

## Efeito do milho *Bt*, contendo as toxinas Cry 1A(b) e Cry 1 F nos aspectos biológicos de *Spodoptera frugiperda*

Thais M. F. de Carvalho<sup>1</sup>, Simone M. Mendes<sup>2</sup>, Fabíola A. Santos<sup>3</sup>, J. R. Oliveira<sup>4</sup>, Kátia G. B. Boregas<sup>5</sup>, Octávio G. Araújo<sup>6</sup> e Marcos E. Lopes<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Aluna do 4º ano da graduação em Ciência Biológica/UNIFEMM – Bolsista CNPq na Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas – MG- tafrutuoso@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Pesquisadora Doutora da Embrapa Milho e Sorgo/Sete Lagoas, MG; <sup>3</sup>Mestranda Agronomia/Entomologia - Departamento de Entomologia UFLA, Lavras, MG; <sup>4</sup>Graduando em Engenharia Agrônoma IFMG – Campus Bambuí; <sup>5</sup>Doutora em ECMVS-UFMG <sup>6</sup>Aluno do 4º ano da graduação em Ciência Biológica/UNIFEMM – Estagiário Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas – MG; <sup>7</sup> Engº Agrônomo - ReHAgro

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*, *Zea mays*, milho *Bt*, MIP, entomologia. insetos-praga.

### Introdução

Dentre as pragas mais importantes da cultura do milho destaca-se a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Em condições climáticas favoráveis, esse inseto apresenta um elevado potencial reprodutivo, aumentando rapidamente sua população, ocasionando danos nas folhas e no cartucho, comprometendo o vigor das plantas e consequentemente a produção de grãos. No Brasil, as perdas oscilam entre 34 e 40% (FERNANDES, 2003). Segundo Cruz et al. (1999), as perdas estimadas em função da infestação desta praga no Brasil são da ordem de 400 milhões de dólares por ano.

Para tentar diminuir essas perdas, muitos recursos já foram utilizados, dentre eles vários inseticidas. Por mais eficazes que sejam, eles apresentavam inúmeros problemas, como a contaminação do ambiente por seus resíduos (CAPALBO; FONTES, 2004). Alternativas para solucionar tal problema são propostas, sendo que os agricultores do Brasil dispõem, desde 2008, das facilidades da utilização do milho *Bt*.

Milho *Bt* é o milho geneticamente modificado, no qual foram introduzidos genes específicos de *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911), que levam à produção de proteínas tóxicas a determinadas ordens de insetos considerados pragas (insetos que causam danos econômicos) para a cultura (ETGES, 2008).

Estudo publicado por Waquil et al. (2002) mostraram o efeito diferenciado das toxinas Cry para a lagarta-do-cartucho (LCM). Assim, de acordo com Mendes e Waquil (2009), é possível que o produtor encontre em condições de campo respostas diferenciadas em relação ao controle da LCM com a utilização de eventos diferentes. Dentro do mesmo grupo de insetos, a atividade de cada toxina é diferenciada. As toxinas, Cry 1 A(b) e Cry 1 F têm atividade sobre os lepidópteros-praga do milho e apresentam alta especificidade a esse grupo, embora estudos toxicológicos revelem diferenças significativas em nível de toxicidade para cada espécie.

Híbridos transgênicos com a tecnologia *Bt* podem reduzir significativamente os prejuízos causados por *S. frugiperda*, conforme foi observado no primeiro ano de uso, com um aumento de 15 a 20% na produtividade (PURCINO et al., 2009). Além da redução das perdas diretas causadas pelos danos das lagartas na espiga, que podem atingir até 30%, outras vantagens do uso do milho *Bt* incluem a redução da aplicação de agrotóxicos, a comodidade



para o produtor, a diminuição da incidência de micotoxinas e, conseqüentemente, a oferta de alimentos mais saudáveis para humanos e criações (PURCINO et al., 2009).

O objetivo desse ensaio é avaliar o efeito do milho *Bt*, contendo as toxinas Cry 1A(b) e Cry 1 F nos aspectos biológicos de *S. frugiperda* em condições de laboratório.

## Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Pragas da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, em ambiente climatizado com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  UR 60% e fotofase 12h. As lagartas utilizadas no experimento provieram das criações mantidas em laboratório. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso.

Foram realizados plantios escalonados em quatro semanas consecutivas, com o objetivo de obter folhas entre os estádios V5 e V8 dos onze híbridos utilizados. Os híbridos escolhidos continham seus representantes modificados pelo gene *bt* sendo 4 Cry 1A(b) (evento MON 810 – Monsanto) e 2 Cry 1F (evento Herculex - Dow Agrosience) e seus respectivos isogênicos não *Bt* (Tabela 1).

