



## ESTIMATIVA DE MORTALIDADE DE *Spodoptera frugiperda* ALIMENTADAS COM MILHO Bt (2B655PW) EM AMBIENTE SEMIÁRIDO

Misael Mendes Soares<sup>1</sup>, Eduardo Domingos Vasconcelos<sup>2</sup>, Luana Camilla Cordeiro Braz<sup>3</sup>, Jean Pierre Ramos<sup>4</sup>, Carliane Rebeca Coelho da Silva<sup>5</sup>, Valdinei Sofiatti<sup>6</sup>, Roseane Cavalcanti dos Santos<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa, discente do curso de Agronomia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

<sup>2</sup> Biólogo, técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Algodão).

<sup>3</sup> Eng. de Biotecnologia e Bioprocessos, mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB/Embrapa Algodão).

<sup>4</sup> Bacharel em Agroecologia, doutorando em Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB);

<sup>5</sup> Doutora em Biotecnologia, Pós Doc na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE/Embrapa)

<sup>6</sup> Pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Algodão).

\*Correspondência: Centro Nacional de Pesquisa em Algodão, Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, nº 1.143, Bairro Centenário, CEP: 58428-095, Campina Grande, Paraíba, Brasil. E-mail: roseane.santos@embrapa.br.

### RESUMO

O milho Bt é amplamente utilizado em lavouras no eixo Sudeste-Centro Oeste para controle de vários lepidópteros, entre eles a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*). Essa tecnologia vem sendo mundialmente adotada há mais de 20 anos, contudo, com o uso contínuo, relatos de quebra de resistência vêm sendo registrados em função da pressão de seleção dos insetos. O monitoramento e a busca de estratégias para retardar esse processo garantem a sustentabilidade dessa tecnologia. Com fins de avaliar a toxicidade do milho Bt (2B655PW) em ambiente semiárido, estimou-se a mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, usando folhas coletadas em 4 fases de crescimento. Sementes de milho Bt e convencional foram cultivadas em campo, durante o final da estação das chuvas. Para os bioensaios, folhas coletadas aos 40, 55, 70 e 85 dias após emergência (dae) foram cedidas às larvas, em placas de 24 poços e posteriormente mantidas em BOD (25±2 °C) durante 5 dias. Foi observada a mortalidade de 100% das larvas no ensaio realizado aos 40 dae. Com o decorrer do ciclo da cultura, houve uma baixa redução atingindo um valor de 92,8% aos 85 dae. Isso indica que essa tecnologia é promissora no controle de *S. frugiperda* nas condições de ambiente semiárido. Considerando-se, contudo, a infestação de insetos em áreas extensivas, torna-se necessário constante monitoramento no campo visando detectar possível surgimento de insetos resistentes que poderão acelerar a queda na eficiência da cultivar.

**Descritores:** *Zea mays*, Lagarta-do-cartucho, Lepidópteros, Organismos Geneticamente Modificados.

### MORTALITY ESTIMATION of *Spodoptera frugiperda* FED ON CORN (2B655PW) IN SEMIARID ENVIRONMENT

#### ABSTRACT

SOARES MM et al. Estimativa de Mortalidade de *Spodoptera Frugiperda* Alimentadas com Milho Bt (2b655pw) em Ambiente Semiárido.



Corn Bt is widely used in crops on Southeast- Mid West belt for control of several Lepidoptera, among them fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). This technology has been adopted worldwide for more than 20 years, however, with continuous use reports of resistance breakdown have been recorded as a function of insect selection pressure. Monitoring and pursuing strategies to delay this process ensure the sustainability of this technology. In order to evaluate the toxicity of Corn Bt (2B655PW) in a semi-arid environment, mortality of fall armyworm larvae was estimated using leaves collected in four growth stages. Seeds of Bt and conventional were cultivated in the field during final of rainy season. Leaves were collected at 40, 55, 70 and 85 days after emergence and used to feeding assays, using larvae in cage (24-well plates) and subsequently maintained in BOD ( $25 \pm 2$  ° C) for 5 days. The rate of mortality was 100% in larvae fed on 40 dae-leaves. With the course of the crop cycle, there was a low reduction reaching a value of 92.8% at 85 dae. This indicates that this technology is promising in controlling *S. frugiperda* under semi-arid conditions. However, considering the infestation of insects in extensive areas, it is necessary constant monitoring in the field in order to detect possible emergence of resistant insects that could accelerate the fall in efficiency of the cultivar.

**Keywords:** *Zea mays*, fall armyworm, Lepidoptera, Genetically Modified Organisms.

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das grandes commodities agrícolas, principalmente por sua ampla utilização da alimentação humana e animal. A espécie, da família *Gramineae*, originou-se na América Central e atualmente é cultivada em diversos países. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais, com 97 milhões de toneladas na safra 2016/17 (1).

