

Compatibilidade de milho Bt e bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* para o manejo da Lagarta-do-cartucho do milho

Camila da Silva Fernandes Souza⁽¹⁾; Simone Martins Mendes⁽²⁾; Lorena de Oliveira Martins⁽³⁾; Amanda Fernandes Guimarães⁽³⁾; Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro⁽²⁾; Luís Cláudio Paterno Silveira⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Mestranda em Entomologia; Universidade Federal de Lavras; Lavras-MG; camilasfs4@hotmail.com; ⁽²⁾ Pesquisadora; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas-MG; Simone.mendes@embrapa.br; Paulo.eduardo@embrapa.br ⁽³⁾ Graduando em Ciências Biológicas; Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM); Sete Lagoas-MG; lorena-71@hotmail.com; amandafernandesg@yahoo.com.br; ⁽⁴⁾ Professor; Universidade Federal de Lavras; Lavras-MG; lcp silveira@gmail.com.

RESUMO: A *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga polífaga, considerada a principal praga do milho, que desenvolveu resistência a inseticidas químicos, biológicos e também vêm evoluindo resistência a tecnologias Bt como à proteína Cry 1F (expressa no evento Herculex®). Diante da dificuldade de manejo da praga e da facilidade de evolução da resistência às principais estratégias de controle, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de produtos comerciais a base da bactéria *Bacillus thuringiensis* para o controle de *S. frugiperda* resistente às proteínas Cry1F e Cry1A.105 Cry2Ab2. Três bioinseticidas (Agree®, Dipel WP® e Thuricide®) foram incorporados em dieta artificial e oferecidas a lagartas neonatas. Após sete dias, foram registradas a mortalidade e a biomassa dos insetos sobreviventes. O bioinseticida Agree® proporcionou 100% de mortalidade, tanto para lagartas suscetíveis quanto resistentes. Para o Dipel WP® a sobrevivência foi de 18,75% para as lagartas resistentes a proteína Cry1F com biomassa de 0,95 mg e 15,62% para as resistentes a Cry1A.105 Cry2Ab2 com 0,58 mg de biomassa. Para o Thuricide® a sobrevivência para as lagartas resistentes a Cry1F foi 10,93% com biomassa de 0,54 mg, e as resistentes a Cry1A.105 Cry2Ab2 apresentaram sobrevivência de 3,12% com biomassa de 0,15 mg. Houve inibição do crescimento das lagartas resistentes. Entre os bioinseticidas testados, o Agree® se mostrou como o mais eficiente para o controle e manejo da resistência de *S. frugiperda* no milho Bt.

Termos de indexação: lagarta-do-cartucho, controle biológico, resistência.

INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas da utilização do milho Bt é a capacidade dos insetos-alvo da tecnologia evoluir resistência às proteínas tóxicas. A expressão contínua de genes *Cry* em plantas transgênicas exerce forte seleção para resistência em populações de pragas alvo (Mcgaughey & Whalon, 1992). O risco potencial para a evolução da resistência é alto para *S. frugiperda*, porque o sistema de produção no Brasil tem sobreposição temporal e espacial do cultivo de milho Bt. No campo estas culturas expostas à população da lagarta-do-cartucho, a pressão de seleção é intensa em cada geração da praga, aumentando o risco de seleção de indivíduos resistentes. (Bernardi et al., 2014).

O evento TC1507 que expressa a proteína Cry1F foi comercializado nos EUA desde 2003 (Siebert et al., 2008; Storer et al., 2012). No Brasil este híbrido foi lançado em 2008 e comercialmente disponível para a safra de 2009/2010 pela empresa Dow AgroSciences Industrial Ltda. Uma das pragas alvo desde evento é *S. frugiperda* (Storer et al., 2010). Em 2003, o milho Cry1F foi plantado pela primeira vez em Puerto Rico para silagem para gado de leite. No entanto, logo após a comercialização, já houve problemas relacionados com resistência à tecnologia (Storer et al., 2010; Dangal & Huang, 2015). A resistência de campo que resultou em falta de eficácia ou controle reduzido de Cry1F no milho Bt em *S. frugiperda* também foi documentada no Brasil (Farias et al., 2014) e na região litorânea no sudeste dos EUA (Huang et al., 2014).

Desta forma, a ação conjunta de diferentes táticas de controle, preconizada pelo MIP (manejo integrado de pragas), vem sendo fomentada no país e tem apresentado sucesso. O emprego do milho Bt pode ser combinado ao controle biológico. Além dos

agentes entomófagos existem os entomopatógenos que na grande maioria são utilizados como formulados comerciais. As bactérias destacam-se como promissoras no controle biológico, e o *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o mais utilizado. Cerca de 90% dos bioinseticidas são a base desta bactéria (Vilasbôas et al., 2007).

