

TOLERÂNCIA DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Pseudoplusia includens* (Walker) E *Rachiplusia nu* (Guenée) À PROTEÍNA Cry1Ac

TOLERANCE OF *Anticarsia gemmatalis* (Hubner), *Pseudoplusia includens* (Walker) AND *Rachiplusia nu* (Guenée) TO CRY1AC PROTEIN

YANO, S.A.C.¹; SANTANA, G.K.S.²; NEIVA, M.M.². MOSCARDI F.³, MARTINELLI, S.⁴, SOSA-GÓMEZ, D.R.⁵

¹ Bolsista Pós-Doutorado CNPq programa PDJ, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba- PR; e-mail: silvia_akimi@yahoo.com.br;

² Centro Universitário Filadélfia, UNIFIL, Londrina, PR.

³ Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

⁴ Monsanto do Brasil, São Paulo, SP;

⁵ Embrapa Soja, Londrina, PR;

Resumo

A soja geneticamente modificada com o gene sintético de Cry1Ac é uma alternativa ao controle químico de lepidopteros pragas na cultura da soja. Com a introdução da soja Bt, tornam-se necessários estudos de análise de risco para prevenir a seleção de insetos resistentes e também para compreender o nível de suscetibilidade dos insetos-alvo à proteína Cry1Ac e com isso iniciar um programa de manejo de resistência. O objetivo deste trabalho foi determinar a suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Pseudoplusia includens* (Walker) e *Rachiplusia nu* (Guenée) provenientes do Rio Grande do Sul à proteína Cry1Ac. Para determinar a suscetibilidade foi utilizada a proteína sintética de Cry1Ac, MVP11 (11,14%). Foram testadas sete concentrações da proteína Cry1Ac, incorporadas na dieta artificial, após geleificação, em cada célula foi inoculada uma lagarta neonata. As lagartas foram mantidas na dieta por sete dias, após esse período avaliou-se a mortalidade e o peso das lagartas sobreviventes. Observou-se que, em ordem decrescente de tolerância, *P. includens* apresentou menor suscetibilidade (CL_{50} 1,53 $\mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$ de dieta) à proteína Cry1Ac, seguida por *R. nu* (CL_{50} 0,70 $\mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$) e por último *A. gemmatalis*, a qual foi a espécie com maior suscetibilidade (CL_{50} 0,04 $\mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$).

Introdução

Embora a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) seja apontada como o principal inseto-praga por causar severas desfolhas em todas as regiões produtoras de soja (Gallo et al., 2002). A lagarta falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) tem ocasionado preocupação e reclamação dos produtores desde a safra 2003/04 (Braga et al. 2011). Outras pragas da parte aérea são importantes em regiões mais restritas como *Crociosema aporema* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae) e *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae), *R. nu* ocorre principalmente na região sul do País (Corrêa-Ferreira, B.S., 1980; Specht et al., 2006). Estudos sobre estas espécies foram realizados na Argentina (Gamundi et al. 2004), entretanto há necessidade de trabalhos mais detalhados relativos às suas populações no Brasil.

A introdução da soja transgênica com o gene sintético de Cry1Ac no mercado brasileiro, previsto para a safra 2012/13, é uma alternativa importante para diminuir as aplicações de inseticidas químicos. No entanto, a disponibilidade de toxina Bt em grandes áreas, leva a uma principal preocupação, que é a seleção de fenótipos resistentes a esta toxina (Gould, 1998). Estudos de suscetibilidade à proteína Cry1Ac com as principais pragas-alvo são importantes para compreender seu nível de suscetibilidade e determinar as doses diagnósticas para futuro acompanhamento das possíveis alterações de suscetibilidade. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a suscetibilidade de populações de *A. gemmatalis*, *P. includens* e *R. nu* provenientes do Rio Grande do Sul.

Material e Métodos

As populações de campo de *P. includens* e *A. gemmatalis* foram coletadas durante a safra 2010/11 e a população de *R. nu* coletada na safra 2011/12 (Quadro 1). As coletas foram realizadas no início das infestações em campo, sendo que, em cada local foram coletadas 800 a 1000 lagartas, colocadas em gaiolas de madeira contendo folhas de soja, transportadas e mantidas no laboratório da Embrapa Soja- Londrina, PR. O georreferenciamento foi realizado com um aparelho de GPS portátil (Garmin Etrex, Olathe, Kansas), contendo o sistema de datum WGS 84. Os adultos obtidos a partir destas lagartas foram mantidos em gaiolas para oviposição. As lagartas foram criadas em dieta artificial, conforme protocolo de Hoffmann-Campo et al. (1985), a temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ umidade e 14h de fotoperíodo. Para *P. includens* e *A. gemmatalis* os bioensaios foram realizados com lagartas entre a 2° e a 4° geração, já para *R. nu* foram utilizadas lagartas entre a 6° e a 7° geração.