Como ocorre com outras lavouras comerciais, a do milho é ameaçada por várias pragas, especialmente insetos, que causam grandes prejuízos na produção (2). De forma generalizada, as formas de controle mais eficientes são os de origem sintética, em função da praticidade e rápida resposta, contudo, são largamente prejudiciais à saúde humana e animal, além de afetar espécies não-alvo e contaminar o meio ambiente. As lavouras transgênicas têm minimizado tais impactos em função de conterem genes exógenos, geralmente oriundos de toxinas vindas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que são inofensivas ao homem e meio ambiente (3-5).

Essa espécie possui vários genes com propriedade inseticida, dentre eles destacam-se os da família *cry* onde as proteínas oriundas desta família apresentam ampla ação inseticida, atuando como toxinas específicas e biodegradáveis, que atacam os insetos-alvo, mas causam pouco ou nenhum dano à maioria dos outros organismos, incluindo insetos benéficos, humanos e animais selvagens (3,6).



Depois de 20 anos de adoção no mundo, uma das grandes preocupações no plantio de lavouras Bt é a evolução de resistência em populações de insetos que poderá diminuir a vida útil da tecnologia (7). De acordo com Tabashnik e Carrière (7), o número de casos reportados na literatura de insetos resistentes às lavouras Bt com consequências práticas para o controle de pragas mais do que triplicou, desde 2012.

No Brasil, a primeira aprovação comercial de milho Bt ocorreu em 2007, com aumento progressivo na adoção nas lavouras (8). Em 2016, as sementes de milho Bt foram empregadas em 84,6% da área plantada no país (3). O milho Bt é adotado, dentre outros insetos-praga, para controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), que se destaca como a principal espécie-praga do milho nas regiões subtropicais e tropicais do continente americano (2).

Dentre os milhos Bt disponíveis no mercado brasileiro já há indícios de evolução de resistência de *S. frugiperda* aos genes *cry1F* (9) e *cry1Ab* (10). Atualmente, busca-se melhorar as estratégias para evitar ou atrasar a evolução de populações de insetos-praga resistentes as proteínas empregadas nas culturas Bt, tais como a adequação das áreas de refúgio e uso de tecnologias com piramidação de genes.

No mercado brasileiro se encontra disponível um leque de cultivares de milho GM, com genes *cry* piramidados, como YieldGard VT PRO (Monsanto) e Powercore (Monsanto e Dow Agrosiences), que expressam as combinações de proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F, respectivamente, e receberam autorização da CTNBio desde 2009 (8). Essa tecnologia tem sido largamente empregada no cinturão do milho, situado nas regiões Sudeste-Centro Oeste, com clima tropical e vegetação de cerrado, respectivamente. De acordo com relato de produtores, há registro de queda de resistência de algumas cultivares em função da pressão de seleção dos insetos-praga.

No ambiente semiárido, a exploração dessa tecnologia tem sido limitada e, portanto, não se dispõe de informação quanto a manutenção da eficiência dessa tecnologia. Com fins de avaliar a toxicidade do milho Bt (2B655PW) em ambiente semiárido, estimou-se a mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, usando folhas coletadas em 4 fases de crescimento.

## METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados na Embrapa Algodão em Campina Grande-PB (7° 13' 51" S, 35° 52' 54" W, 512 m), utilizando a cultivar milho Bt (2B655PW), uma tecnologia



PowerCore, da Monsanto e Dow AgroSciences, que contém os genes *cry1F*, *cry1A.105* e *cry2Ab2*. Como controle negativo, usou-se uma cultivar convencional (BRS Sertanejo). As sementes foram semeadas em solo de textura franco arenosa, em fileiras de 10 m, espaçadas de 0,20 m, no final da estação das chuvas (jul-out, 2017). As plantas foram previamente fertilizadas em função das necessidades nutricionais reveladas na análise de solo. As regas foram mantidas via irrigação, mantendo-se a umidade a cada dois dias na semana.

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Entomologia, da Embrapa Algodão. As larvas de *S. frugiperda* foram obtidas de uma população oriunda do campo e mantida em dieta artificial. Discos (1 cm) de folhas frescas foram coletados aos 40, 55, 70, 85 dias após emergência (dae) e usados nos bioensaios. Os discos foram colocados em placas de 24 poços, contendo discos de papel filtro umedecidos em água destilada. Em cada poço foi colocada uma larva de 3° instar. As placas foram vedadas com plástico filme e incubadas em BOD ( $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo 12:12h). Os discos foliares foram trocados a cada 48 h. O ensaio teve duração de 5 dias, ao fim do qual foi estimada a taxa de mortalidade. Os dados foram corrigidos pela fórmula (11) baseando-se no controle convencional.

