

EFEITOS SUBLETAIS DE *Bacillus thuringiensis* HD-73, QUE EXPRESSA A TOXINA CRY1AC, NA INFECÇÃO POR *Nomuraea rileyi* E NPVS DE NOCTUÍDEOS

WISCH, L.N.¹; FORTI, L.A.²; VILAS-BÔAS, G.T.F.L.³; SOSA-GÓMEZ, D.R.⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, CEP 84030-900 Ponta Grossa, PR, wisch022@hotmail.com | ²Universidade Norte do Paraná – UNOPAR | ³Universidade Estadual de Londrina – UEL | ⁴Embrapa Soja.

Nos últimos anos, tem se expandido a área cultivada no Brasil, de 50,9 milhões para 53,4 milhões de hectares, um acréscimo estimado em 4,2% na safra 2012/13 (CONAB, 2013). Cerca de 44,6 milhões de hectares são cultivadas com as principais commodities soja [*Glycine max* (L.) Merrill], milho (*Zea mays* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), sendo aproximadamente 37,1 milhões de hectares com plantas geneticamente modificadas. Dentre as tecnologias, a área com plantas resistentes a insetos é de aproximadamente 5,7 milhões e 0,2 milhões de ha para milho (verão e inverno) e algodão, respectivamente (GALVÃO, 2012). As plantas de soja-Bt, são capazes de produzirem níveis suficientes de proteínas cry, para controlar lepidopteros pragas, tais como as lagartas-falsas-medideiras, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) e *Rachiplusia nu* (Gueneé, 1852) (CTNBio, 2010). Entretanto não controla espécies de Spodoptera.

No Brasil, há previsão da liberação comercial da soja Bt para a próxima safra 2013/14, expandindo as áreas com disponibilidade a toxina Cry1Ac. A exposição da toxina a espécies de lagartas tolerantes poderá afetar sua sensibilidade à infecção por entomopatógenos. Portanto, nosso objetivo foi avaliar o efeito subletal da bactéria HD-73 que expressa a toxina Cry1Ac sobre a atividade dos entomopatógenos, o fungo *N. rileyi* e os vírus de poliedrose nuclear (NPV), em três espécies de Noctuídeos, *C. includens*, *R. nu* e *Spodoptera eridania*.

Lagartas de *C. includens*, *R. nu* e *S. eridania* obtidas da criação da Embrapa Soja foram inoculadas com *N. rileyi*, isolado CNPSo-Nr10, e os baculovírus de *C. includens* (PsinSNPV), de *R. nu* (RanuNPV) e *S. eridania* (*S. eridania* NPV). Os bioensaios foram realizados com a cepa HD-73 (Cry1Ac) de *B. thuringiensis*, liofilizada. *Nomuraea rileyi* foi cultivado “in vitro” em meio de

cultura Smay (sabouraud, maltose, ágar e levedura) contendo hemolinfa a 2% das respectivas espécies em estudo, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 horas.

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições. A concentração de HD-73 foi de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e $66,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. includens*, *R. nu* e *S. eridania*, respectivamente. As concentrações de NPVs foram de $5 \times 10^3 \text{OB.mL}^{-1}$ para NPV de *S. eridania* e de $3 \times 10^3 \text{OB.mL}^{-1}$, para PsinSNPV e RanuNPV. Os bioensaios foram compostos por seis tratamentos: 1) dieta artificial + bactéria HD-73 + NPV; 2) dieta artificial + bactéria HD-73 + *N. rileyi*; 3) dieta artificial + bactéria HD-73; 4) dieta artificial + NPV; 5) dieta artificial + *N. rileyi*; 6) dieta artificial controle. Em cada tratamento foram inoculadas 60 lagartas de cada espécie.

Lagartas neonatas foram mantidas por 48 horas na dieta tratada com bactéria HD-73 e na dieta sem toxina. Após esse período, as lagartas foram submetidas à inoculação com os entomopatógenos. A inoculação dos vírus foi incorporada na dieta e a inoculação de *N. rileyi* foi realizada por contato, transferindo conídios da colônia do fungo, com o auxílio de uma alça de platina de $1 \mu\text{L}$, aplicada sobre as lagartas. As lagartas foram incubadas em câmaras B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 14:10 (L:E) e umidade relativa de $60 \pm 10\%$.