Os bioinseticidas podem ser definidos como formulados fabricados em larga escala a partir de um microorganismo vivo ou de um produto natural e vendido para o controle de insetos-pragas (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2009). Esses bioinseticidas possuem, baixo teor de resíduos, alta performance, menor efeito secundário tóxico e boa compatibilidade com o meio ambiente e organismos não alvo (Mnif & Ghribi, 2015).

Como as toxinas inseticidas presentes nos bioinseticidas à base de Bt, podem ocupar o mesmo sítio de ação, nos insetos-alvo, daquelas presentes em híbridos de milho Bt, a utilização conjunta dessas ferramentas de MIP pode ser reduzida ou limitada. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de produtos comerciais a base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) em *S. frugiperda* resistentes às proteínas Cry 1F e Cry1A.105 Cry2Ab2.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas três populações de *S. frugiperda*, uma resistente à proteína Cry1F descrita em Leite et al (2015), outra resistente à Cry1A.105 Cry2Ab2 (Senete, 2016) e uma suscetível padrão. O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Os bioensaios foram realizados em placas de 128 células, com oito repetições (16 lagartas por repetição). Três produtos comerciais à base da Bactéria *Bacillus thuringiensis* foram incorporados à dieta artificial em concentração da dose recomendada comercialmente (Agree®, Dipel WP® e Thuricide®).

Foram vertidos 1 ml da dieta artificial contendo o bioinseticida e para a testemunha utilizou-se a mesma quantidade de água. Para a incorporação do bioinseticida na dieta, esta foi mantida em banho-maria até chegar à temperatura de 55 °C.

Após a secagem e resfriamento da dieta, uma lagarta neonata foi transferida para cada célula com o auxílio de um pincel e as placas foram vedadas com tampa adesiva que permite a troca de gases. Aos sete dias após a inoculação, foram registradas a mortalidade e a biomassa das lagartas sobreviventes.

Os dados foram submetidos à análise de

variância (ANOVA) e as médias comparadas com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência diferiu significativamente entre os tratamentos. O bioinseticida Agree® apresentou 100% de mortalidade, tanto para as lagartas resistentes às proteínas Bt, quanto para as suscetíveis. Nos bioinseticidas Dipel® e Thuricide®, a sobrevivência das lagartas resistentes à proteína Cry 1F não foi significativamente diferente. No entanto, para as resistentes à proteína Cry1A.105 Cry2Ab2, a sobrevivência foi maior no Thuricide®. Já para as lagartas suscetíveis a sobrevivência foi inferior as resistentes, não diferindo estatisticamente entre Dipel® e Thuricide® (**Figura 1**).

Para o bioinseticida Dipel® houve diferença significativa quanto a sobrevivência em relação as lagartas resistentes e as suscetíveis. Como esperado, para testemunha (livre de bioinseticida) a sobrevivência foi alta chegando a 100 % em ambas as lagartas, resistentes e suscetíveis.

Em um experimento semelhante, usando lagartas resistentes à proteína Cry1F, não foi detectada diferença significativa entre os bioinseticidas utilizados (XenTari WG® ou Dipel ES®), no entanto foi observada uma menor suscetibilidade ao Dipel ES®, semelhante ao resultado do presente trabalho onde comparando os três produtos utilizados, o Dipel® também foi o menos eficiente (Jakka et., al, 2014).

Quanto à biomassa, observou-se o mesmo padrão daquele observado para a sobrevivência. A testemunha obteve média de biomassa superior, tanto resistentes, quanto suscetíveis e não houve diferença significativa. Em relação aos bioinseticidas, as lagartas mantidas em Agree® não sobreviveram, portanto, a média de biomassa foi apresentada somente para lagartas mantidas em Thuricide® e Dipel®.

Para estes, não houve diferença significativa entre a biomassa das lagartas resistentes à Cry 1F e Cry1A.105 Cry2Ab2, e não houve sobreviventes das larvas suscetíveis, portanto, não apresentaram biomassa. Apesar da presença de lagartas sobreviventes resistentes às proteínas Bt em Dipel® e Thuricide®, em relação a testemunha pode-se observar que houve uma alta inibição do crescimento diante do baixo valor de biomassa. A média de biomassa da testemunha chegou a ser cinco vezes maior (**Figura 2**). Estes organismos resistentes apesar de sobreviverem após sete dias, dificilmente completariam o ciclo de vida em função do baixo valor de biomassa e grande inibição do

crescimento.

