

## Julho de 2018

Publicação periódica de difusão científica e tecnológica editada pelo Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAMT) e dirigida a profissionais envolvidos com o cultivo e beneficiamento do algodão.

**Diretor executivo**  
Álvaro Salles

**Contato**  
www.imamt.com.br

**Email**  
publicacoesimamt@imamt.com.br

**Tiragem**  
2000 exemplares



## *Helicoverpa armigera*: ameaça a lavouras Bt de algodoeiro

Jacob Crosariol Netto<sup>1</sup>, Guilherme Gomes Rolim<sup>1</sup>, Leonardo Scoz<sup>1</sup>, Erica Soares Martins<sup>1</sup>, Rafael Major Pitta<sup>2</sup>, Daniela de Lima Viana<sup>3</sup>

**O lançamento comercial**, em 1996, de plantas de milho e algodão geneticamente modificadas para controlar pragas causou uma revolução no manejo de lagartas, sendo adotadas amplamente em diversas culturas desde então. Essa tática de controle promoveu a redução significativa do uso de inseticidas, gerando, consequentemente, benefícios como reduções nos custos de produção (Carpenter, 2010), nas taxas de intoxicação de trabalhadores por inseticidas (Koser; Qain, 2011), nos impac-

tos em espécies não alvo dos inseticidas, como inimigos naturais e polinizadores (Lu *et al.*, 2012), e nas pressões de seleção de populações resistentes causadas pelos inseticidas. Entretanto, qualquer tática de controle exerce pressão de seleção de indivíduos mais resistentes.

Considerando que essas plantas produzem ininterruptamente proteínas inseticidas, os insetos que se alimentam dessas plantas estão sobre seleção constante de indivíduos que consigam sobreviver

(1) Pesquisadores do Instituto Mato-Grossense do Algodão. Email: jacobnetto@imamt.org.br

(2) Pesquisador Embrapa Agrossilvipastoril

(3) Professora Universidade de Cuiabá

ao efeito de tais proteínas. Portanto, a adoção de técnicas de manejo da resistência, como o uso de cultivares que expressam mais de uma proteína com mecanismos de ação distintos e em altas doses e o uso de áreas de refúgio, são primordiais para a permanência dessa tática de controle (Huang *et al.*, 2011). De forma sinérgica às táticas de manejo da resistência, o Manejo Integrado de Pragas - MIP auxilia na permanência da eficiência de controle das plantas inseticidas, pois ao monitorar as pragas é possível identificar se espécies alvo das tecnologias estão sobrevivendo, permitindo então o controle imediato dessas espécies, evitando assim que indivíduos resistentes sobrevivam e passem essas características genéticas adiante.

*Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie conhecida mundialmente pelo seu potencial destrutivo em diversas culturas e é um bom exemplo de praga controlada pelas plantas Bt. Na safra 2012/2013, *H. armigera*, até então considerada exótica no Brasil, entrou para esse variado complexo de pragas do algodoeiro no Brasil (Czepak *et al.*, 2013; Spech *et al.*, 2013) e desde então as preocupações no país aumentaram drasticamente.

Segundo Bueno e Sosa-Gómez (2014), na primeira safra de ocorrência no Brasil essa espécie causou perdas na ordem de 800 milhões de dólares, sendo grande parte desse prejuízo em cultivos de algodão e soja.

Trata-se de uma espécie pertencente à subfamília Heliothinae, que abrange cerca de 381 espécies descritas, muitas classificadas como pragas agrícolas importantes, como as dos gêneros *Helicoverpa* Hardwick e *Chloridea* Duncan (Westwood), que atacam folhas, flores e frutos de plantas (Pogue, 2013). Fatthipour e Sederatian (2013) classificaram essa praga como uma das mais importantes da agricultura mundial devido à sua elevada mobilidade e fecundidade, diapausa facultativa de suas pupas e hábito alimentar, associado à sua capacidade de atacar grande número de hospedeiros.

Considerando a importância dessa espécie como praga na cultura do algodoeiro e a significativa expansão dessa cultura no Brasil (1,2 milhões de hectares na safra 2017/18), a preservação da eficiência das plantas Bt é estratégica para uma agricultura mais sustentável e menos dependente de inseticidas.