$$\text{Mortalidade corrigida (\%)} = (\text{Mt}-\text{Mc}/100-\text{Mc}).100$$

Mt = % de mortalidade do tratamento

Mc = % de mortalidade no controle

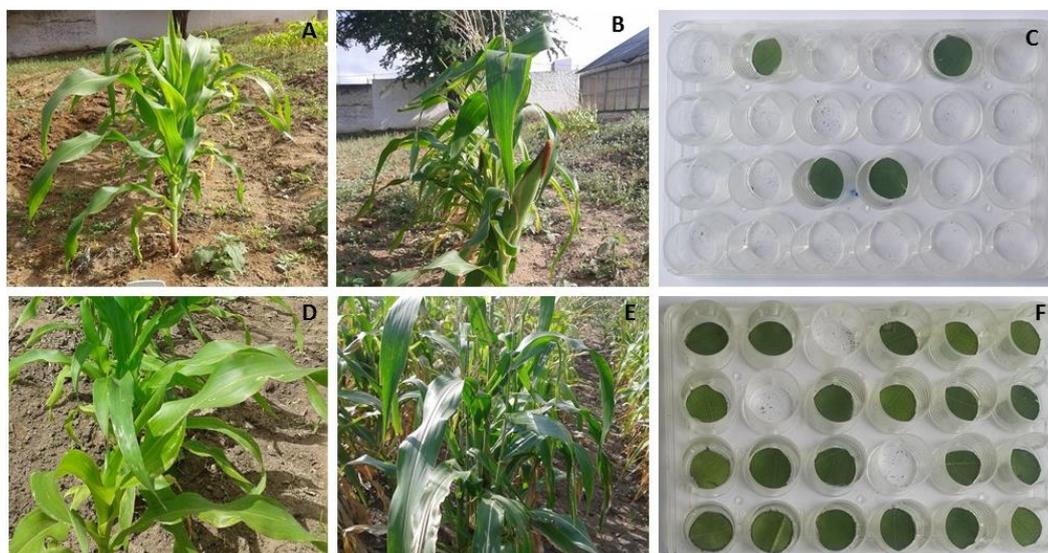
O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2 x 4, com 3 repetições, para cada fase avaliada. A unidade experimental foi constituída por 1 placa contendo 24 poços. Os dados foram analisados utilizando o *software* GENES 2017.3.31 (12). Os resultados em porcentagem foram transformados em  $\text{arc-sen}(\sqrt{\%})$  e submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a condução dos bioensaios, verificou-se que as larvas de *Spodoptera* apresentaram mortalidade logo após 48 h do início do ensaio, nos ensaios com folhas



coletadas aos 40 e 55 dias. Na Figura 1 se encontra um detalhe das plantas cultivadas em campo e de um dos ensaios de alimentação conduzido com as larvas de *Spodoptera*.



**Figura 1.** Detalhe das plantas cultivadas em campo, aos 40 e 85 dias das cultivares Bt (A e B) e convencional (D e E). Placas de alimentação, contendo folhas de milho Bt (C) e convencional (F), de larvas ao final do ensaio.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância e percentuais de mortalidade de *S. frugiperda* alimentadas com milho Bt e convencional em quatro fases de crescimento.

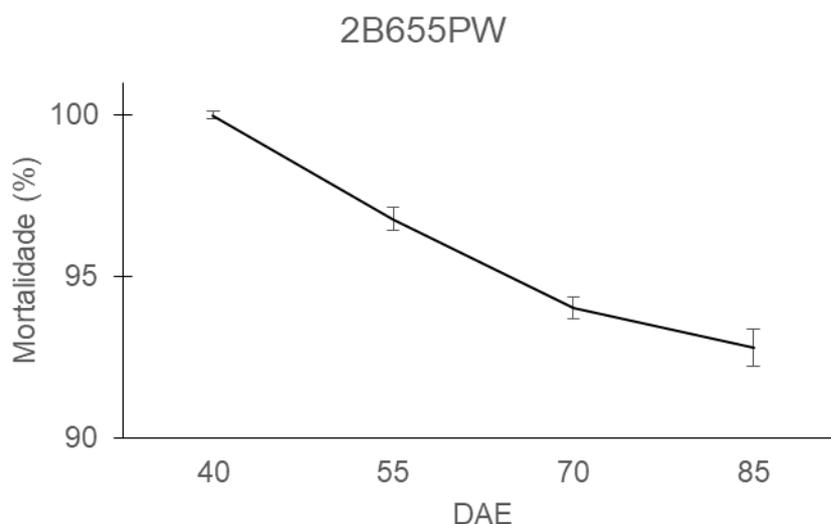
FV	Mortalidade de <i>Spodoptera frugiperda</i>				
	GL	QM			
Genótipo	1	6,555**			
Fase de crescimento	3	0,005*			
Genótipo x Fase de crescimento	3	0,006*			
Resíduo	16	0,001			
CV (%)	5,08				
		Médias			
		40 DAE	55 DAE	70 DAE	85 DAE
2B655PW		100 Ab	97,1 Ab	94,44 Ab	94,07 Ab
BRS Sertanejo		8,29 Aa	10,09 Aa	6,94 Aa	17,61 Ba