A mortalidade foi registrada diariamente até os 11 dias após a inoculação dos entomopatógenos. Após nove e onze dias da inoculação, as lagartas vivas de Plusiinae e *S. eridania*, respectivamente, foram pesadas individualmente. Os dados de peso larval foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e a comparação múltipla das médias pelo teste de Dunn's ($p < 0,05$). Os valores de mortalidade foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas

usou-se o software SigmaPlot for Windows Version 11.0 © (2008 Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA).

A ingestão da dose subletal da toxina por *C. includens* e *S. eridania* não favoreceu uma maior incidência das doenças causadas por *N. rileyi* e os vírus de poliedrose nuclear (Tabela 1). Entretanto, as lagartas sobreviventes de *C. includens* provenientes dos tratamentos com a bactéria HD-73 isolada (Cry1Ac) e em conjunto com o fungo CNPSo-Nr10, apresentaram o menor peso larval, seguido pela interação da bactéria HD-73 com NPV, indicando que os patógenos na presença da toxina afetaram em maior medida o desenvolvimento larval, quando comparado com a ação do patógeno isolado (Figura 1).

As comparações do peso das lagartas de *S. eridania* e *R. nu* indicam que a presença da toxina não alterou significativamente o desenvolvimento das lagartas inoculadas com vírus ou fungo (Figuras 2 e 3). Por outro lado, a mortalidade de *R. nu* foi maior quando as lagartas alimentadas com a dieta contendo a toxina e posteriormente inoculados com *N. rileyi* e seu NPV, RanuNPV (Tabela 1).

Estudos mais detalhados devem estar voltados para esta interação, uma vez a

disponibilização e expansão de cultivares que expressam mais de um evento Bt é inminente, considerando a entrada da soja Bt no mercado nacional. Tornando imprescindível avaliar o impacto destas tecnologias na ação dos inimigos naturais dos insetos-pragas.

Referências

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, safra 2012/2013, sétimo levantamento**, abr./2013. Brasília: Conab, 2013.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – CTNBio.. **Parecer técnico n° 2542/2010**. Liberação comercial de soja geneticamente modificada resistente a insetos e tolerante a herbicida, soja MON 87701 x MON 89788. 2010.

GALVÃO, A. ed. **Relatório biotecnologia**. 2º acompanhamento de adoção da biotecnologia agrícola para a safra 2012/13. Belo Horizonte: Céleres, dez. 2012. Disponível em: <http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2012/12/RelBiotecBrasil_1202_por.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2013.

Tabela 1. Mortalidade média (\pm EP) de lagartas *Chrysodeixis includens*, *Rachiplusia nu* e *Spodoptera eridania* pela bactéria HD-73 (Cry1Ac), *Nomuraea rileyi* (CNPSo-Nr10) e vírus (NPV). Londrina, PR, 2013.

Espécies	% Mortalidade						CV (%)
	Testemunha	HD-73 (Cry1Ac)	NPV	NPV+HD-73	Nr10	Nr10+HD-73	
<i>C. includens</i>	13,7 \pm 4,1 ^{ns}	17,6 \pm 3,6 ^{ns}	15,2 \pm 3,2 ^{ns}	15,3 \pm 4,9 ^{ns}	34,9 \pm 11,1 ^{ns}	26,1 \pm 4,0 ^{ns}	53,7
<i>R. nu</i>	8,3 \pm 6,3 ^c	12,3 \pm 1,7 ^{bc}	29,7 \pm 4,5 ^{ab}	32,3 \pm 2,9 ^a	18,4 \pm 5,6 ^{abc}	31,9 \pm 3,1 ^a	37,5
<i>S. eridania</i>	3,33 \pm 3,33 ^b	10,0 \pm 1,9 ^{ab}	17,0 \pm 5,7 ^{ab}	16,7 \pm 3,3 ^{ab}	22,4 \pm 3,3 ^a	25,5 \pm 5,7 ^a	53,0