Até a safra 2015/2016, não havia obser-

vado a ocorrência de lagartas de *H. armigera* em lavouras de soja e algodão Bt, demonstrando que até então essa tática de controle apresentava elevado controle sobre essa espécie. Barros *et al.* (2016), ao verificarem a eficiência dos traits transgênicos de algodão sobre *H. armigera*, constataram que as tecnologias WideStrike®, Bollgard II® e Twin-Link® apresentavam alta taxa de controle sobre lagartas neonatas. Entretanto, na safra 2016/2017 foi constatada uma população de campo de *H. armigera* em Primavera do Leste - MT com sobrevivência de 40% de lagartas até o 4º ínstar em cultivares de algodoeiro WideStrike® (Figura 1).

Já na safra 2017/2018 foi constatada a ocorrência de lagartas pertencentes à subfamília Heliothinae no município de Campo Verde - MT em um talhão semeado com uma variedade comercial que expressa as proteínas Cry1Ac + Cry1F (WideStrike®). Mediante tal informação, a equipe do IMAmT coletou essas lagartas e realizou uma série de testes visando a confirmação específica da praga e se as plantas de fato expressavam as proteínas citadas acima.

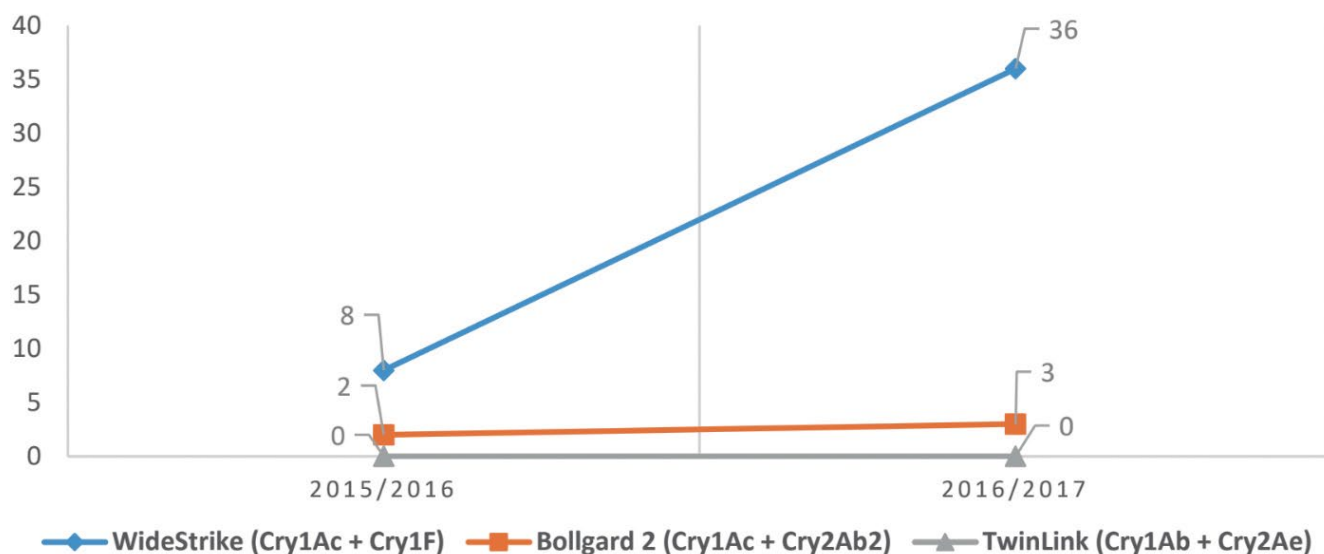
Durante as safras de 2015 a 2017, lagartas de *H. armigera* têm sido coletadas em campos de algodão no Estado de Mato Grosso e submetidas a ensaios com proteínas purificadas, visando o monitoramento da evolução da resistência deste inseto a proteínas Cry (Tabela 1).