Os bioinseticidas comerciais testados à base de *B. thuringiensis* var. *aizawai* e var. *kurstaki*, diferem um pouco das toxinas que produzem, por isso, mesmo as lagartas resistentes às proteínas presentes em milho transgênico foram suscetíveis aos produtos (Jakka et al., 2014). Estas variedades de *B. thuringiensis* possuem diferentes proteínas tóxicas (Tabela 1). Como o Dipel® e Thuricide® são produtos com o ingrediente ativo da mesma variedade *Bt kurstaki* HD-1, eles apresentaram índices de sobrevivência semelhantes (Kanaak & Fiuza, 2006).

Tabela 1- Proteínas presentes nos produtos comerciais a base de *Bacillus thuringiensis* utilizados.

| Produto comercial | Ingrediente ativo | Proteínas | Referência |
|-------------------|-------------------|--------------|----------------------------|
| Agree® | Bt aizawai GC-91 | Cry1Aa | EPA Fact Sheet 1993 (Ciba) |
| | | Cry1Ac | |
| | | Cry1B-like | |
| Dipel® | Bt kurstaki HD-1 | Cry1C Cry1D | McClintock et al., 1995 |
| | | Cry2B Cry9 | |
| | | Cry1Aa | |
| | | Cry1Ab | |
| | | Cry1Ac Cry2A | |
| Thuricide® | Bt kurstaki HD-1 | Cry1Aa | Hadley et al., 1987 |
| | | Cry1Ab | |
| | | Cry1Ac Cry2A | |

Como o bioinseticida Dipel® mostrou maior porcentagem de sobrevivência para as lagartas suscetíveis em relação às resistentes, este produto não deve ser indicado para se utilizar no manejo da resistência da lagarta-do-cartucho, apresentando uma resistência cruzada. O bioinseticida Dipel® além da proteína Cry1A sintetiza também a Cry2A que possui atividade relativamente baixa contra *S. frugiperda* (Lima et al., 2008). No entanto o Agree®, é da variedade *Bt aizawai* GC-91 e a mortalidade foi superior, apresentando-se como o mais eficiente para controle de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes às proteínas Cry1F e Cry1A.105 Cry2Ab2.

Dessa forma é possível compatibilizar o controle biológico e a tecnologia Bt, que pode ser bem-sucedido no manejo integrado de pragas, desde que a escolha do produto seja feita corretamente.

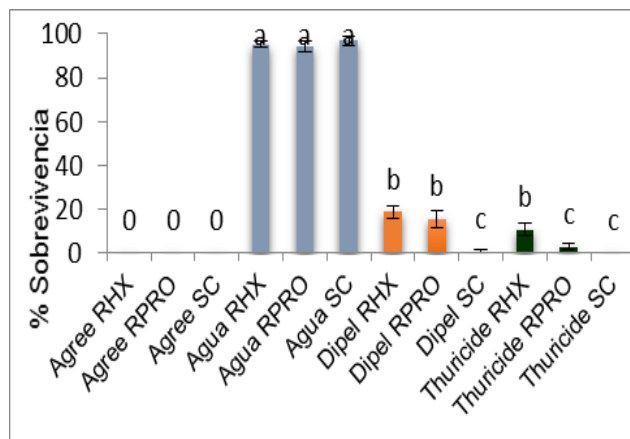


Figura 1. Sobrevivência (\pm ep) de *Spodoptera frugiperda* resistentes à Cry 1F e Cry1A.105 Cry2Ab2 e suscetíveis, em diferentes bioinseticidas, onde RHX= Lagartas resistentes à proteína Cry1F presente no milho *Bt Herculex* (HX), RPRO= Lagartas resistentes às proteínas Cry1A.105 Cry2Ab2 presentes no milho *Bt DKB 390 VTPRO*, SC= Lagartas suscetíveis. Médias seguidas pela mesma letra não se diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,5$).

