

Efeito de diferentes toxinas *Bt* no desenvolvimento da Lagarta-do- Cartucho do Milho

Andrea Rocha Almeida de Moraes⁽¹⁾; André Luiz Lourenção⁽²⁾; Maria Elisa A. G. Zagatto Paterniani⁽³⁾; José Djair Vendramim⁽⁴⁾

⁽¹⁾Pesquisadora Instituto Agrônômico (IAC), Campinas, SP, Brasil, andrea@iac.sp.gov.br; ⁽²⁾Pesquisador Instituto Agrônômico (IAC), Campinas, SP, Brasil, andre@iac.sp.gov.br; ⁽³⁾Pesquisadora Instituto Agrônômico (IAC), Campinas, SP, Brasil, elisa@iac.sp.gov.br; ⁽⁴⁾Professor Doutor Universidade de São Paulo - USP/ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil, jdendra@usp.br

RESUMO: Dentre as principais pragas da cultura do milho, destaca-se *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), pelo dano causado às lavouras, pela frequência de ocorrência ou dificuldade de controle. A estratégia para seu controle tem sido a utilização de híbridos de milho que expressam a proteína inseticida *Bt*. Assim, esta pesquisa avaliou o desenvolvimento de *S. frugiperda* em híbridos de milho na versão convencional e transgênica, com diferentes eventos *Bt*, em teste de antibiose, para identificar toxinas *Bt* mais eficientes e que reflitam em um menor nível de injúria da praga. Conduziu-se em laboratório, experimentação com os híbridos DAS2B710 HX, P30F35 YG, DKB390 PRO e Impacto Viptera, com distintos eventos *Bt*, e os híbridos convencionais DAS2B710 e Impacto. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e 60 repetições. Avaliaram-se biomassa e comprimento das lagartas e sobrevivência da fase larval. Verificou-se que a biomassa e o comprimento das lagartas desenvolvidas em milho *Bt* foram menores do que as desenvolvidas em milho não *Bt*. Lagartas alimentadas com milho *Bt* apresentaram expressiva redução em sua população 24 horas após alimentação, destacando-se o Impacto Viptera com sobrevivência de 52% de lagartas, ante 73% para 'P30F35 YG' e 72% para os híbridos 'DAS2B710 HX' e 'DKB390 PRO'; nos convencionais a sobrevivência atingida foi de 93%. Os resultados confirmam que os eventos *Bt* causam resistência do tipo antibiose às lagartas de *S. frugiperda* e que a presença da toxina Viptera® no híbrido Impacto Viptera torna a tecnologia *Bt* mais eficiente.

Termos de indexação: *Zea mays* L., *Spodoptera frugiperda*, antibiose.

INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é a mais importante praga da cultura do milho no Brasil, alimentando-se das folhas, reduzindo a área fotossintética, e principalmente os cartuchos das plantas jovens, causando perdas de até 60% da produção (Cruz, 2008).

O uso de variedades resistentes a insetos é um método de controle que reduz as perdas causadas por pragas, sendo os tipos de resistência antibiose e não preferência para alimentação encontrados em diferentes genótipos de milho.

A resistência do tipo antibiose ocorre quando o inseto se alimenta normalmente da planta e esta exerce um efeito adverso sobre a sua biologia, afetando direta ou indiretamente seu potencial de reprodução. Geralmente, essa influência negativa ocorre devido à presença de compostos químicos que dificultam o crescimento e o desenvolvimento do inseto, provocando alterações como prolongamento do ciclo biológico, deformações e mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento, redução de peso e tamanho dos indivíduos, entre outros (Chrispim & Ramos, 2007; Boiça Junior et al., 2013).

Nas últimas décadas a engenharia genética possibilitou, com a técnica do DNA recombinante, a combinação de genes entre espécies de organismos, surgindo assim o milho geneticamente modificado com alto padrão de resistência a lepidópteros-pragas, pela introdução de um gene de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (*Bt*) em plantas de milho (Huang et al., 2002).

Proteínas *Bt* têm sido efetivas no controle de lepidópteros-pragas da cultura do milho. As proteínas Cry1F, Cry1Ab, e Cry1Ac, expressas em híbridos de milho *Bt*, foram, em ordem decrescente, mais efetivas no controle de *S. frugiperda* (Waquil et al., 2002; Lourenção & Fernandes, 2013).