Como pode ser observado, em termos estatísticos, não houve diferença entre os resultados obtidos nos anos de 2014, 2015 e 2016, indicando que até 2016 não existia evidência de que a população de *H. armigera* testada fosse resistente às proteínas de *B. thuringiensis* presentes nos eventos transgênicos. Porém, se olharmos os números absolutos de CL<sub>50</sub> para as proteínas Cry1F e Cry1Ac, que para *S. frugiperda* já foi demonstrado possuírem o mesmo receptor (Monnerat *et al.*, 2015), nota-se um pequeno aumento de dose para algumas proteínas no decorrer dos três anos. Para a safra 2017/2018 essas análises ainda estão em andamento.

Kunkanur *et al.* (2018) constataram que na Índia, apesar de não haver falhas de controle de *H. armigera* em cultivares de algodão com expressão da proteína Cry1Ac, após 10 anos de monitoramento a frequência de indivíduos resistentes nas populações de campo chegou a aumentar em até 65 vezes.

Monnerat *et al.* (2015) demonstraram em seus estudos com *S. frugiperda* que a po-

## PORCENTUAL DE LAGARTAS SOBREVIVENTES ATÉ O 4° INSTAR



**Figura 1.** Percentual de lagartas de *H. armigera* que atingiram o 4º instar de desenvolvimento alimentando-se de folhas coletadas em cultivares de algodoeiro com expressão de proteínas inseticidas.

**Tabela 1.** Resultado da  $CL_{50}$  (concentração letal necessária para matar 50% da população testada) obtida com proteínas de *B. thuringiensis* purificadas contra *H. armigera*.

Proteínas	$CL_{50}$ (ng/cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>		
	Ano 2015	Ano 2016	Ano 2017
<b>Cry1Aa</b>	6 (3 – 10)	6,5 (2,8 – 10)	8,5 (2 – 16)
<b>Cry1Ab</b>	27 (6-51)	23 (5-49)	15 (2-40)
<b>Cry1Ac</b>	8 (4-12)	6 (4-11)	10 (2-16)
<b>Cry1F</b>	49 (5-117)	51 (5-123)	55 (10-68)

<sup>a</sup>  $CL_{50}$  analisada com Probit pelo programa PoloPC da Le'Ora Software (limite de confiança a 90%).

pulação resistente a Cry1F apresenta co-resistência às proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, mas não à proteínas Cry2Ab. No caso de *H. armigera*, podemos supor que um mecanismo semelhante esteja acontecendo, uma vez que insetos desta espécie estão sendo encontrados em culturas de algodão Bt que expressam a proteína Cry1F. Outros trabalhos também têm demonstrado resistência cruzada entre as

proteínas da família Cry1A e Cry1F em outros insetos, como *Chloridea virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) (Gould *et al.*, 1995) e *Plutella xilostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Tabashnik *et al.*, 1994).

Este relato é um alerta de que *H. armigera* pode também já estar resistente às proteínas Cry que atualmente encontram-se em eventos comerciais, indicando que o manejo deste inseto deve ser repensado.



**Figura 2.** Polimorfismo genético (SNP) utilizado como marcador molecular para diferenciação entre *H. armigera* (H.a.) e *H. zea* (H.z.). *H. armigera* possui uma citosina enquanto *H. zea* possui uma timina.

H. a	5' -GGGATTTGCAGTAGATAATGCAACATTAAGTTCGATTTTATACTTTTCA	C	TTTCTTTTACC-3'
H. z	5' -GGGGTTTGCAGTAGATAATGCAACATTAAGTTCGATTTTATACTTTTCA	T	TTTCTTTTACC-3'