**Legenda:** (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*)  $p < 0,05$ . As letras minúsculas indicam as diferenças entre os genótipos e as letras maiúsculas indicam as diferenças entre as fases de crescimento pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Conforme a Tabela 1, a análise de variância revelou diferença estatística significativa para taxa de mortalidade das larvas alimentadas com milho Bt e o controle, indicando que essa tecnologia é promissora no controle de *S. frugiperda* nas condições de ambiente



semiárido. Em relação ao efeito das datas de avaliação, obteve-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ), indicando que a toxicidade do milho Bt não foi constante durante o ciclo da cultura onde aos 40 dae foi observado um percentual de mortalidade de 100 % das larvas, com o decorrer do ciclo de vida das plantas houve uma baixa redução na toxicidade atingindo um valor de 92,8% de mortalidade aos 85 dae (Figura 2).



**Figura 2.** Taxa de mortalidade corrigida de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho Bt (2B655PW), coletadas em 4 fases de crescimento da cultura. (Barras: desvio-padrão).

No trabalho de Bernardi et al (13), que realizaram ensaios com larvas neonatas de *S. frugiperda*, o híbrido PowerCore foi capaz de matar 100% das larvas em ambos os estágios V3 e V8, sem redução observada. Contudo, em ambos os estágios avaliados pelos autores, as plantas estavam no início de seu ciclo com menos de 40 dae, sendo mais jovens que as avaliadas neste trabalho.

Apesar dos relatos de quebra de resistência em lavouras GM em campo de produção, enfatiza-se que esse fenômeno é comum de ocorrer em qualquer cultura melhorada, considerando-se que todo ser vivo tem habilidade de se readaptar a situações variadas quando se encontra em situação de estresse. Por outro lado, espécies de *Spodoptera* possuem largo poder de readaptação. Burtet et al (14) verificaram aumento de ataque de *S. frugiperda* no milho PowerCore™ da segunda safra, levando a necessidade de suplementação de controle, com inseticida sintético. Apesar das variações da resistência que as proteínas Cry podem sofrer em função do manejo ou condições ambientais, o



importante é que a quantidade produzida seja suficiente para assegurar o controle das pragas alvo, sem risco de prejuízo na produção da lavoura.

## CONCLUSÃO

A tecnologia do milho PowerCore é de grande relevância para a lavoura do milho. Baseado nos resultados no trabalho, a cultivar de milho Bt teve elevada toxicidade para *S. frugiperda* nas condições avaliadas. Considerando-se, contudo, a infestação de insetos em áreas extensivas, torna-se necessário o constante monitoramento no campo a fim de detectar o surgimento de insetos resistentes que poderão vir a causar danos à lavoura.

## REFERÊNCIAS

1. CONAB. 2017 [cited 18 October 2017]. Available from: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252>
2. Juárez ML, Murúa MG, García MG, Ontivero M, Vera MT, Vilardi JC et al. Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. *J Econ Entomol.* 2012; 105: 573-582.
3. ISAAA. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY
4. Comas C, Lumbierres B, Pons X, Albajes R. No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. *Transgenic Res.* 2014; 23(1):135–143.
5. Nicolia A, Manzo A, Veronesi F, Rosellini D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit Rev Biotechnol.* 2014; 34(1): 77–88.
6. Silva CRC, Monnerat R, Lima LM, Martins ES, Melo Filho PA, Pinheiro MP et al. Stable integration and expression of a cry1Ia gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. *Pest Manag. Sci.* 2016; 72(8):1549-57.
7. Tabashnik BE, Carrière Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. *Nat. Biotechnol.* 2017; 35(10): 926-935.
8. CTNBio. 2017 [cited 8 October 2017]. Available from: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial>
9. Farias J, Andow D, Horikoshi R, Sorgatto R, Fresia P, dos Santos A et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection.* 2014; 64:150-158.
10. Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto R, Dourado P, Crivellari A et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Manag Sci.* 2016;72(9):1727-1736.
11. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of insecticide. *J Econ Entomol.* 1925; 18:255-257.
12. Cruz CD. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum.* 2013; 35(3):271-276.



13. Bernardi D, Bernardi O, Horikoshi RJ, Salmeron E, Okuma DM, Omoto C. Biological activity of Bt proteins expressed in different structures of transgenic corn against *Spodoptera frugiperda*. *Ciênc Rural*. 2016; 46(6):1019-1024.
14. Burtet L, Bernardi O, Melo A, Pes M, Strahl T, Guedes J. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. *Pest Manag Sci*. 2017; DOI 10.1002/ps.4660.