Considerando-se a importância de *S. frugiperda* como praga de milho no Brasil, esta

pesquisa teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda* em milho com diferentes eventos *Bt*, em teste de antibiose, para identificar toxinas *Bt* mais eficientes e que reflitam em um menor nível de injúria da praga, nas condições do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no ano de 2013, sob condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa ($60\% \pm 10\%$) e fotofase (14h), no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP.

Foram utilizados quatro híbridos simples de milho com distintos eventos *Bt*: DAS2B710 HX (evento TC1505 e toxina *Bt* Cry 1F); P30F35 YG (evento MON 810 e toxina *Bt* Cry 1Ab); DKB390 PRO (evento MON 89034 e toxina *Bt* Cry 1A105 (1Ab, 1Ac, 1F) + Cry2Ab2) e Impacto Viptera (evento MIR 162 e toxina *Bt* VIP3Aa20); e dois híbridos simples convencionais de milho, DAS2B710 e Impacto.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com seis tratamentos. Em cada repetição utilizou-se uma lagarta recém-eclodida, isolada em frasco de vidro, sendo cada lagarta considerada uma repetição, perfazendo 60 repetições por tratamento.

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas no experimento foram obtidas de criação de manutenção em dieta artificial, a qual, periodicamente, recebe introduções de insetos do campo para evitar a degeneração da população.

Os híbridos utilizados foram semeados em vasos plásticos com capacidade de 20 kg, preenchidos com composto, com adubação de acordo com as recomendações para a cultura do milho, deixando-se duas plantas por vaso. Esses vasos foram mantidos em casa de vegetação durante o período da experimentação. Utilizaram-se 20 vasos por tratamento, de modo a se ter disponibilidade de folhas durante o período de experimentação.

As folhas dos híbridos foram coletadas quando atingiram a idade de 16 até 27 dias, quando as lagartas recém-eclodidas "raspam" as folhas de milho, pois é nessa fase de desenvolvimento da planta onde ocorre maior discriminação em testes de resistência.

Lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* foram individualizadas em tubos de vidro (8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro) tampados com algodão

hidrófugo e alimentadas com folhas dos híbridos de milho. Foram fornecidas às lagartas aproximadamente 12 cm^2 de folhas de milho, cortados em retângulos, com a maior dimensão no sentido longitudinal e paralelo à nervura central, onde se concentram cerca de 99% das lagartas em estádios iniciais de alimentação. Diariamente substituíram-se as folhas de milho nos tubos de vidro, independentemente do consumo pela lagarta e, registrou-se o número de lagartas sobreviventes.

Avaliaram-se biomassa das lagartas aos quatro e nove dias, comprimento das lagartas aos nove dias e viabilidade da fase larval. Para a obtenção da biomassa das lagartas foi utilizada balança de precisão analítica da marca Mettler AC100. Cada repetição, quando possível, foi pesada individualmente e, em repetições onde a biomassa da lagarta não era detectada pela balança, pesou-se mais de uma lagarta por vez até se obter um valor detectável. O comprimento de lagartas foi obtido através de utilização de régua graduada em cm. Para obtenção da sobrevivência larval, contou-se diariamente o número de lagartas vivas em cada tratamento, a partir da instalação do experimento em laboratório, até a mortalidade total em todos os tratamentos com tecnologia *Bt*.

Foram realizadas análises de variância individuais e conjuntas, sendo as médias transformadas em arco seno $\sqrt{x/100}$ e comparadas pelos testes de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o software SAS. As curvas de sobrevivência das lagartas foram estimadas para cada híbrido de milho, utilizando-se o teste de Kaplan-Meier, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software BioEstat 3.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferenças significativas entre os seis híbridos de milho avaliados com relação à biomassa de lagartas, alimentadas durante quatro dias com folhas de milho *Bt* e não *Bt*. Lagartas alimentadas com híbridos transgênicos apresentaram menor ganho de biomassa aos quatro dias de alimentação em relação aos híbridos convencionais, mostrando o efeito direto das toxinas *Bt* sobre a praga (**Tabela 1**). Dutton et al. (2005) relataram que as toxinas *Bt* são deterrentes para as larvas de lepidópteros e que essa característica de deterrência do milho *Bt* acarreta em baixo ganho de peso das larvas alimentadas com esse tipo de milho. Não foram detectadas diferenças na biomassa das lagartas alimentadas em híbridos com diferentes tecnologias *Bt*, aos quatro dias de alimentação, ou seja, as tecnologias *Bt* afetaram o ganho de biomassa da *S. frugiperda* de maneira semelhante nesse período