### Identificação molecular de *Helicoverpa armigera*

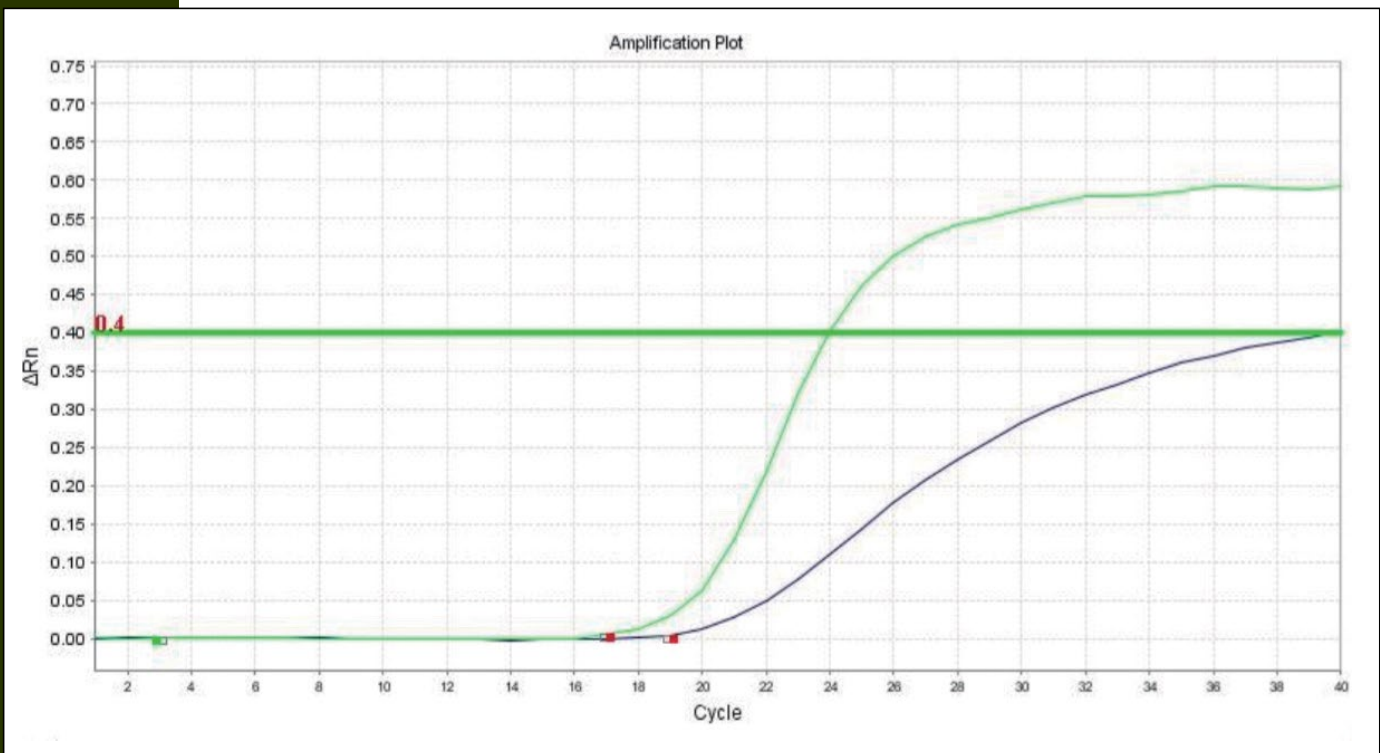
A correta identificação de *H. armigera* é difícil devido à sua grande similaridade morfológica com *Helicoverpa zea*. No entanto, existem determinadas diferenças genéticas entre essas duas espécies que podem ser utilizadas como marcadores moleculares para uma identificação mais assertiva. Neste sentido, polimorfismos de bases únicas (SNPs) presentes na região do DNA mitocondrial desses insetos (*Figura 2*), conhecida como citocromo b (Cyt b), foram utilizados como marcadores eficientes para a identificação correta de *H. armigera*. A detecção e leitura destes marcadores foi realizada por meio da técnica de biologia molecular conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Assim, o material genético de lagartas e mariposas foi extraído e purificado com auxílio de kit NucléoSpin Plant II® (Marechey-Naghel), conforme instruções do fabricante, e analisado por meio da técnica de

PCR em tempo real, por meio das seguintes condições: Solução de PCR composta por 1X Quantitect Multiplex PCR® (Qiagen®); 1,6 µM de iniciador F (5'-GGGATTTGCAGTAGATAATGCAACA-3'); 1,6 µM de iniciador R (5'-GATCCTGTTTGGTGAAGAAATAATAA-TGAATTATAGTT-3'); 0,4 µM de sonda *H. zea* (VIC-ATGGTAAAAGAAAGTGAAAAG-MGB); 0,4 µM de sonda *H. arm* (FAM-ATGGTAAA-GAAAATGAAAAG-MGB) e cerca de 20 ng de DNA. Após a preparação da solução foi realizada a reação e leitura de PCR em aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems®) com incubação inicial a 95°C por 15 min, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 min e 60°C por 1 min com leitura de fluorescência.

