a frequência crítica é atingida.

A análise de sensibilidade de *FreqR* a variações nos parâmetros *FreqInicial* ou *DFRes* possibilita estimar a geração a partir da qual a estimativa de *FreqR* independe da variação do parâmetro em questão dentro de um intervalo de valores possíveis preestabelecido.

A análise de incertezas possibilita estimar, para diferentes cenários, a geração da praga alvo a partir da qual o risco de resistência é superior a 0,99, independentemente da distribuição utilizada para caracterizar a incerteza associada a *FreqInicial*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSSOM, M. Uncertainty in quantitative risk analysis – characterization and methods of treatment. Lund: Lund University, 2002. (Report n. 1024).
- ALSTAD, D.N; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, v.268, p.1894-1896, 1995.
- 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.
- ANDOW, D.A.; HUTCHISON, W.D. Bt-corn resistance management. In: MELLON; M.; RISSLER J. (Ed.). **Now or never: serious new plans to save a natural pest control**. Cambridge: Union of Concerned Scientists, 1998. p.18-64.
- ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N.; PANG, Y.H.; BOLIN, P.C.; HUTCHISON, W.D. Using an F2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p.579-584, 1998.
- ASANT-DUAH, K. D. P. **Risk Assessment in Environmental Management**. Baffins Lane: Wiley, 1998. p.68-78.
- BECK, S.D. Developmental and seasonal biology of *Ostrinia nubilalis*. **Agricultural Zoology Review**, v.2, p.59-96, 1987.
- BOURGUET, D.; RAYMOND, M. The molecular basis of dominance relationships. The case of some recent adaptative genes. **Journal of Evolucionary Biology**, v.11, p. 103-122, 1998.

- BOURGUET, D.; GENISSEL, A.; RAYMOND, M. Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.6, p.1588-1595, 2000.
- BOURGUET, D.; CHAUFaux, J.; SÉGUIN, M.; BUISSON, C.; HINTON, J.L.; STODOLA, T.J.; PORTER, P.; CRONHOLM, G.; BUSCHMAN, L.L.; ANDOW, D.A. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1225-1233, 2003.
- BROWN, D; ROTHERY, P. **Models in biology: mathematics, statistics and computing**. Baffins Lane: Wiley, 1993. p.1-9.
- BURGMAN, M. A. Subjective judgements, model-based predictions and risk analysis for genetically modified organisms. 2000.
http://www.ento.csiro.au/research/weedmgmt/Weeds-symposium/Weeds_symposium_Burgman.pdf. (15 mai. 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, 1998.
- CAPRIO, M.A. **Non random mating model** 1998.
http://www.msstate.edu/Entomology/PgJava/ILSI_model.html. (10 jun. 2001).
- CAPRIO, M.A. Source-sink dynamics between transgenic and non-transgenic habitats and their role in the evolution of resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.94, n.3, p.698-705, 2001.
- CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Gene flow accelerates local adaption among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.85, n.3, p.611-620, 1992.
- COMINS, H.N. The development of insecticide resistance in the presence of migration. **Journal of Theoretical Biology**, v.64, p.177-197, 1997.
- COVELLO, V. T.; MUMPOWER, J. Risk analysis and risk management: an historical perspective. **Risk analysis**, v.5, p.103-120, 1985.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS, 1995, 45p.(EMBRAPA/CNPMS, Circular Técnica, 21).

- DENOLF, P.; JANSENS, S.; PERFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1828-1837, 1993.
- DEEGAN, D. New corn pest control approved by EPA can led to reduced pesticide use. 2003. www.epa.gov/cgi-bin/epaprintonly.cgi. (19 mar. 2003)
- ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Bt Plant-pesticides biopesticides registration action document**, Washington: USEPA, 2001a. 141p.
- ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Final report of the FIFRA scientific advisory meeting**. Arlington: USEPA, 2001b. 78p.
- FALCONER, D.S; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 5. ed. New York: Longman, 1996. 464p.
- FEDERAL INSECTICIDE, FUNGICIDE AND RODENTICIDE ACT SCIENTIFIC ADVISORY PANEL. **Subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant pesticides**; final report, Arlington, 1998. 60p. (Transmittal Docket no. OPDS-00231).
- FEDERAL INSECTICIDE, FUNGICIDE AND RODENTICIDE ACT SCIENTIFIC ADVISORY PANEL. **Sets of scientific issues being considered by the environmental protection agency regarding: Bt plant-pesticides risk and benefit assessments**; final report, Arlington, 2000. 78p.(SAP Report no. 2000-07, March 2001).
- FREY, H. C.; BURMASTER, D. E. Methods for characterizing variability and uncertainty: comparison of bootstrap simulation and likelihood based approaches. **Risk analysis**, v.19, n.1, p.109-130, 1999.
- FRESCO, L.O. Genetically modified organisms in food and agriculture: where are we? Where are we going? In: CONFERENCE ON CROP AND FOREST BIOTECHNOLOGY FOR THE FUTURE, Falkenberg, 2001. **Proceedings**. Falkenberg: Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry, 2001. <http://www.fao.org/ag/magazine/GMOs.pdf>. (13 abr. 2003)

- FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology** v.19, p.227-276, 1999.
- GEORGHIOU, G.; TAYLOR, C. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.70, p.319-323, 1977.
- GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETANTIONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins.. **Annual Review of Entomology**, v.37, p.615-636, 1992.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. New York: John Wiley, 2000. 368p.
- GORE, J.; LEONARD, B.R.; ADAMCZYK, J.J. Survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) in 'Bollgard' and 'Bollgard II' cotton flower bud and flower components. **Journal of Economic Entomology**, v.94, n.6, p.1445-1451, 2001.
- GOULD, F. Simulation models for predicting durability of insect resistant germ plasm: Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae)-resistant winter wheat. **Environmental Entomology**, v.15, p.11-23, 1986.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.701-726, 1998.
- GOULD, F.; TABASHNIK, B. Bt-cotton resistance management. In: MELLON, M.; RISSLER, J. (Ed.). **Now or never: serious new plans to save a natural pest control**. Cambridge: Union of Concerned Scientists, 1998. p.18-64.
- GOULD, F. ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D. HECKEL, D. G. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p.3529-3523, 1997.
- GROETERS, F.R.; TABASHNIK, B.E. Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.6, p.1580-1587, 2000.

- GUSE, C.A.; ONSTAD, D.W.; BUSCHMAN, L.L.; PORTER, P.; HIGGINS, R.A.; SLODERBECK, P. E.; CRONHOLM, G. B.; PEAIRS, F. B. Modeling the development of resistance by stalk-boring Lepidoptera (Crambidae) in areas with irrigated transgenic corn. **Environmental Entomology**, v.31, n.4, p.676-685, 2002.
- HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p.565-571, 1998.
- HELLMICH, R.L.; HIGGINS, L.S.; WITKOWSKI, J.E.; CAMPBELL, J.E.; LEWIS, L.C. Oviposition by European corn borer Lepidoptera (Crambidae) in response to various transgenic corn events. **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.5, p.1014-1020, 1999.
- HOFFMAN, F. O.; KAPLAN, S. Beyond the domain of direct observation: how to specify a probability distribution that represents the 'state of knowledge' about uncertainty inputs. **Risk analysis**, v.19, n.1, p.131-134, 1999.
- HÖFTE, H.; WHITLEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p.242-255, 1989.
- HUANG, L.L.; BUSCHMAN, R.A.; HIGGINS, W.H.; MCGAUGHEY, W.H. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. **Science**, v.284, p.965-967, 1999.
- HURLEY, T.M.; BABCOCK, B.A.; HELLMICH, R.L. **Biotechnology and pest resistance: an economic assessment of refuges**. Center of Agricultural and Rural Development, Iowa State University, Working Paper 97- WP 183, 1997.
- IMAN, R. L.; CONOVER, W. J. A distribution free approach to inducing rank correlations among input variables. **Communications in Statistics**, v.B11, n.3, p.311-334.
- INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE – HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE INSTITUTE. **An evaluation of the insect resistance management in Bt field corn: a science based framework for risk assessment and risk management**: report of an expert panel. Washington: ILSI Press, 1998. 78p.

- ISUKAPALLI, S. S.; GEORGOPOULUS, P. G. **Computational methods for sensitivity and uncertainty analysis for environmental and biological models**. 2001. 145p. http://www.ccl.rutgers.edu/reports/EPA/edmas_v3_epa.pdf (10.dez.2002)
- JAMES, C. **Global status of commercialized transgenic crops**: 2002. Ithaca: ISAAA, 2002. 24p. (Briefs n. 27).
- LIANG, S. J.; SHEN, J.L.; ZHOU, W.J.; WU, Y.D.; LIN, X.W.; ZHU, X. F. Early resistance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Bacillus thuringiensis* and its relation to the effect of transgenic cotton lines expressing BT toxin on the insect. 1998. http://www.biotech-info.net/early_resistance.html. (20 jan. 2003).
- LIVINGSTON, M. Efficient Bt refuge policies. **Proceedings of the Beltwide Cotton Conference**, v.1, p.345-348, 2000.
- MALLET, J.; PORTER, P. Preventing insect adaption to insect resistant crops: are seed mixtures or refuges the best strategy? **Proceedings of the Royal Society of London Serie B**, v.255, p.165-169, 1992.
- MASCARENHAS, V.J.; LUTTRELL, R.G. Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Environmental Entomology**, v.26, p.939-945, 1997.
- MASON, C.E. **European corn borer**: ecology and management. Ames: Iowa University, 1996. (USDA North Central Regional Extension Publication n. 327)
- McKENZIE, J. A. **Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance**. San Diego: Academic Press, 1996.
- NEPPL, C. C. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. 2000. 35p. Chicago, Thesis (B.A.) - University of Chicago. <http://environment.uchicago.edu/studies/thesis/papers/cami.pdf>. (15 jan. 2002)
- NORTON, B. G. Ecological risk assessment: toward a broader analytic framework. In COTHER, C. R. (Ed.). **Handbook of environmental risk decision making**: values, perceptions, and ethics. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 155-175

