

Efeito da zigosidade de híbridos de milho Bt em *Spodoptera frugiperda*

Matheus Venicio Campos dos Santos², Simone Martins Mendes³, Roberto dos Santos Trindade³, Luciano José Lourençon⁴, Marcos Vinícius Campos dos Santos⁴, Patrick Ferreira⁴

¹Trabalho financiado pelo CNPq. ² Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ³ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo. ⁴ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Fed. de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa

Introdução

Spodoptera frugiperda (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-do-cartucho, é uma praga polífaga de grande voracidade, causando prejuízo econômico em algumas plantas de importância agrícola (Boregas et al., 2013). Em milho, pode causar perdas de 17 a 39% na produção, variando de acordo com o ambiente, a cultivar e, principalmente, o estágio de desenvolvimento e nutricional das plantas atacadas (Cruz, 1995).

O milho geneticamente modificado (GM) ou milho Bt é uma estratégia de controle de pragas utilizada dentro dos preceitos do MIP (Manejo Integrado de Pragas). Por meio de técnicas biotecnológicas, pesquisadores inseriram um gene da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) em plantas de milho. Esse gene inserido codifica a expressão de proteínas Bt, com ação inseticida, efetiva no controle de lepidópteros (Lourenção et al., 2009; Sousa et al., 2016).

As primeiras lavouras de milho Bt foram cultivadas no Brasil na safra agrícola de 2009/2010, com milho expressando a proteína Cry1Ab (Mendes et al., 2011). Em 2010 já foi possível cultivar milho expressando diferentes proteínas para o controle de lagartas, como a Cry1F e Cry1A105+Cry2Ab2. Contudo, Farias et al. (2014) registraram populações resistentes a proteína Cry1F, apenas dois anos após o lançamento dos híbridos no mercado. Essa proteína está presente em várias tecnologias, como Herculex, PowerCore e outras. Estão catalogados, no Arthropod Pesticide Resistance Database (2020), seis registros de resistência dessa praga a proteínas Bt em todo mundo e também no Brasil. Assim, um dos desafios encontrados para o manejo de *S. frugiperda* é trabalhar técnicas e estratégias que retardem a evolução da resistência no campo.

Em genética, o termo zigosidade se refere à similaridade ou dissimilaridade de ADN (Wikipedia, 2020) entre cromossomos homólogos em uma específica posição alélica ou gene. Por sua vez, os termos homocigoto, heterocigoto e hemizigoto são usados para simplificar a descrição do genótipo de um organismo diploide em um único locus genético. De maneira geral, os híbridos de milho transgênicos disponíveis no mercado, são hemizigotos para o transgene, ou seja, possuem somente um alelo com o evento transgênico (Guadagnuolo et al., 2006). Um híbrido com a transgenia em homocigose é obtido através do cruzamento de duas linhagens transgênicas, assim, formam-se híbridos que podem expressar proteínas transgênicas em maior dose, por possuírem dois alelos com o evento transgênico (Howard; Hood, 2014). Assim o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da zigosidade em variáveis biológicas de *S. frugiperda* e na nota de injúria causada pela alimentação da praga em casa de vegetação.

Material e Métodos

O presente experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo. As larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* utilizadas nos bioensaios foram oriundas de criação de manutenção em laboratório há quatro gerações, coletadas na região de Lavras-MG.

Como cultivar para teste, foram utilizadas três versões do híbrido simples de milho experimental 1F640. Uma versão do híbrido com os alelos do gene Bt em homocigose (ambas as linhagens parentais eram Bt), hemizigose (apenas uma das linhagens parentais é Bt) e uma versão não Bt (as duas linhagens do híbrido simples estão na forma convencional). A tecnologia Bt avaliada foi o evento MON 89034, que codifica a expressão das proteínas Cry 1A105+Cry2Ab2.

Foram plantados em casa de vegetação 24 vasos de 10 litros para cada linhagem, sendo mantidas duas plantas por vaso. Cada vaso representou uma repetição, totalizando vinte e quatro repetições por tratamento, distribuídas de forma inteiramente casualizada.

Quando as plantas se encontravam no estágio vegetativo V4, realizou-se a infestação. Cada planta foi infestada com dez lagartas recém-eclodidas. As avaliações de injúria nas plantas, causadas pela infestação da lagarta, foram realizadas aos sete, quatorze e vinte e um dias, após infestação, através de escala de Davis (1992), que vai de zero, com ausência total de injúrias, até nove, em que as plantas estão totalmente destruídas.