(Tabela 1). Esse fato pode ser devido à toxina *Bt* num primeiro momento agir de maneira semelhante sobre as lagartas recém-eclodidas, independentemente do tipo de ação e atuação da toxina no intestino dessas lagartas. Também não se verificaram diferenças de biomassa entre as lagartas alimentadas com os dois híbridos convencionais de milho aos quatro dias de alimentação.

TABELA 1. Biomassa e comprimento médio de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas durante quatro e nove dias, com híbridos de milho convencional e transgênico.

Híbrido	Biomassa aos 4 dias (mg) ⁽¹⁾	Biomassa aos 9 dias (mg) ⁽¹⁾	Comprimento (cm) ⁽¹⁾
DKB390 PRO	0,04 b	-	-
Impacto Vipt.	0,05 b	-	-
DAS2B710 HX	0,06 b	-	-
P30F35 YG	0,07 b	5,49 b	0,7 c
DAS2B710	0,19 a	20,31 a	1,4 a
Impacto	0,23 a	19,01 a	1,2 b
Média	0,11	14,9	1,1
DMS	0,18	0,83	1,04
F (5%)	41,7	7,1	14,8
CV (%)	25,6	35,5	14,6

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Mendes et al. (2009) relatam que os insetos que sobrevivem após serem alimentados com milho transgênico apresentam menor acúmulo de biomassa, reduzindo sua competitividade no ambiente, comprometendo o desempenho dessa população de insetos. Verifica-se, portanto, efeito de antibiose dos híbridos transgênicos sobre a lagarta-do-cartucho, evidenciado pela redução de peso.

Após nove dias de de alimentação nas folhas de milho, apenas as lagartas alimentadas em híbridos convencionais e no híbrido transgênico contendo a proteína toxina *Bt* Cry 1A(b) estavam ativas e se alimentando (**Tabela 1**), as demais lagartas alimentadas com outros milhos *Bt* já haviam morrido. Constatou-se ainda que as lagartas alimentadas com o híbrido de milho não *Bt* apresentaram média de biomassa superior quando comparadas com as lagartas alimentadas por folhas do milho *Bt*, estas apresentando perda significativa de seu peso. Essa redução de biomassa no híbrido transgênico P30F35 YG foi da ordem de 73,0% em relação ao híbrido convencional DAS2B710 e da ordem de 71,1% em relação ao híbrido convencional Impacto (**Tabela 1**).

A proteção oferecida pela toxina Cry 1A(b) ao milho *Bt* contra a infestação por *S. frugiperda* é consequência da redução do consumo foliar, fato

importante para o manejo de insetos no campo, pois, com menor biomassa e consumo alimentar, haverá menor dano do inseto à produção (Lynch et al., 1999).

Houve diferença significativa entre os híbridos para comprimento de lagarta aos nove dias de alimentação nas folhas de milho. O desenvolvimento da lagarta foi influenciado pelos híbridos estudados, de modo que o híbrido transgênico P30F35 YG apresentou maior redução no comprimento da praga em comparação aos demais híbridos avaliados (**Tabela 1**).

Buntin et al. (2001), ao avaliarem a eficiência dos milhos geneticamente modificados MON810 e BT11 (proteína Cry1Ab) no controle de *H. zea*, observaram atraso no desenvolvimento das lagartas infestantes do milho contendo tecnologia *Bt*, o que se refletiu na redução do tamanho delas. Outros trabalhos mostram que populações remanescentes de insetos que se desenvolveram em plantas resistentes passam a produzir indivíduos menos vigorosos e mais suscetíveis aos inseticidas, promovendo a possibilidade do uso mais racional dos produtos químicos (Viana & Potenza, 2000).