- OLSEN, K.M.; DALY, J.C. Plant-toxin interaction in transgenic Bt cotton and their effects on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.32, n.4, p.1293-1299, 2000.
- ONSTAD, W.D. Simulation model of the population dynamics of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in maize. **Environmental Entomology**, v.17, p.969-976, 1988.
- ONSTAD, W.D.; GOULD, F. Modeling the Dynamics of Adaptation to Transgenic Maize by European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p.585-593, 1998.
- ORR, D.B.; LANDIS, D.A. Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. **Journal of Economic Entomology**, v.90, n.4, p.905-909, 1997.
- PECHER, A.; HAHN, S. Using tools for modelling and solving agricultural problems under risk. **Computer and electronics in agriculture**, v.22, p.187-197, 1999.
- PECK, S.L.; ELLNER, S.P. The effect of economic thresholds and life-history parameters on the evolution of pesticide resistance in a regional setting. **The American Naturalist**, v.149, p.43-63, 1997.
- PECK, S.L.; GOULD, F.; ELLNER, S.P. Spread of resistance in spatially extended regions of transgenic cotton: implications for management of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.1, p.1-16, 1999.
- PERLACK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.A.; McFERSON, S.L.; FISCHOFF, D.A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p.3324-3328, 1991.
- PERLACK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.A.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, T.J.; FISCHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Biotechnology**, v.8, p. 939-943, 1990.
- PETERSON, R. K. D. 2001. <http://agbiosafety.unl.edu/perception.shtml>. (22 mai. 2003)

- POLAK, M.; CARAM, G. E.; CONTRERAS, G.; PRAUSE, J. Incidência de *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) en algodón y la relación entre su fenología, la del cultivo y las condiciones climáticas. 2000. http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/5_agrarias/a_pdf/a_059.pdf. (23 jun. 2002)
- ROUSH, R.T. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays? **Biocontrol Science and Technology**, v.4, p.501-516, 1994.
- ROUSH, R.T. Resistance management for agricultural pests. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2000.
- ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNICK, E.B. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York, Chapman and Hall, 1990. p.97-152.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT[®] users guide**: version 6.12 Edition. Cary, 1998. 1848p.
- SCHNEIDER, J.C. Confidence interval for bayesian estimates of resistance allele frequencies. **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.4, p.315-319, 1999.
- SCHÜTTE, G. Varieties resistant against invertebrate pests. 2000. <http://www.gtz.de/biotech/dokumente/biotech3.pdf>. (20 jul. 2001).
- SHELTON, A.M.; NYROP, J.P.; SEAMAN, A.; FOSTER, R.E. Distribution of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) egg masses and larvae in sweet corn in New York. **Environmental Entomology**, v.15, p.501-506, 1986.
- SHELTON, A.M.; TANG, J.D.; ROUSH, R.T.; METZ, T.D.; EARLE, E.D. Field tests on managing resistance to Bt engineered plants. **Nature Biotechnology**, v.18, p.339-342, 2000.
- SHOWERS, W. B.; HELLMICH, M. R. L.; DERRICK-ROBINSON, E.; HENDRIX, W. H. Aggregation and dispersal behavior of marked and released European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) adults. **Journal of Economic Entomology**, v.30, n.4, p.700-710, 2001.

- STORER, N. P.; PECK, S. L.; GOULD, F. VAN DUYN J. W.; KENNEDY, G. G. Sensitivity analysis of spatially-explicit stochastic simulation model of the evolution of resistance in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to Bt transgenic corn and cotton. **Journal of Economic Entomology**, v.96, n.1, p.173-187, 2003.
- TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; GROETERS, F.R.; MOAR, W.J.; JOHNSON, M.W.; LUO, K.; ADANG, M.J. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, p.4120-4124, 1994.
- TANG, J.D.; GILBOA, S.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M. Inheritance, stability and lack-of fitness costs of field selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.732-741, 1997.
- THORNLEY, J. H. M.; JOHNSON, I. R. Plant and crop modelling: a mathematical approach to plant and crop physiology. Oxford: Clarendon Press, 1990. 669 p.
- VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.1378-1385, 1990.
- WHALON, M.E.; McGAUGHEY, W.H. *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management. In: ISHAAYA, I; DEHEELE, D. (Ed.). **Insecticides with novel mode of action, mechanism and application**. New York: Springer-Verlag, 1998. p.775-806.
- WHITTAKER, A. D.; THIEME, R. H. Integration of knowledge systems into agricultural problem solving. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.4, n.4, p.110-115. 1996.