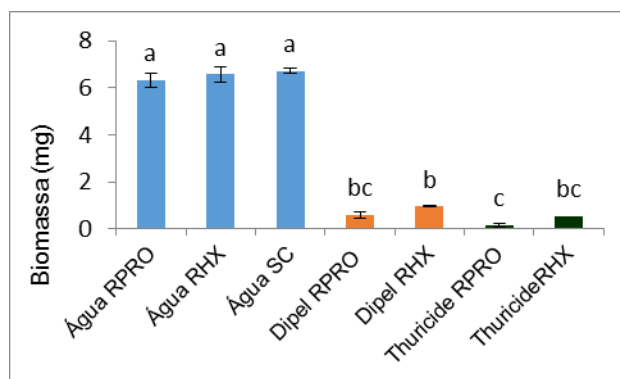


Figura 2. Biomassa (\pm ep) de *Spodoptera frugiperda* resistentes à Cry 1F e Cry1A.105 Cry2Ab2 em diferentes bioinseticidas, onde RHX= Lagartas resistentes à proteína Cry1F presente no milho *Bt Herculex* (HX), RPRO= Lagartas resistentes às proteínas Cry1A.105 Cry2Ab2 presentes no milho *Bt DKB 390 VTPRO*, SC= Lagartas suscetíveis. Médias seguidas pela mesma letra não se diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,5$).

CONCLUSÕES

Entre os bioinseticidas testados (Agree®, Thuricide® e Dipel®), o Agree® se mostrou como o mais eficiente para o controle e manejo da resistência de *S. frugiperda* em milho Bt.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de amparo a pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de mestrado concedida à primeira autora.

A equipe do laboratório de ecotoxicologia e manejo de insetos da Embrapa Milho e Sorgo.

REFERÊNCIAS

- BERNARDI, O.; SORGATTO, J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F. A.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection**, v. 58, p. 33-40, 2014.
- DANGAL, V.; HUANG, F. Fitness costs of Cry1F resistance in two populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), collected from Puerto Rico and Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 81–86, 2015.
- EPA **Fact Sheet for *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* Strain GC-91**. 1993. http://www.agbioworld.org/pdf/bt-short_safet.pdf Acesso em 29 de maio de 2016.
- FARIAS, J. R.; ANDROW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Revista Elsevier**, v. 64, p. 150-158, 2014.
- HADLEY, W.M.; Burchiel SW, McDowell TD, Thilsted JP, Hibbs CM, Whorton JA, Day PW, Friedman MB, Stoll RE. Five-month oral (diet) toxicity/infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 8, p. 236-242, 1987.
- HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER, R. L.; REISIG, D. D.; HEAD, G. P.; ANDOW, D. A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G. D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. **Plos one. PLOS ONE**. V.9, 10p, 2014.
- JAKKA, S. R. K.; KNIGHT, J. L.; FUENTES, J. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Economic Entomology**. v. 122, p. 52-54, 2014.
- KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* e proteínas com potencial na agrobiotecnologia. **Biociência e Desenvolvimento**. v. 9, n. 36, p. 26-31, 2006.
- LEITE, N. A.; MENDES, S. M.; SANTOS-AMAYA, O. F.; SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, T. P. M.; GUEDES, R. N. C.; PEREIRA, E. J. G. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in Brazilian strain of fall armyworm. **The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 158, p. 236-247, 2016.
- LIMA, G. M. S.; AGUIAR, R. W. S.; CORRÊA, R. F. T.; MARTINS, E. S.; DE-SOUZA, M. T.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p. 2941- 2948, 2008.
- MCGAUGHEY, W.H.; WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science** v. 258, p. 1451-1555, 1992.
- MCCLINTOCK, J.T., SCHAFFER, C. R.; SJOBLAD, R. D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Journal of pesticide Science**. v. 45, p. 95-105, 1995.
- MNIF, I.; GHRIBI, D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. **Crop Protection**. v. 77, p. 52-64, 2015.
- Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2009. Report of Workshop on the Regulation of Biopesticides: Registration and Communication Issues. See. Series on Pesticides. n. 448. <http://www.oecd.org/dataoecd/3/Collego55/43056580.pdf>. Acesso em 29 de maio de 2016.
- SENETE, C. T. **Controle genético da resistência da lagarta-do-cartucho do milho expressando proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2**. Tese de doutorado, 79p. Lavras, Minas Gerais: UFLA, 2016.
- SIEBERT, M.W.; BABOCK, J.M.; NOLTING, S., SANTOS, A.C.; ADAMCZYK JR., J.J.; NEESE, P.A.; KING, J.E.; JENKINS, J.N.; MCCARTY, J.; LORENZ, G.M.; FROMME, D.D.; LASSITER, R.B. Efficacy of Cry1F insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomological society**. v. 91, p. 555- 565, 2008.
- STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in



Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**. v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

STORER, N.P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.E.; THOMPSON, G.D.; SANTOS, A.C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 673-687, 2007.