Aos 21 dias após a infestação foi realizada a avaliação final do ensaio, em que foram contadas as lagartas sobreviventes, para cálculo do percentual de sobrevivência de cada vaso. Também foi avaliada a biomassa das lagartas sobreviventes em balança de precisão, sendo que para o tratamento não Bt foram consideradas 28 lagartas e para o Bt em hemizigose, 15 lagartas; essa diferença foi em função dos insetos sobreviventes. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram

comparadas pelo intervalo de confiança (IC) a 5% de probabilidade (equivale ao teste T).

Resultados e Discussão

As notas de injúria causadas pela alimentação de *S. frugiperda* foram diferentes para todas as épocas avaliadas em todas as versões do híbrido 1F640 (Figura 1). Interessante observar que a versão convencional do híbrido 1F640 apresentou maiores notas de injúria para todas as datas avaliadas, sendo que as notas foram acima de sete para as duas últimas avaliações, mostrando que a injúria permanece alta e constante após os 14 dias de infestação. A redução da nota de injúria em híbridos de milho Bt já foi mostrada por Araújo et al. (2014) e Santos et al. (2017), dados que corroboram os verificados no presente estudo.

Já entre os híbridos expressando a tecnologia Bt também foi possível verificar diferença significativa na nota de injúria (Figura 1). Para a versão do híbrido 1F640 que expressa a tecnologia Bt em homozigose, a nota de injúria foi mais baixa em todas as datas de avaliação, ficando sempre abaixo de 0,5. Já a versão do híbrido 1F640 em hemizigose apresentou nota significativamente superior à do híbrido em homozigose, ficando entre 1,5 e 2,5 para as três avaliações (Figura 1). Também foi possível observar que as diferenças até os 14 dias após a infestação não foram significativamente diferentes dos 21 dias após a infestação, mesmo com o maior desenvolvimento da lagarta aos quatorze e vinte e um dias, consumindo maior área foliar das plantas e possibilitando assim melhor distinção entre os genótipos. Carvalho et al. (2014) também encontraram diferentes valores para os danos causados por essa espécie em diferentes genótipos de milho, indicando a importância da resistência de plantas para tal cultura.

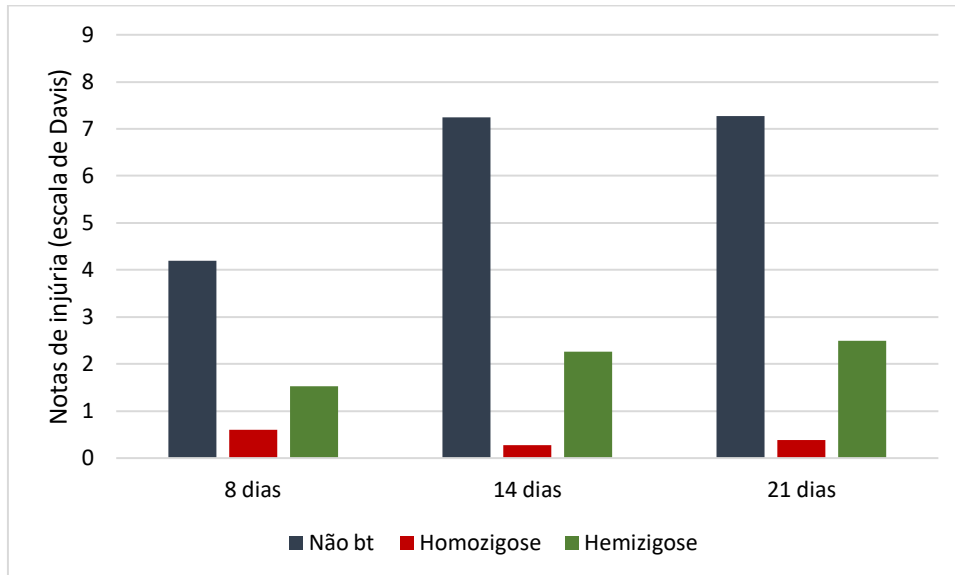


Figura 1. Notas média de injúrias na escala de Davis, avaliadas 7, 14 e 21 dias após a infestação de *S. frugiperda* em plantas do híbrido experimental 1F640 em homozigose, hemizigose e com ausência de genes Bt. Sete Lagoas-MG, julho 2020.

