



## SUSCETIBILIDADE DE *Anticarsia gemmatilis* (RESISTENTE E SUSCETÍVEL A TOXINA Cry1Ac) A INSETICIDAS BIOLÓGICOS À BASE DE *Bacillus thuringiensis*

GHOLMIE, M. A. R.<sup>1</sup>; LOPES, I. O. N.<sup>2</sup>; SOSA-GOMEZ, D. R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa, PR, mgholmie@gmail.com; <sup>2</sup>

<sup>3</sup>Embrapa-Soja, Londrina, PR.

O plantio nacional de soja, segundo dados da CONAB, apresentou aumento na área de 3,4%, saindo de 33.909,4 mil hectares na safra 2016/17 para 35.046,5 mil hectares, na 2017/18. Portanto, o manejo da cultura pode ter impactos econômicos e ambientais profundos. Dentre as principais lagartas desfolhadoras, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae), é uma das mais frequentes no Brasil. Até a introdução da soja Bt, os produtos que se usavam no controle da lagarta-da-soja eram inseticidas sintéticos e o baculovírus. A introdução da soja transgênica que expressa a toxina Cry1Ac no mercado foi uma alternativa importante para diminuir as aplicações de inseticidas químicos (Rahman et al., 2007). Algumas ferramentas como a implantação de áreas de refúgio devem ser utilizadas para retardar o aumento da frequência de alelos de resistência nas áreas cultivadas com plantas que expressam as proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (MacRae et al., 2005). A disponibilidade da toxina Cry1Ac em grandes áreas leva a principal preocupação com a seleção de fenótipos resistentes a esta toxina. Muitos fatores podem estar relacionados ao desenvolvimento da resistência, por isso há necessidade de estudos relacionados a suscetibilidade desses insetos a diferentes toxinas Cry. Muitos produtos comerciais formulados a partir de *B. thuringiensis* estão hoje disponíveis no país e na sua grande maioria estão constituídos por cepas da bactéria que apresentam diferentes toxinas em proporções variáveis. O bioinseticida com maior alcance no mercado mundial é o Dipel® (*B. thuringiensis kurstaki* HD-1). Este produto, pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é altamente eficiente contra mais de 170 lepidópteros-praga (Glare & O'Callaghan, 2000).

Esse trabalho teve como objetivo determinar a suscetibilidade de populações resistentes (taxa de resistência = 383x) e populações suscetíveis à toxina Cry1Ac da espécie *Anticarsia gemmatilis* aos inseticidas biológicos Dipel®, Agree® e Xentari®, por meio de bioensaios de incorporação dos produtos na dieta artificial. As colônias dos insetos utilizados para os experimentos foram estabelecidas na Embrapa-Soja. Os adultos foram mantidos em gaiolas para oviposição e as lagartas foram criadas em dieta artificial de Greene et al. (1976), a temperatura de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidades e fotoperíodo de 14L:10E, conforme protocolo de Hoffmann-Campo et al. (1985). A suscetibilidade foi avaliada por meio de bioensaios com sete concentrações de cada produto em cada uma das populações (Tabela 1), na testemunha não foi utilizado bioinseticidas. A dieta foi distribuída em bandejas plásticas (32 células, Empresa: Advento do Brasil) e após a sua solidificação, duas lagartas de terceiro instar foram transferidas para cada célula da bandeja; o total de lagartas por bioensaio encontra-se na Tabela 2. As bandejas foram mantidas em câmaras BOD a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$ , com fotoperíodo de 14L:10E. Para fins de contagem de mortalidade, foram consideradas apenas as lagartas mortas até o sétimo dia após a inoculação, e que apresentavam sintomas da infecção. A análise de dados foi realizada utilizando-se o modelo Weibull-2 (Ritz, 2010), que na parametrização utilizada corresponde ao modelo linear generalizado com função de ligação complemento log-log. Essa classe de modelos é especialmente útil quando a distribuição dos dados é assimétrica em relação à média. A análise foi executada no ambiente R, utilizando para o ajuste dos modelos e estimativas das concentrações letais o pacote drc (Ritz et. al, 2015).



Conforme consta na Tabela 2, o produto biológico comercial que apresentou maior atividade biológica, tanto na população resistente como na suscetível, foi o Xentari<sup>®</sup>, uma vez que este apresentou o maior incremento de mortalidade em torno da CL<sub>50</sub>, para cada micrograma do produto por mililitro da dieta oferecida. O bioinseticida com menor atividade biológica foi o Dipel<sup>®</sup>, que resultou no menor incremento de mortalidade por unidade de concentração. Observando a razão entre as doses letais 50 dos indivíduos resistentes e indivíduos susceptíveis, o Dipel<sup>®</sup> apresentou atividade aproximadamente 42 vezes menor na população resistente a Cry1Ac que na suscetível, enquanto essas proporções para o Agree<sup>®</sup> e o Xentari<sup>®</sup> foram aproximadamente 18 e 11. Embora o Dipel<sup>®</sup> tenha apresentado a maior atividade biológica em populações susceptíveis, seu desempenho foi drasticamente inferior na população resistente. As diferenças na toxicidade entre formulações considerando uma mesma população podem ser devidas a presença ou ausência de toxinas Cry biologicamente ativas, também devida às diferenças nas proporções das toxinas entre os produtos, a efeitos sinérgicos ou aditivos entre as toxinas nos produtos e também diferentes lotes dos produtos podem variar quanto ao seu potencial biológico (Takelar & Shelton, 1993). Entretanto, as empresas durante o processo de controle de qualidade verificam as proporções no seus ingredientes ativos. O Dipel (WP)<sup>®</sup> é composto pelo *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, linhagem HD-1, e apresenta as toxinas Cry1Aa, 1Ab e 1Ac, tendo em maiores quantidades a Cry1Ab e Cry1Ac. Já o Agree<sup>®</sup> é composto pelo *B. thuringiensis* var. *aizawai*, linhagem GC-91 que apresenta principalmente a toxina Cry1Ac, e em menor quantidade a Cry1C e 1D. O Xentari<sup>®</sup> (*B. thuringiensis* var. *aizawai*) possui as toxinas Cry1Aa, 1Ab, 1C e 1D (Valent BioScience Corporation, 2009). As toxinas podem ainda atuar individualmente ou em conjunto, o que pode potencializar a toxicidade individual de cada toxina em cada produto (Xue et al., 2005; Wei et al., 2015) ou a combinação das toxinas pode reduzir o efeito inseticida (Ameen et al., 1998; Garbutt et al., 2011), provavelmente pela competição por um mesmo receptor no intestino da lagarta (Gómez et al., 2007).