A sobrevivência de lagartas recém-eclodidas alimentadas com híbridos de milho com diferentes toxinas *Bt* foi sempre menor que a encontrada nas lagartas alimentadas em híbridos não-*Bt* (**Figura 1**), demonstrando o efeito antibiótico da toxina *Bt* sobre o ciclo biológico da lagarta-do-cartucho.

Lynch et al. (1999) verificaram que a sobrevivência de larvas de *S. frugiperda*, avaliadas quatro dias após a eclosão em diferentes híbridos de milho que expressam a toxina Cry 1A(b) variou de 45% para o material Btk 0906 a 54% para o Btk 0907. Segundo Dutton et al. (2005), larvas nos primeiros instares são mais sensíveis às toxinas *Bt* em razão das alterações na atividade específica de proteases em seu suco intestinal.

A mortalidade das formas jovens de insetos criadas sobre plantas resistentes geralmente é observada durante os primeiros dias de vida do inseto e é uma das variáveis mais características da ocorrência de antibiose, aliada à redução do tamanho e peso dos indivíduos (Panda & Khush, 1995).

Verificou-se que o híbrido Impacto Viptera provocou alta mortalidade de lagarta-do-cartucho já 24 horas após a instalação do experimento, resultando em 52% de sobrevivência de lagartas, ante 73% para o híbrido transgênico P30F35 YG e 72% para os híbridos transgênicos DAS2B710 HX e DKB390 PRO, evidenciando a eficiência dessa tecnologia na redução da sobrevivência da lagarta-do-cartucho (**Figura 1**). O híbrido *Bt* Impacto Viptera continuou a apresentar maior mortalidade em

relação aos demais *Bt* até os três dias de avaliação, quando se detectou mortalidade de 100% das lagartas nesse tratamento.

Os híbridos DAS2B710 HX e DKB390 PRO foram semelhantes no que se refere à mortalidade larval até o terceiro dia de avaliação, dia em que a mortalidade em DKB390 PRO atingiu 100%, enquanto no tratamento DAS2B710 HX algumas lagartas ainda conseguiram sobreviver até o sexto dia de avaliação (**Figura 1**).

Observou-se que no híbrido transgênico P30F35 YG as lagartas foram morrendo no decorrer dos dias de alimentação, apesar de esse nível de mortalidade ser bem inferior aos demais milhos *Bt*, tanto que 100% de mortalidade de *S. frugiperda* só foi alcançada nove dias após o início da alimentação das lagartas com as folhas desse híbrido (**Figura 1**).

Essa diferença de sobrevivência em híbridos de milho com tecnologia *Bt* aponta para uma evolução da resistência em populações de insetos-praga à prática de controle com determinados eventos *Bt*. Com relação aos híbridos convencionais, notou-se pleno desenvolvimento das lagartas alimentadas com esses híbridos e uma sobrevivência natural pouco menor no híbrido DAS2B710 do que no híbrido Impacto (**Figura 1**). Essas lagartas alimentadas nesses híbridos conseguiriam terminar seu ciclo biológico, mas nesse estudo decidiu-se encerrar as avaliações quando o último evento *Bt* apresentasse 100% de mortalidade, uma vez que já é sabido o ciclo biológico de *S. frugiperda* alimentada com folhas de milho convencionais.

CONCLUSÕES

Os eventos dos híbridos transgênicos DKB390 PRO, DAS2B710 HX, Impacto Viptera e P30F35 YG causam resistência por antibiose às lagartas de *S. frugiperda*.

A presença de toxina Viptera® no híbrido Impacto Viptera torna a tecnologia *Bt* mais eficiente.

REFERÊNCIAS

BOIÇA JUNIOR, A.L.; SOUZA, B.H.S.; LOPES, G.S.; COSTA, E.N.; MORAES, R.F.O.; EDUARDO, W.I. **Atualidades em resistência de plantas a insetos**. In: Tópicos em Entomologia Agrícola. Ed. Antonio Carlos Busoli...[et al.]. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, p. 207- 224, 2013.

BUNTIN, G. D.; LEE, D.; WILSON, D. M.; McPHERSON, R. M. Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on

corn. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 84, n. 1, p. 37-42, 2001.