A porcentagem de sobrevivência de *S. frugiperda* foi abaixo de 10% para todos os tratamentos avaliados. Houve diferença significativa entre os tratamentos. Contudo, a sobrevivência para a versão não Bt do híbrido 1F640 foi significativamente diferente da versão do híbrido Bt em hemizigose. Por sua vez, o híbrido 1F640 com o gene Bt em homozigose diferiu significativamente da versão em hemizigose e da versão não Bt (Figura 2). Silveira et al. (1997) encontraram diferença na sobrevivência de *S. frugiperda* em diferentes linhagens de milho, contudo, a menor sobrevivência encontrada foi de 56% em condições de laboratório, e o presente estudo foi realizado em casa de vegetação, onde a arquitetura da planta e outros fatores, como resistência natural, interferem na sobrevivência. Santos et al. (2017) encontraram baixos valores para sobrevivência em casa de vegetação, contudo os valores encontrados no presente estudo são ainda menores, indicando necessidade de avaliações mais detalhadas em futuros ensaios.

Quando observada a biomassa média das lagartas aos 21 dias após infestação, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos. As lagartas oriundas do tratamento não Bt apresentaram maior valor de biomassa que os demais. Já aquelas lagartas do tratamento Bt em hemizigose apresentaram biomassa 40% inferior ao tratamento convencional. Como não houve sobreviventes para o tratamento em homozigose, não foi possível avaliar a biomassa.

Apesar da necessidade de mais estudos para corroborar o efeito da zigosidade na expressão da proteína Bt em milho transgênico, os dados obtidos no presente trabalho

indicam que a presença de eventos Bt em todos os parentais que compõem um híbrido pode ser uma estratégia para aumentar a expressão do evento Bt, e, conseqüentemente, sua eficiência para redução da pressão de infestação da praga no campo.

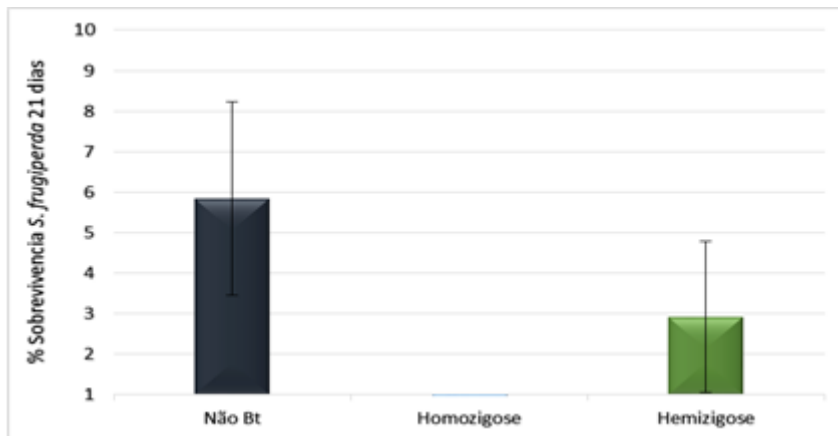


Figura 2. Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda* (\pm IC, $P=0,05$) em híbridos de milho expressando o evento MON 89034 em homozigose, hemizigose e não Bt. Avaliado em casa de vegetação 21 dias após infestação. Sete Lagoas - MG, julho 2020.

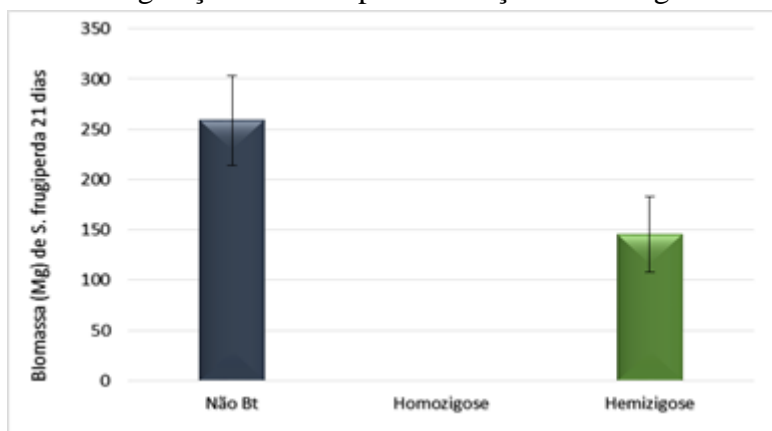


Figura 3. Biomassa (Mg) de *Spodoptera frugiperda* (\pm IC, $P=0,05$) em híbridos de milho expressando o evento MON 89034 em homozigose, hemizigose e não Bt. Avaliado em casa de vegetação, 21 dias após a emergência das larvas. Sete Lagoas-MG, julho 2020.