As diferenças na suscetibilidade podem ter como principal causa a presença ou ausência de receptores específicos para as toxinas Cry nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio da lagarta (Gómez et al., 2007). Qualquer interferência associada ao modo de ação do Bt auxilia na sobrevivência do inseto e, portanto, no desenvolvimento da resistência (Tabashnik, 1994). A menor suscetibilidade de *A. gemmatalis* resistentes para todas as cepas de *B. thuringiensis* ensaiadas neste estudo indica maior risco de utilizar produtos a base destas bactérias nas áreas de refúgio.

### Referências

- AMEEN, A. O.; FUXA, J. R.; RICHTER, A. R. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, v.33, p.129-134, 1998.
- GARBUTT, J.; MICHAEL, B. B.; WRIGHT, D. J.; RAYMOND, B. Antagonistic competition moderates virulence in *Bacillus thuringiensis*. **Ecological Letters**, Malden, 2011.
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester, **John Wiley & Sons**, p. 350, 2000.
- GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, New York, v. 28, p. 169-173, 2007.
- GREENE, G. L.; LEPLA N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** v. 69, n. 4, p. 488-497, 1976.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), **EMBRAPA/CNPSo**, Documentos p. 10, 1985.



MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A. G.; GAMUNDI, J. C.; HARRISON, L. A.; KABUYE, V. T.; MCPHERSON, R. M.; MIKLOS, J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology** v.98, n.1, p. 577-587, 2005.

RAHMAN, M. M.; RASHID, H.; SHAHID, A. A.; BASHIR, K.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN S. Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Electronic Biotechnology**, v.10, n.2, p. 241-251, 2007.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.39, p.47-79, 1994.

TAKELAR, N. S.; SHELTON, A. M. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.38, p.275-301, 1993.

VALENT BIOSCIENCE CORPORATION. Simply the best-balanced attack against your lepidopteran pests. **Folder**, p. 3, novembro, 2009.

WEI, J.; GUO, Y.; LIANG, G.; WU, K.; ZGANG, J.; TABASHNIK, B. E.; LI, X. Cross resistance and interactions between Bt toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. **Scientific Reports**. Tokyo, v.5, 7714, 2015.

XUE, J. L.; CAI, Q. X.; ZHENG, D. S.; YUAN, Z. M. The synergistic activity between Cry1Aa e Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.40, p.460-465, 2005.

RITZ, C. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry** v.29, n.1, p. 220-229, 2010.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **PLOS ONE**, v.10, n. 12, 2015.

**Tabela 1.** Concentrações de cada produto ( $\mu\text{g}$  i.a./ml de dieta) utilizadas nos bioensaios para cada população.

<i>A. gemmatalis</i> - Suscetível			<i>A. gemmatalis</i> – Resistente		
Agree®	Dipel®	Xentari®	Agree®	Dipel®	Xentari®
1,30	0,11	1,78	13,20	1,68	12,85
1,95	0,17	2,32	20,00	2,52	16,74
2,95	0,25	3,00	29,60	3,79	21,70
4,45	0,38	3,94	44,45	5,68	28,20
6,70	0,57	4,86	66,70	8,53	36,72
10,00	0,85	5,13	100,00	12,80	47,80
15,00	1,28	6,64	150,00	19,20	62,10

**Tabela 2.** Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* resistentes e suscetíveis a produtos comerciais formulados com cepas de *Bacillus thuringiensis*. N=número de insetos;  $b$ =taxa de variação na mortalidade nas proximidades da  $CL_{50}$ , quando se altera  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do produto na dieta;  $CL_{50}$ =concentração letal para 50% dos indivíduos;  $\hat{\sigma}_b$ =Erro padrão da estimativa de  $b$ ;  $\hat{\sigma}_{CL_{50}}$ = Erro padrão da estimativa da  $CL_{50}$ ; IC=Intervalo de confiança para a  $CL_{50}$ .

Produto	População	N	$b \pm \hat{\sigma}_b$	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	$\hat{\sigma}_{CL_{50}}$	95% – IC	$\frac{CL_{50}(R)}{CL_{50}(S)}$
Agree®	S	1080	$1,24 \pm 0,27$	2,88	0,95	1,03-4,74	18,06
	R	1080	$1,44 \pm 0,23$	52,09	18,97	14,91-89,27	
Dipel WP®	S	600	$1,12 \pm 0,15$	0,25	0,09	0,08-0,43	41,55
	R	720	$1,11 \pm 0,14$	10,42	3,57	3,41-17,42	
Xentari®	S	1080	$1,93 \pm 0,28$	2,36	0,57	1,24-3,49	10,89
	R	720	$1,85 \pm 0,14$	25,75	5,25	15,46-36,03	

\* $b$  é diretamente proporcional ao incremento de mortalidade nas proximidades da  $CL_{50}$ .