

Aspectos Biológicos de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) Desenvolvida em Milho Bt e Não Bt

Oliveira, K.B¹., BORTOLOTTI, O.C²., QUEIROZ, A.P³., SILVA, G.V²., BARBOSA, G.C⁴., CRUZ, S. Y³., POMARI, A.F⁵., SANZOVO, A³., BUENO, A.F⁶., Silva, m. e.⁴ ¹Universidade Norte do Paraná, ²Univesidade Federal do Paraná, ³Universidade Estadual do Norte do Paraná, ⁴Centro Universitário Filadélfia, ⁵Universidade de São Paulo, ⁶Embrapa Soja. Londrina, Paraná, e-mail: karla.braga@cnpsa.embrapa.br.,

Introdução

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é cultivada em diversos países do mundo, e no Brasil se destaca por ser uma das principais commodities agrícolas. Entretanto, dentre os principais fatores limitantes do cultivo desse cereal se destaca os problemas fitossanitários, como a ocorrência de lepidópteros desfolhadores. Por esta razão, a o uso de híbridos resistentes à insetos tem ocupado grande espaço no cenário nacional e mundial, por ser uma eficiente tática do manejo integrado de pragas (James, 2009). O milho geneticamente modificado resistente à pragas expressa a proteína inseticida da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berlinier (Bt) no tecido da planta. Esse advento tecnológico foi desenvolvido principalmente para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), porém também pode apresentar impacto sobre outros lepidópteros-praga (Van den Berg & Wyk (2007). Dentre as vantagens do cultivo de milho Bt se destaca a redução no uso de inseticidas nas lavouras, o que contribui com o menor impacto ambiental (Wang et al., 2004). Embora essa ferramenta seja bastante eficiente na regulação populacional da praga-alvo, a redução no uso de agrotóxicos pode favorecer a incidência de pragas-não-alvo. Nesse sentido, atualmente muitos produtores tem observado o crescimento populacional de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) em lavouras de milho, principalmente nas áreas onde cultiva-se a tecnologia Bt. Esse fato tem deixado os produtores em alerta, pois o inseto pode estar encontrando condições favoráveis nas lavouras de milho Bt para o seu desenvolvimento. As razões que podem favorecer o crescimento populacional de pragas não-alvo são o menor uso de inseticidas e também a menor competição por alimento com outras pragas (Zeilinger et al. 2011). Porém ainda são escassas as informações a respeito do impacto da tecnologia Bt sobre pragas não-alvo Desse modo, devido a necessidade de esclarecer esta relação trófica, o objetivo desse estudo foi avaliar os aspectos biológicos de *S. eridania* desenvolvida em milho Bt e não Bt, para que possa ser possível indicar um manejo apropriado para a regulação populacional da praga.

Material e Métodos

Esse estudo foi realizado na Embrapa Soja, em câmaras climatizadas do tipo BOD, reguladas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. As lagartas de *S. eridania* utilizados no provieram da criação da própria instituição, mantidas há aproximadamente 20 gerações.

As isolinhas de milho utilizadas no estudo foram um milho híbrido não Bt (2B688) e as isolinhas Bt Herculex® I (companhia Dow Agrosiences) e Powercore™ (companhia Dow Agrosiences em parceria com a Monsanto). O milho Herculex* I (evento TC1507) expressa o gene inseticida

cry1F, enquanto o milho Powercore™ (evento MON89034 × DAS01507 × MON00603) expressa cinco genes estaqueados, sendo três inseticidas: cry1F + cry1A.105 + cry2Ab2, e dois herbicidas (EPSPS + PAT) que conferem tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato (Santos et al., 2012).