Como resultado, através da técnica descrita acima, foram obtidos padrões gráficos gerados pela leitura da fluorescência gerada pelo marcador molecular relacionado ao polimorfismo genético característico de *H. armigera* (*Figura 3*), identificando os espécimes analisados como pertencentes a esta espécie.

**Figura 3.** Padrão gráfico gerado pela leitura de marcador molecular relacionado ao polimorfismo genético (SNP) característico de *H. armigera*.





**Figura 4.** Figura esquemática de posicionamento de marcador molecular para identificação de tecnologias de plantas GM. 1- DNA vegetal (verde), 2- Gene de Bt (laranja), 3- Marcador molecular (vermelho) posicionado exatamente sobre o ponto de inserção do gene de Bt no genoma vegetal.

### Identificação molecular de cultivares Bt

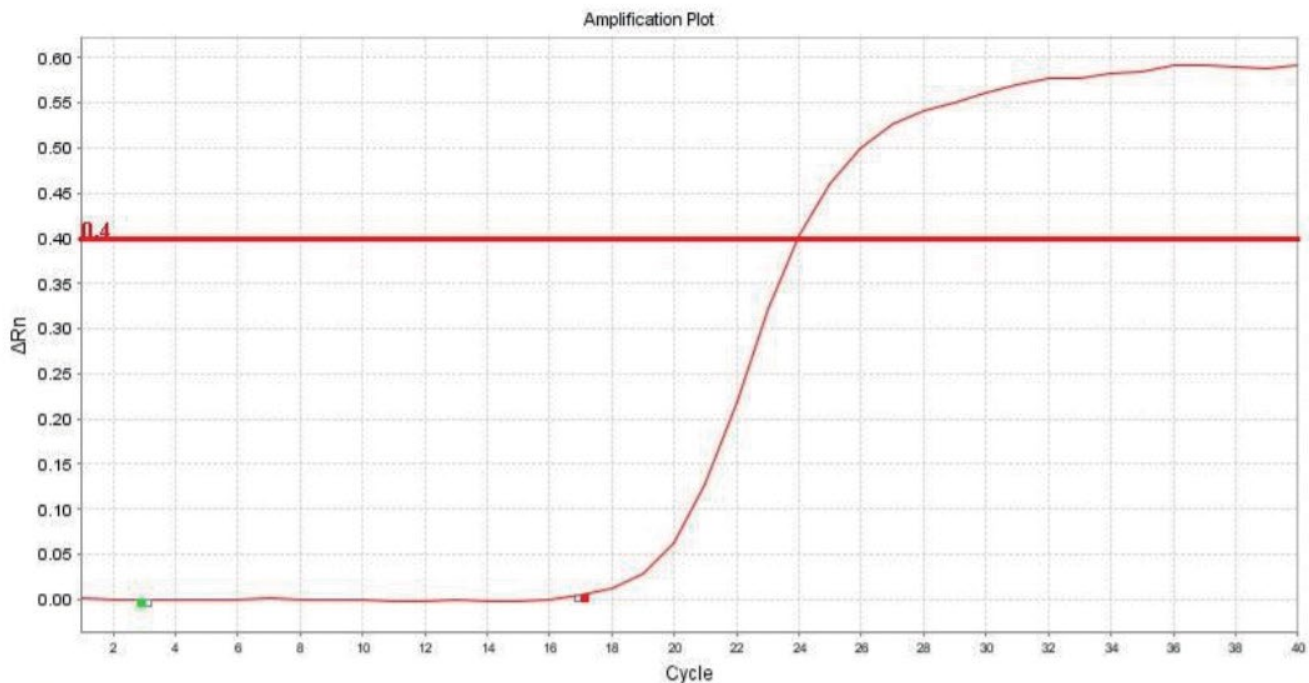
Assim como na identificação de *H. armigera*, a identificação de eventos, ou tecnologias, de plantas geneticamente modificadas (GM) pode ser realizada através de detecção e leitura de marcadores moleculares por meio da técnica de PCR em tempo real. No entanto, neste caso o marcador está baseado no ponto de inserção do gene Bt no genoma do algodoeiro (Figura 4). Essa estratégia de análise é extremamente específica, permitindo a identificação de qualquer tecnologia GM em qualquer cultivar.