CHRISPIM, T. P. & RAMOS J. M. Revisão de literatura: Resistência de plantas a insetos. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, 2007, 10p.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. (Ed.). **A Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 12, p.303-362.

DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Effects of *Bt* maize expressing Cry1Ab and *Bt* spray on *Spodoptera littoralis*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, v.114, p.161-169, 2005.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L.; HIGGINS, R. A.; LI, H. Survival of Kansas dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on *Bt* and non-*Bt* corn hybrids. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 95, n. 3, p. 614-621, 2002.

LOURENÇÃO, A. L. F. & FERNANDES, M. G. Avaliação do milho *Bt* Cry1A(b) e Cry1F no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em condições de campo. **Científica**, v.41, p.164-188, 2013.

LYNCH, R. E.; WISEMAN, B. R.; PLAINSTED, D.; WARNIK, D. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1A(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 1, p. 246-252, 1999.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; FERMINO, T. C.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M.; COSA, M. C. A.; MARUCCI, R. C.; WAQUIL, J. M. Efeito da interação entre genótipos de milho e evento geneticamente modificado contendo a toxina Cry 1A(b) nas variáveis biológicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). In: Seminário Nacional de Milho Safrinha, 10., **Anais...** Rio Verde, GO, p. 368-374, 2009.

PANDA, N. & KHUSH, G. S. **Host plant resistance to insects**. Wallingford, CAB International. 1995. 431 p.

VIANA, P. A. & POTENZA, M. R. Non-preference and antibiosis of fall armyworm for selected corn genotypes. **Bragantia**, v.59, n.1, p. 27-33, 2000.

WAQUIL, J. M. L.; VILLELA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.3, p.1-11, 2002.

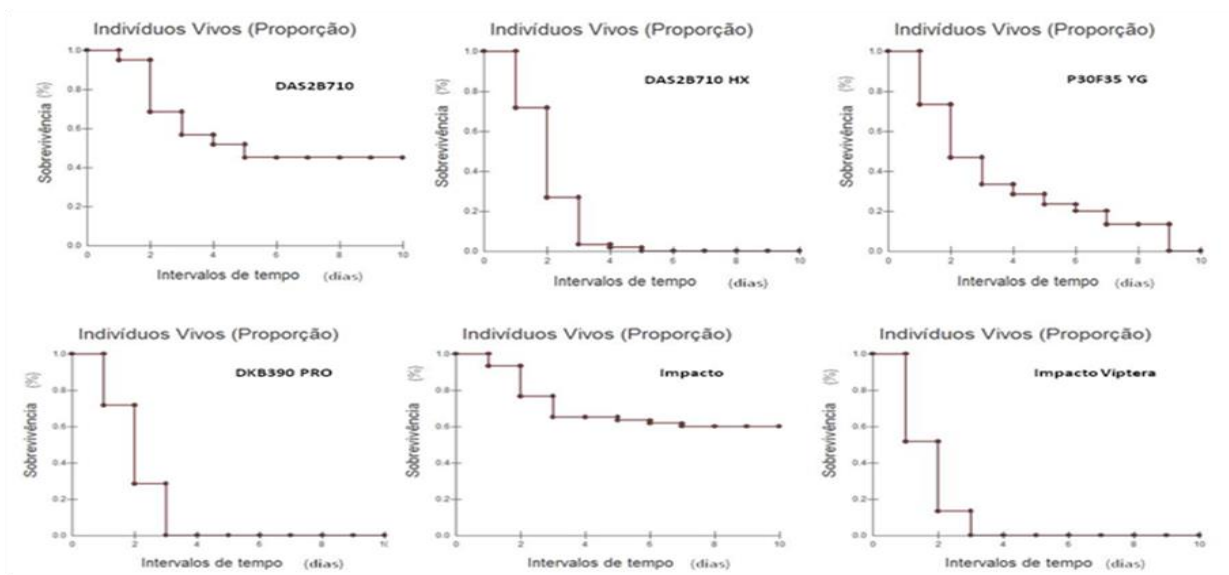


FIGURA 1. Sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de híbridos de milho *Bt* e não *Bt*, em laboratório.