Conclusão

Considerando-se versões do híbrido simples experimental 1F640 em que o evento Bt está em homozigose, hemizigose ou ausente, a nota de injúria, a sobrevivência e a biomassa de *Spodoptera frugiperda* foram menores no tratamento com evento Bt em homozigose genética, podendo ser esta uma estratégia para aumentar

a expressão da proteína Bt, e, conseqüentemente, sua eficiência na redução da pressão de infestação da praga no campo.

Referências

ARAÚJO, O. G.; MENDES, S. M.; ROSA, A. P. S. A. da; MARUCCI, R. C.; SANTOS, C. D. dos; BARBOSA, T. A. N.; DIAS, A. S.; CARVALHO, S. S. de S. **Aspectos biológicos de populações de *Spodoptera frugiperda* em milho Bt e arroz.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 23 p. il. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 101).

ARTHROPOD Pesticide Resistance Database. Disponível em: <<https://www.pesticideresistance.org>>. Acesso em: 13 maio 2020.

BOREGAS, K. G. B.; MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, G. W. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 61-70, 2013.

CARVALHO, S. S. S.; CARVALHO, E. A. R.; SANTOS, A. E. dos; SILVA, L. O.; MENDES, S. M.; MENEZES, C. B. Resistência de linhagens de sorgo à *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 30.; SIMPÓSIO SOBRE LEPDÓPTEROS COMUNS A MILHO, SOJA E ALGODÃO, 1., 2014, Salvador. **Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global: resumos expandidos.** Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. 45 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 21).

DAVIS, F. M.; NG, S. S.; WILLIAMS, W. P. **Visual rating scales for screening whorl-stage maize for resistance to fall armyworm.** Mississippi State: Mississippi State University, 1992. (Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station. Bulletin, 9).

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C. dos; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150-158, 2014.

GUADAGNUOLO, R.; CLEGG, J.; ELLSTRAND, C. Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. **Ecological Applications**, v. 16, n. 5, p. 1967-1974, 2006.

HOWARD, J. A.; HOOD, E. E. **Commercial plant-produced recombinant protein**

products: case studies. Berlin: Springer-Verlag, 2014. 281 p.

LOURENÇÃO, A. L. F.; BARROS, R.; MELO, E. P. D. Milho Bt: uso correto da tecnologia. In: TECNOLOGIA e produção: milho safrinha e culturas de inverno 2009. 5. ed. Maracaju: Fundação MS, 2009. 120 p.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M. S.; WAQUIL, J. M. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 239-244, mar. 2011.

SANTOS, F. A.; VILELA, M.; MORAIS, J. C. de; MENDES, S. M. **Silício como estratégia para o manejo de *Spodoptera frugiperda***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017. 22 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 160).

SILVEIRA, L. C. P.; VENDRAMIM, J. D.; ROSSETTO, C. J. Efeito de genótipos de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 2, p. 291-298, 1997.

SOUSA, F. F.; MENDES, S. M.; SANTOS-AMAYA, O. F.; ARAÚJO, O. G.; OLIVEIRA, E. E.; PEREIRA, E. J. Life-history traits of *Spodoptera frugiperda* populations exposed to low-dose Bt maize. **PloS One**, v. 11, n. 5, e0156608, 2016.

WIKIPÉDIA, **Zigossidade**. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Zigossidade#:~:text=Zigossidade%20%C3%A9%20tamb%C3%A9m%20usada%20para,%20Dse%20em%20dois%20embri%C3%B5es>>. Acesso em: 20 maio 2020.

Literatura Recomendada

CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação populacional, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo**. 1970. 170 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1970.

CÉLERES. **2º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil: safra 2016/2017**. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/2o-levantamento-de-adoçao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>>. Acesso em: 10 maio 2020.

GILL, S. S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Memórias do**

Instituto Oswaldo Cruz, v. 90, n. 1, p. 69-74, 1995.

LOURENÇÃO, A. L. F. **Avaliação do milho Bt CRY1AB e CRY1F no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em condições de campo.** 2011. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2011.

RAMIRO, C. A. **Análise da variabilidade genética de populações de *Spodoptera frugiperda* em culturas de milho e algodão por meio de marcadores moleculares.** 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.