Os protocolos de PCR em tempo real para detecção de plantas GM são de domínio público, disponibilizados em banco de dados como o fornecido pelo European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmome-thods/>).

No caso presente, para detecção da tecnologia WideStrike® (281-24-236 x 3006-210-23), o material genético de amostras de folhas de algodoeiro foi extraído e purificado com auxílio de kit NucleoSpin Plant II® (Marcherey-Naghel), conforme instruções do fabricante, e analisado por meio da técnica de PCR em tempo real, por meio das seguintes condições: Solução de PCR composta por 1X Quantitect Multiplex PCR® (Qiagen®); 1,6 µM de iniciador F281 (5'- CTC ATT GCT GAT CCA TGT AGA TTT C-3'); 1,6 µM de iniciador R281 (5'- GGA CAA TGCTGG GCTTTG TG -3'); 0,4 µM de sonda WS281 (FAM- TTG GGT TAA TAA AGT CAG ATT AGA GGG AGA CAA -TAMRA) e cerca de 20 ng de DNA. Após a preparação da solução foi realizada a reação e leitura de PCR em aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems®) com incubação inicial a 95°C por 15 min, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 min e 60°C por 1 min com leitura de fluorescência.



*Helicoverpa armigera* atacando maçãs de cultivar de algodão WideStrike® (Foto: Jacob Netto).



**Figura 5.** Sinal de fluorescência gerado pelo marcador molecular quando a tecnologia em questão está presente na amostra analisada.

O mesmo foi executado com iniciador F3006 (5'- AAA TAT TAA CAA TGC ATT GAG TAT GAT G -3'); 1,6  $\mu$ M de iniciador R3006 (5'- ACT CTT TCT TTT TCT CCA TAT TGA CC-3'); 0,4  $\mu$ M de sonda WS3006 (FAM- TAC TCA TTG CTG ATC CAT GTA GAT TTC CCG -TAMRA).

Para cada tecnologia GM são utilizadas sondas e iniciadores específicos, a exemplo da tecnologia WideStrike® (281-24-236 x 3006-210-23), mantendo-se o restante dos parâmetros mencionados acima em termos de componentes, temperaturas e tempos de ciclagens. Como resultado, caso determinada tecnologia esteja presente na amostra vegetal analisada, ocorre a captação e registro do sinal de fluorescência gerado pelo marcador (Figura 5). Por outro lado, caso a tecnologia analisada não esteja presente, não ocorre a emissão de sinal de fluorescência.

### Orientações para o sucesso no controle da praga

Mato Grosso é responsável por mais de 65% do algodão produzido no Brasil (CONAB, 2018) e cerca de 85% dessa produção é classificada como algodão de 2ª safra, ou seja, semeado após a colheita de soja. Considerando que 60% da soja cultivada em Mato Grosso expressa a proteína Cry1Ac e as variedades de algodão cultivadas após a soja também expressam a mesma proteína além de outras, uma quebra de resistência

de *H. armigera* à tecnologia Widestrike proporcionará infestações da praga em ambas culturas.

Diante da constatação da presença de *H. armigera* em talhões de algodão com expressão das proteínas (Cry1Ac + Cry1F) de forma conjunta, recomenda-se a adoção de medidas visando reduzir os problemas ocasionados por esta espécie em cultivos Bt.

Entre as medidas a serem adotadas, o monitoramento das lavouras é de extrema importância, pois ele servirá como base para buscarmos ferramentas de controle mais adequadas visando o melhor controle dessa importante praga.