Inseto	Safra	Localização	Latitude (S)	Longitude (W)	Coleta
<i>P. includens</i>	2010/11	Selbach- RS	28° 61' 52"	52° 95' 33"	15/02/11
<i>A. gemmatalis</i>	2010/11	Cruz Alta- RS	28° 38' 36.53	53° 17' 18.38"	05/01/11
<i>R. nu</i>	2011/12	Bento Gonçalves- RS	29° 05' 001"	51° 31' 448"	01/09/11

Quadro 1. Identificação das populações de noctúdeos amostradas em soja em diferentes municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta.

O produto formulado utilizado da proteína sintética de Cy1Ac foi a MVP II (*Pseudomonas* com Cry1Ac encapsulada da Dow Agrosiences, San Diego, EUA), contendo 11,14% de proteína Cry1Ac e foi mantida em freezer à temperatura de -20°C . As diferentes concentrações da proteína Cry1Ac utilizadas foram previamente diluídas em água destilada e colocadas em tubos plásticos graduados de 50 ml, com tampa, tipo Falcon. Em todos os tubos foram colocados 4 ml da proteína diluída (ou somente água destilada no tratamento controle) e adicionado 36 ml de dieta artificial até completar o volume final de 40 ml. A proteína foi incorporada na dieta por meio de um agitador do tipo Vortex e mantida em banho-maria na temperatura de $56 \pm 1^\circ \text{C}$. Aproximadamente 1 ml de dieta contendo as diferentes concentrações da proteína foi colocada em cada célula das bandejas de bioensaio com 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), com auxílio de uma pipeta de repetição. Após a geleificação da dieta, uma lagarta neonata de 0-24 horas de idade foi inoculada em cada célula. As placas foram fechadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO- CV-16, CD International Inc., Pitman, NJ) que permitiam as trocas gasosas com o ambiente externo e mantidas em câmara climatizada a $26 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 14:10 (L:D) h.

Para os estudos de linha-básica de suscetibilidade foram testadas sete concentrações da proteína Cry1Ac. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 a 8 repetições para cada concentração, representadas por um grupo de 16 lagartas, sendo testadas no mínimo 64 lagartas por concentração. As lagartas foram mantidas na dieta por sete dias a $26 \pm 2^\circ \text{C}$ e 14 h de fotoperíodo. A atividade da proteína Cry1Ac foi verificada mediante a avaliação de mortalidade e redução do peso das lagartas sobreviventes. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para as estimativas das concentrações letais (CL) e respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) por meio do programa estatístico POLO-PC (LeOra Software, 1987). As lagartas sobreviventes foram pesadas e os dados referentes ao peso médio das lagartas foram submetidos à análise de regressão não-linear (Sims et al., 1996) para as estimativas das concentrações efetivas (CE), ou seja, a dose de Cry1Ac que impede o crescimento das lagartas em relação ao tratamento controle não exposto, a análise foi feita por meio do programa JMP versão 8.0.2 (SAS Institute, 2004).

Resultados e Discussão

As CL_{50} estimadas para *A. gemmatalis*, *P. includens* e *R. nu* foram de $0,04 \mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$, $1,53 \mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$ e $0,70 \mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1). Ao se estimar a Razão de Tolerância, a partir dos valores obtidos na CL_{50} para as três espécies

estudadas, observou-se que as lagartas neonatas de *P. includens* foram as mais tolerantes à proteína, sendo 38,25 vezes menos suscetíveis que *A. gemmatalis* e 2,18 vezes menos suscetíveis que *R. nu*. Normalmente, quando *P. includens* é exposta a inseticidas químicos e biológicos possui uma maior tolerância comparada a outras espécies de noctuídeos, como *A. gemmatalis* (Bobrowski et al., 2002). Com o inseticida biológico Bt a diferença entre *P. includens* e *A. gemmatalis* é entre 1,5 a 5,6 vezes e de 1,4; 3,2 e 4,6 vezes para inseticidas como metomil, metamidofós e permetrina, respectivamente (Morales et al., 1995). Em estudo com a proteína purificada de Cry1Ac (80% Cry1Ac), observou-se que *A. gemmatalis* foi 16 vezes mais suscetível que *P. includens* (Bernardi et al., 2012). Ao comparar a suscetibilidade de *P. includens* com *Heliothis virescens* (Fabricius) à proteína Cry1Ac sintetizada observou-se uma diferença de 4,90 vezes, sendo *H. virescens* mais suscetível à proteína Cry1Ac (Albernaz, 2011).

Tabela 1. Nível de suscetibilidade (CL₅₀ e CL₉₀) à proteína Cry1Ac em lagartas neonatas de noctuídeos.