Em casa de vegetação foi realizada a semeadura das plantas em vasos de 8L, contendo terra esterilizada. Para cada isolinha utilizou-se 15 vasos, onde foram colocadas cinco sementes em cada, totalizando 75 plantas.linhagem⁻¹. O molhamento do substrato (terra esterilizada) ocorreu imediatamente antes e após a semeadura, de modo a garantir a distribuição homogênea da umidade dentro dos vasos. Posteriormente, a vistoria e irrigação das plantas foram realizadas diariamente. O manejo nutricional do milho foi realizado com adubação de sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄] seguindo as recomendações técnicas da região (Rodrigues & Neto, 2011). As técnicas de manejo fitossanitário (herbicidas, fungicidas ou inseticidas) não foram realizadas durante o ciclo da cultura, para não ter influência de outros fatores no estudo

A coleta de folhas para oferta às lagartas ocorreu no milho a partir do estágio 2 (plantas com oito folhas distendidas) (Francelli & Dourado-Neto, 2000), que foram cortadas em pedaços com área aproximada de 30 cm² para serem ofertadas as lagartas. Em seguida, as folhas de milho foram submetidas a um processo de higienização, sendo submersas em solução de água e hipoclorito de sódio (5%) por 15 min. Após esse período, as folhas foram retiradas da solução e secas por 30 min, até a evaporação da solução antes do material ser ofertado às lagartas.

Bioensaios 1 e 2: aspectos biológicos de *S. eridania* de 1º e 3º instares em milho Bt e não Bt

Bioensaio 1: no bioensaio de primeiro instar, lagartas recém eclodidas (até 24 h de vida) foram individualizadas em copos parafinados de 50 mL em cada tratamento, com auxílio de um pincel de ponta fina (0,6 mm). Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três tratamentos (híbrido não Bt 2B688 e duas isolinhas Bt, Herculex e Power-core) com 10 repetições compostas por oito lagartas individualizadas (80 lagartas. tratamento⁻¹). Dentro de cada copo foi ofertada uma área foliar de 30 cm². lagarta⁻¹ Na base de cada folha foi colocado um chumaço de algodão embebido em água, para retardar o ressecamento das folhas, que foram trocadas diariamente, junto à avaliação do instar larval e a taxa de mortalidade dos indivíduos.

Bioensaio 2: Nesse bioensaio as lagartas foram mantidas em dieta artificial (Greene et al. 1976) até atingirem o terceiro instar, quando foram transferidas para os respectivos tratamentos. A partir desse momento, utilizou-se a mesma metodologia descrita no bioensaio 1.

Bioensaio 3 aspectos biológicos e consumo foliar de *S. eridania* de 5º instar em milho Bt e não Bt

Seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente para os bioensaios com *S. eridania* de 1º e 3º instares, as lagartas foram mantidas em dieta artificial até atingirem o 5º instar, quando foram individualizadas em copos parafinados e ofertada a área foliar de milho para seu consumo. Como houve sobrevivência larval das lagartas de 5º instar e, conseqüentemente consumo foliar, a área consumida por *S. eridania* nos diferentes híbridos de milho foi mensurada. Paralelamente, utilizou-se uma testemunha (com ausência da praga) para avaliar a redução foliar devido a uma possível desidratação, que apresentou a média de 5% de redução da área foliar, permitindo corrigir a área consumida. As avaliações da área consumida pelas lagartas ocorreram diariamente, utilizando-se o equipamento de medição foliar modelo LICOR 300 até os insetos morrerem ou cessaram a alimentação.

Bioensaios 4 e 5: aspectos biológicos de *S. eridania* e *S. frugiperda* em grãos de milho Bt e não Bt e comparação da taxa de consumo

As lagartas neonatas foram individualizadas de acordo com a metodologia descrita no bioensaio 1. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (híbrido não Bt 2B688 e isolinhas Bt, Herculex e Power-core) e cinco repetições, compostas por 11 lagartas individualizadas. Para alimentação dos insetos ofertou-se grãos imaturos de milho *ad libitum* até completarem a fase larval (fase de pré-pupa).

Quando os insetos atingiram o 5º instar, procedeu-se a mensuração do consumo de grãos de milho, por meio de pesagem diária do alimento, antes e após (24 h) ser ofertado para a praga. Para correção do peso de grãos consumido, foi utilizada uma testemunha (com ausência de lagarta), e foi registrada uma perda média de 7% de peso por desidratação.