Ao atingir o nível de controle, recomenda-se a utilização de aplicações com inseticida, de preferência aqueles mais seletivos aos inimigos naturais. Além disso, é de extrema importância a utilização de inseticidas com mecanismos de ação distintos, evitando assim o processo de seleção de populações resistentes à molécula inseticida.

Uma das alternativas pode ser a inserção de produtos biológicos à base de Bt que possuam a forma de pró-toxinas ou toxinas que possuam mecanismo de ação diferente e que ainda possam exercer atividade contra essa espécie. Jakka e Jurat-Fuentes (2014) demonstraram que uma população de *S. frugiperda* de Porto Rico resistente a Cry1F foi sensível às formulações de produtos comerciais à base de Bt.



Tabela 2. Proporção da área de refúgio para cada cultura.

Culturas	Percentual da área não Bt
Milho	10%
Soja	20%
Algodão	20%

Para auxiliar no monitoramento é recomendado o uso de armadilhas, que podem ser dos tipos luminosas (Figura 6), à base de atrativo alimentar (Figura 7) ou de feromônio (Figura 8). A utilização de armadilhas não deve substituir a atuação dos monitores, ou seja, as armadilhas servem como uma ferramenta complementar com o objetivo de aumentar a capacidade operacional do monitoramento. Além disso, elas podem indicar as revoadas iniciais, podendo assim possibilitar

a antecipação do problema.

No caso de cultivos Bt, um dos métodos mais importantes para o manejo da resistência é a utilização das áreas de refúgio (Tabela 2), visando possibilitar o cruzamento de indivíduos ainda suscetíveis com resistentes, pois, normalmente, os indivíduos provenientes desse acasalamento apresentam uma razão de resistência inferior ao progenitor resistente. Entretanto, isso não é uma regra.



Figura 7. Armadilha com atrativo alimentar (Noctovi).



Figura 6. Armadilha Luminosa.



Figura 8. Armadilha tipo Delta com feromônio sexual.

Importante ressaltar que não basta que apenas cada propriedade que cultiva plantas Bt instale suas próprias áreas de refúgio, mas é também necessário que áreas de refúgio sejam planejadas em parceria com os vizinhos de propriedade. Os produtores vizinhos podem estabelecer parcerias tanto para a escolha das plantas Bt que irão cultivar quanto para a organização das áreas de refúgio, visando a maximização do efeito das mesmas nas diferentes propriedades estabelecidas na região.

Nas cultivares de algodão das tecnologias Bollgard II® e TwinLink® não foram observadas ocorrên-

cia de lagartas *H. armigera* até o presente momento, indicando que essas cultivares ainda apresentam eficiência de controle para esta espécie. Sendo assim, as áreas de refúgio são de extrema importância, pois podem prolongar a vida útil destas tecnologias.

Além da utilização das áreas de refúgio, devido às principais características do nosso sistema produtivo, o ideal seria um plano de sucessão de cultivos que evite a utilização de cultivares que expressem as mesmas proteínas inseticidas. Dessa forma, iremos reduzir a pressão de seleção sobre determinadas proteínas inseticidas.

### Referências Bibliográficas\*

Lu Y., Wu K., Jiang Y., Guo Y., Desneux N. (2012) Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*. n.487, p.362-365.

Huang F., Andow D.A., Buschman L.L. (2011). Sucesso f the high-dose resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomologica Experimentalis et applicata*. v.140, p.1-16.

Monnerat R., Martins E., Macedo C., Queiroz P., Praça L., Soares C.M., *et al.* (2015) Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to Modified Bt Toxins. *PLoS ONE* 10(4): e0119544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119544>

Tabashnik B.E., Finson N., Johnson M.W., Heckel D.G. (1994) Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) *Appl Environ Microbiol*; 60: 4627-4629. PMID:16349471

\* Referências adicionais e/ou com chamada no texto, mas que não foram citadas aqui poderão ser disponibilizadas via email sob solicitação.

### REALIZAÇÃO



### APOIO FINANCEIRO