Insetos	n ¹	CL ₅₀ ² /IC(95%)	CL ₉₀ / IC (95%)	CA ³ ± (EP)	χ ²	g.l. ⁽⁴⁾
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	1152	0,04 (0,04 – 0,05)	0,27 (0,22 – 0,33)	2,14 ± 0,13	3,40	4
<i>Pseudoplusia includens</i>	1024	1,53 (1,31 – 1,73)	5,97 (4,95 – 7,65)	2,78 ± 0,25	1,80	4
<i>Rachiplusia nu</i>	1024	0,70 (0,58 – 0,81)	2,38 (2,02 – 2,91)	2,412 ± 0,18	1,53	4

¹n= número insetos testados; ²Concentração letal (CL) e Intervalo confiança (IC) expresso em µg de Cry1Ac ml⁻¹ dieta; ³CA= coeficiente angular e EP= erro padrão, ⁴ g.l.= graus de liberdade.

Os valores estimados de CE₅₀ para a população de *A. gemmatalis* foi de 0,0028 µg Cry1Ac.ml⁻¹, para *P. includens* foi de 0,8300 µg Cry1Ac.ml⁻¹ e para *R. nu* de 0,3670 µg Cry1Ac.ml⁻¹ (Tabela 2). A variação da suscetibilidade foi de 296,43 vezes entre *A. gemmatalis* e *P. includens*, 2,26 vezes entre *P. includens* e *R. nu* e de 131,07 vezes entre *A. gemmatalis* e *R. nu*.

Tabela 2. Resposta das populações de lagartas neonatas de noctuídeos à proteína Cry1Ac em relação à inibição do crescimento larval em bioensaio de incorporação da proteína em dieta artificial.

Inseto	n ¹	CE ₅₀ ² /IC(95%)	CE ₉₀ / IC (95%)
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	1152	0,0028 (0,0021 – 0,0036)	0,0328 (0,027 - 0,0413)
<i>Pseudoplusia includens</i>	1024	0,8300 (0,6301 - 1,1174)	3,2477 (1,8013 - 6,5626)
<i>Rachiplusia nu</i>	1024	0,3670 (0,137 – 1,419)	3,9835 (0,642 – 1340,55)

¹n= número de insetos testados; ² Concentração efetiva (CE) e Intervalo de confiança (IC) expresso em µg de Cry1Ac ml⁻¹ dieta.

Infere-se que *P. includens* apresenta menor suscetibilidade à proteína Cry1Ac e portanto o seu monitoramento para detectar alterações nos níveis de suscetibilidade deve ser implementado com técnicas que incorporem esta maior tolerância. Este racional é principalmente em regiões brasileiras que são produtoras da soja e algodão, pois o cultivo de algodão Bt expressando à proteína Cry1Ac pode acelerar a evolução da resistência nas populações de *P. includens*.

Conclusões

P. includens apresentou menor suscetibilidade (CL_{50} 1,53 $\mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$ de dieta) a proteína Cry1Ac, seguida por *R. nu* (CL_{50} 0,70 $\mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$) e por último *A. gemmatalis*, a qual foi a espécie menos tolerante (CL_{50} 0,04 $\mu\text{g Cry1Ac.ml}^{-1}$).

Referências

- ALBERNAZ, K.C. **Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e estrutura genética em populações de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**. 2011. 83 f. Tese (Doutorado em Entomologia)- Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2011.
- BERNARDI, O.; MALVESTITI, G.S.; DOURADO, P.M.; OLIVEIRA, W.S.; MARTINELLI, S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, 10.1002/ps.3271, 2012.
- BOBROWSKI, V.L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.25, p. 129–135, 2002.
- BRAGA, P.V.; OLIVEIRA, W.S.; MARTINELLI, S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; OLIVEIRA, M. Estudo de Caso de Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Ed. Suprema, 2011. p. 347-390.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S. Sampling *Epinotia aporema* on soybean. In M. Kogan; D.C. Herzog (eds.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York, Springer-Verlag, 587p. 1980.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMINI, J.D. **Entomologia Agrícola**. 10. ed. São Paulo, Fealq, 2002. p. 920.
- GAMUNDI, J. C.; RIART, S. M.; MACRAE, T. C.; ZAMPIERIN, E. S. Geographic variation in susceptibility of *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Olethreutidae) and *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in Argentina. In: THE WORLD SOYBEAN RESEARCH CONGRESS, 7., March 1-6, 2004. **Proceeding...** Iguassu Falls, Brazil. 2004.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.701–726, 1998.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: Embrapa Soja, 1985. 10 p. (Embrapa Soja: Documentos).
- LEORA SOFTWARE. **Polo-PC: A user's guide to probit or logit analysis**. Berkeley, CA, USA : LeOra Software, 1987. 22 p.
- MORALES, L.; MOSCARDI, F.; KASTELIC, J.G.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PARO, F.E.; SOLDÓRIO, I.L. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 593-598, 1995.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide statistics**. Cary, 2004.
- SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.P.; SOTONE, T.B.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.I. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M. (Ed.). **Molecular genetics and evolution pesticides resistance**, 1996. p. 229-242.
- SPECHT, A.; GUEDES, J.V.C.; SULZBACH, F.; VOGT, T. Ocorrência de *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 35, n.5, p. 705-706, 2006.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M.H. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootic and on populations of *Anticarsia gemmatalis*



Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 287-291, 2003.