O instar larval e a taxa de mortalidade de ambas as espécies foram avaliados diariamente. No intervalo de 24 h após os insetos atingirem a fase de pupa, as mesmas foram separadas por sexo e pesadas (g) com uso de balança analítica. Nesse bioensaio foram comparados os seguintes parâmetros biológicos: duração da fase jovem (em dias), taxa de mortalidade (%), peso de pupa (g) e razão sexual de *S. eridania* e *S. frugiperda*.

Análises estatísticas

Os resultados dos diferentes bioensaios foram submetidos às análises exploratórias para avaliar as pressuposições de normalidade dos resíduos (Shapiro & Wilk 1965), a homogeneidade de variância dos tratamentos e a aditividade do modelo (Burr & Foster 1972) para permitir a aplicação da ANOVA. As médias foram então comparadas pelo teste de Tukey para os ensaios realizados com a área foliar do milho, exceto para a comparação dos parâmetros biológicos de *S. eridania* e *S. frugiperda* onde se empregou o teste *t* de Student (SAS Institute 2001). Para ambas a análise considerou-se diferença significativa quando $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

De forma geral, verificou-se que a parte vegetativa (área foliar) e reprodutiva (grãos frescos) de milho Bt prejudicam o desenvolvimento de *S. eridania*. Entretanto, a área foliar Bt e não Bt foram inapropriadas para a praga, pois não permitiu o desenvolvimento da mesma. Por outro lado, quando a praga alimentou-se de grãos imaturos de milho não Bt foi possível completar a fase jovem.

Quando as lagartas recém eclodidas de *S. eridania* alimentaram-se da área foliar de milho Bt, morreram mais rapidamente do que as desenvolvidas na isolinha não Bt (Tabela 1), porém a taxa mortalidade foi de 100% em todos os tratamentos, com longevidade inferior a dois dias.

Resultados semelhantes foram observados com as lagartas de 3º instar, pois embora alguns indivíduos tenham realizado ecdise, a praga não conseguiu completar a fase jovem em nenhum tratamento. Assim como observado no bioensaio com lagartas neonatas, novamente verificou-se que as isolinhas Bt aceleraram a morte da praga (Tabela 1).

A má qualidade nutricional da área foliar do milho foi comprovada com o estudo dos aspectos biológicos das lagartas de 5º instar, onde também registrou-se 100% de mortalidade da praga em todos os tratamentos (Tabela 1). As lagartas que se alimentaram da área foliar do milho Powercore tiveram 85% de mortalidade antes de realizarem a ecdise, enquanto nas isolinhas Herculex e não Bt essa taxa foi de apenas 25 e 15%, respectivamente. Apesar dessa diferença, nenhuma lagarta que atingiu o 6º instar conseguiu empupar, evidenciando a má qualidade nutricional do alimento para a espécie.

O impacto dos eventos Bt sobre a praga ficou mais claro quando comparado o consumo foliar, que foi superior na isolinha não Bt, enquanto Powercore e TC1507 não diferiram entre si (Tabela 1). Porém, deve-se considerar que as lagartas não atingiram a fase de pupa em nenhum tratamento, demonstrando que a área foliar de milho não apresenta condições nutricionais apropriadas para o desenvolvimento de *S. eridania*. Embora estudos relatem que a espécie *S. eridania* ocorra em lavouras de milho, o presente trabalho demonstra que a praga tem baixo potencial biótico quando se alimenta somente da área foliar dessa cultura. Assim, a sua ocorrência nas lavouras de milho pode ser atribuída à outros fatores, como por exemplo outras plantas hospedeiras que podem estar servindo de alimento para a praga.