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

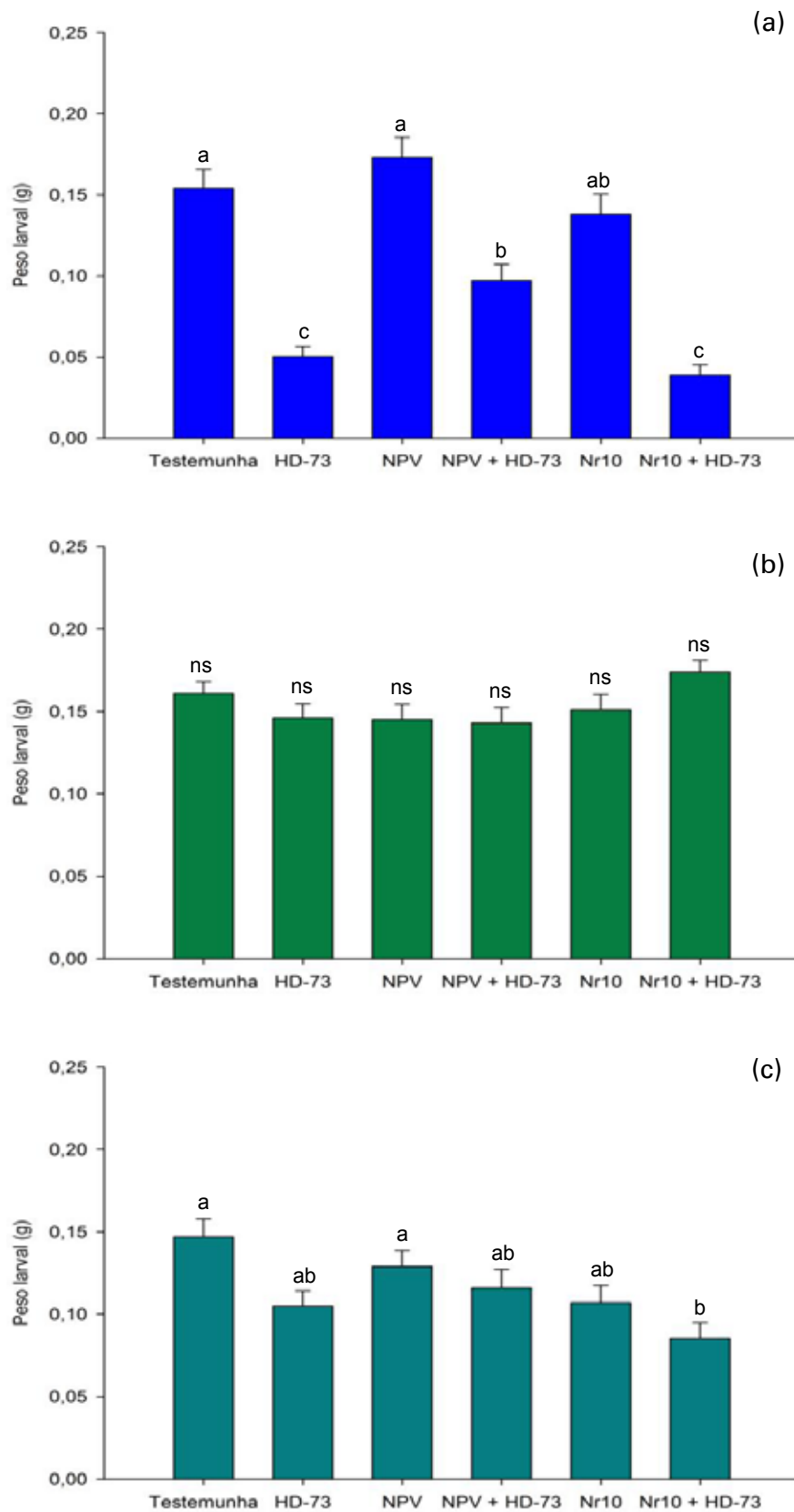


Figura 1. Peso médio \pm EP de lagartas de *Chrysodeixis includens* (a), *Rachiplusia nu* (b) e *Spodoptera eridania* (c), após nove dias (*Plusiinae*) e onze dias (*S. eridania*) da inoculação com *Nomuraea rileyi* (CNPSo-Nr10) e os respectivos vírus, PsinSNPV, RanuNPV e *Spodoptera eridania* NPV. Londrina, PR, 2013. Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de Dunn's ($p < 0,05$). ns= não significativo.