Essa hipótese é ratificada pelo fato de que foi observado que as lagartas de 1° e 3° instar praticamente não ocasionaram injúrias foliares no milho, mesmo quando ofertado o híbrido não Bt. Os autores Tingle et al. (1978) encontraram lagartas de *S. eridania* alimentando-se de caruru (*Amaranthus hybridus*) em lavouras de milho, e raramente observaram a praga atacando as plantas cultivadas. Outra planta invasora que ocorre em lavouras de milho e apresenta condições nutricionais que permitem o desenvolvimento da praga é a corda-de-viola (*Ipomea grandiflora*) (Santos et al. 2005). Assim, dentro do contexto do MIP, a manutenção de plantas espontâneas que são hospedeiras de pragas, pode ser benéfica, pois a sua eliminação poderá potencializar os danos da praga. Assim, o manejo adequado das plantas daninhas antes e logo após o a semeadura podem consistir num importante fator para redução de pragas secundárias na cultura do milho. Essas hipóteses, entretanto, precisam a ser mais bem investigadas estudando o comportamento e a migração dessa praga em condições de campo.

Tabela 1. Aspectos biológicos de *S. eridania* alimentada com área foliar de isolinhas de milho Bt e não Bt. Londrina, 2012.

Milho	Bioensaios 1 e 2		Bioensaio 3
	Sobrevivência (dias) ¹ [Mortalidade %]		Consumo foliar (cm ²)
	1° instar	3° instar	5 - 6° ínstars
2B688	1,7 ± 0,13 a [100]	3,69 ± 0,15 b [41]	58,87 ± 4,85 a
2B688 Herculex	1,0 ± 0,04 b [100]	4,83 ± 0,25 a [73]	42,20 ± 2,61 b
2B688 PowerCore	1,0 ± 0,06 b [100]	4,92 ± 0,08 a [95]	37,55 ± 2,38 b
CV (%)	19,48	12,50	16,78
GL _{resíduo}	27	27	12
F	21	16,14	10,45
P	<0,01	<0,01	<0,01

¹Médias ± EPM seguidas pela mesma letra na coluna do mesmo estágio de desenvolvimento do inseto não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). ^{ns}ANOVA não significativa.

Os grãos imaturos de milho Bt ofertados para *S. eridania* e *S. frugiperda* ocasionaram 100% de mortalidade das lagartas neonatas, que sobreviveram por menos de dois dias em ambos os eventos Bt, comprovando o impacto dessas proteínas para ambos lepidópteros. Porém, para as lagartas alimentadas com a isolinha não Bt verificou-se que ambas as espécies completaram a fase jovem (Tabela 2). A espécie *S. eridania* apresentou menor viabilidade larval, porém apresentou maior longevidade (Tabela 2) assim como maior taxa de consumo de grãos (Figura 1), entretanto, o peso de pupa foi significativamente inferior ao de *S. frugiperda* (Tabela 2). Entretanto, mesmo com maior mortalidade de *S. eridania* em relação à *S. frugiperda*, a praga apresentou maior taxa de consumo de grãos, o que demonstra que a ocorrência de *S. eridania* durante o espigamento da cultura poderá ocasionar perdas significativas de produção. Além do dano direto (consumo de grãos) a ocorrência da praga na espiga pode promover a infestação de microlepidópteros, permitir a infecção por doenças da espiga e contaminação por aflotoxinas (Rodríguez-del Bosque 1996, Rodríguez-del Bosque et al., 1998). Recentemente,

alguns estudos têm demonstrado que a presença da lagarta-da-maçã do algodão *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) em espigas de milho pode acarretar em perda de aproximadamente 14% do peso de espiga, além de afetar a proporção nutricional dos grãos, alterando os teores de gordura e proteína (Keszthelyi et al. 2011).

Tabela 2. Desenvolvimento larval e pupal de *S. eridania* comparado com *S. frugiperda* alimentada com grãos frescos de milho não Bt. Londrina, 2012.

Espécie	Duração da fase larval (dias)	Viabilidade larval (%)	Consumo (g)	Peso de pupa (g)
<i>S. eridania</i>	21,55 ± 0,73 a	56,40 ± 6,85 b	5,39 ± 0,31 a	0,26 ± 0,01
<i>S. frugiperda</i>	18,38 ± 0,78 b	80,20 ± 5,25 a	3,92 ± 0,32 b	0,29 ± 0,01
CV (%)	8,49	19,96	15,42	6,63
GL resíduo	8	8	8	8
F	8,77	7,61	10,34	7,31
P	0,01	0,02	0,01	0,03

¹Médias ± EPM seguidas pela mesma letra na coluna do mesmo estágio de desenvolvimento do inseto não diferem entre si pelo teste de *t* (*p*>0,05).

²ANOVA não significativa.

Isso pode ser justificado pela provável menor adaptação à cultura, uma vez que de forma geral a espécie *S. eridania* desenvolve-se melhor em culturas de famílias diferentes, que não sejam pertencentes ao grupo das Poacea. Isso pode justificar também a maior duração da fase jovem observado para *S. eridania* comparativamente à *S. frugiperda*, o que refletiu em maior consumo de grãos e conseqüentemente em maior peso de pupas do que *S. frugiperda*.

Conclusão

A fase jovem de *S. eridania* apresenta potencial para ocasionar danos em lavouras de milho não Bt, entretanto somente quando o ataque ocorrer nas espigas, pois a praga não consegue completar o seu desenvolvimento quando se alimenta da área foliar da cultura. Quando alimentadas com milho Bt, observa-se 100% de mortalidade para os espécimes alimentados com a área foliar ou grãos da espiga da planta.

Agradecimentos

À instituição financiadora Embrapa Soja, e à equipe de Entomologia pertencente ao Laboratório de Parasitoides.

Referências

BURR, I.W.; FOSTER, L.A. A test for equality of variances. **Mimeo Series**. University of Purdue, West Lafayette, 1972. p .26.

CAPINERA, J. L. Southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). University of Florida. 2005.

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

DEGRANDE, P.E. Guia prático de controle das pragas do algodoeiro. Dourados, UFMS, 1998. p.60.

FANCELLI, A.L. & D. DOURADO-NETO. Produção de Milho. Ed. Agropecuária, Guaíba. 2000. p.360.

GREENE, G. L., LEPPLA, N. C., DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium, **Journal of Economic Entomology**.1976. ed. 69, p. 487- 488.

JAMES, CLIVE. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**: ISAAA Brief N. 41. ISAAA: Ithaca, New York. 2009.

KESZTHELYI, S. PÁL-FÁM, F. KERESPESI, I. Effect of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hubner) caused injury on maize grain content, especially regarding to the protein alteration. **Acta Biologica Hungarica**. 2011 ed. 62. p.57-64.

MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p. 163-200.

RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, L. A. Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern Mexico. **Plant Disease**. 1996. ed. 80: p.988-993.

RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, L. A. Martinez, J. Downd, P.F. Effect of ear wounding and cultural practices on abundance of *Carpophilus freemani* (Coleoptera: Nitidulidae) and other microcoleopterans in maize in northeastern Mexico. **Journal of Economic Entomology**. 1998. ed 91. p.796-801.

RODRIGUES, L. R.; PINHEIRO MACHADO NETO, D. (Orgs.). REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE MILHO E SORGO. Porto Alegre: FEPAGRO, 2011. p.48.

SANTOS K B, NEVES P J, MENEGUIM A M. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepdoptera Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology**. 2005. ed.34. p.903-910.

SAVOIE, K. L. Selective feeding by species of *Spodoptera* (Lepdoptera: Noctuidae) In a bean field with minimum tillage. Turrialba. 1988. ed.38. p.67-70.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**. 1965. Ed. 52, p.591-611.

TINGLE, F. C.; ASHLEY, T. R.; MITCHELL, E. R. Parasites of *Spodoptera exigua*, *S. eridania* [Lep.: Noctuidae] and *Herpetogramma bipunctalis* [Lep.: Pyralidae] collected from *Amaranthus hybridus* in field corn. **Biocontrol**. 1978. ed.23 p.343-347.

VANDENBERG, J.; VAN WYK, A. The effect of Bt maize on *Sesamia calamistis* in South Africa. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 2007. Ed.12, p.45-51.

WANG, J. LIU, J.; WANG, X.; YAO, J.; YU, Z. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**. 2004. v.39, p.98-102.

ZEILINGER, A. R.; OLSON, D. M.; ANDOW, D. A. Competition between sting bug and heliothine caterpillar pests on cotton at within-plant spatial scales. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. 2011. Ed.141, p.59-70.