**Tabela 1** – Híbridos utilizados no ensaio efeito do milho *Bt*, contendo as toxinas Cry 1A(b) e Cry 1 F nos aspectos biológicos de *Spodoptera frugiperda*

Híbrido	Evento
1.0	Não- <i>Bt</i>
1.1	Cry 1F
1.2	Cry 1A(b)
2.0	Não- <i>Bt</i>
2.1	Cry 1F
3.0	Não- <i>Bt</i>
3.2	Cry 1A(b)
4.0	Não- <i>Bt</i>
4.2	Cry 1A(b)
5.0	Não- <i>Bt</i>
5.2	Cry 1A(b)

### Avaliação dos aspectos biológicos de *S. frugiperda* em folhas de milho contendo diferentes toxinas

As larvas recém-eclodidas foram colocadas em copos plásticos com capacidade de 50 ml e com tampas de acrílico transparente como recipiente de cada uma das repetições. A cada dois dias foram colocadas cerca de  $50\text{cm}^2$  de folhas para cada tipo de tratamento. Nessas trocas foi verificada a sobrevivência da LCM nos diferentes híbridos utilizados de acordo com metodologia utilizada por Sá et al. (2009).

**Sobrevivência 48 horas:** Para avaliar a sobrevivência após 48 horas, fez-se um bioensaio em que 5 lagartas recém-eclodidas foram confinadas em cada copo. Foram utilizados 48 copos em cada um dos onze tratamentos, sendo cada um dos copos considerado uma repetição. A sobrevivência larval foi verificada após 48h.



**Desenvolvimento larval e biomassa aos 14 dias:** Para avaliar a sobrevivência larval, foi conduzido um bioensaio, confinando-se uma larva recém-eclodida e sadia por copo, totalizando 48 repetições dos 11 eventos distintos. A cada dois dias foi verificada a sobrevivência das larvas e após um período de 14 dias as larvas sobreviventes foram pesadas numa balança de precisão (0,1 mg). A sobrevivência larval só levou em consideração as larvas que sobreviveram até a fase de pesagem das lagartas, sendo as demais descartadas.

**Desenvolvimento e biomassa de pupa:** Iniciado o período de pupa, foi realizada uma pesagem para comparação da biomassa, registrada por uma balança de precisão (0,1 mg). Após o período de pupa, fez-se a separação dos machos e fêmeas. O desenvolvimento de pupa só levou em consideração as pupas que sobreviveram até a fase adulta.

**Análise estatística:** Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o pacote computacional SISVAR, versão 5.0 (FERREIRA, 2007). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-knot (1974) a 5% de significância.

## Resultados e Discussão

Os resultados mostraram interação significativa entre os híbridos, expressando as diferentes toxinas do *Bt* e as versões *Bts* versus não-*Bts* e as lagartas-do-cartucho. Portanto, as comparações foram feitas entre os híbridos *Bts* e as versões *Bts* versus não-*Bts*. Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, para a maioria das variáveis avaliadas. (Tabela 2)

**Tabela 2** – Período de desenvolvimento, período de pupa e biomassa de lagartas (14 dias) e pupas de *S. frugiperda* nos diferentes tratamentos

Híbrido	Taxa de sobrevivência 48 horas (%)	Período de desenvolvimento larval	Biomassa em 14 dias	Período de pupa (dias)	Biomassa de pupa(mg)
1.0	85,4 b	3,68 b	18,53 a	2,72 a	13,43 a
1.1	21,7 d	1,98 c	0,7 c	0,7 d	0,7 e
1.2	73,3 c	3,99 a	9,72 b	2,43 b	9,94 b
2.0	70,0 c	3,77 b	17,27 a	1,67 c	14,69 a
2.1	28,3 d	2,20 c	1,13 c	0,76 d	1,02 e
3.0	96,2 a	3,63 b	18,89 a	2,86 a	14,35 a
3.2	82,1 b	3,73 b	8,98 b	2,24 b	9,03 b
4.0	82,5 b	3,63 b	19,47 a	1,41 c	11,92 a
4.2	75,8 c	3,87 a	7,2 b	1,42 c	4,5 d
5.0	83,3 b	3,39 b	16,33 a	2,9 a	12,97 a
5.2	68,3 c	3,95 a	10,46 b	1,66 c	7,29 c
CV(%)	27,58	20,34	52,73	46,74	62,18

\*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estaticamente entre si pelo teste de Scott-knot ( $P \leq 0,05$ ).



## **Avaliação de sobrevivência em 48 horas**

A sobrevivência de larvas 48 horas após a eclosão, mantidas em milho que expressam a toxina Cry 1 A(b) (híbridos 1.2, 3.2, 4.2 5.2), apresentou diferenças significativas quando comparada com o milho contendo Cry 1F (híbridos 1.1, 2.1), que se mostrou mais eficaz no controle da larva nas 48 horas iniciais, eliminando mais de 70% das larvas (Figura 1). Segundo Mendes et al. (2009), a mortalidade das larvas não ocorre completamente nas primeiras 48 horas após a ingestão da toxina na planta; ela é distribuída durante todo o período de desenvolvimento do inseto, sendo limitante na fase de pupa.

No híbrido 3.2 a *S. frugiperda* teve a mesma sobrevivência que em alguns híbridos não-*Bt* (1.0, 4.0 e 5.0), mas diferiu dos híbridos que apresentam mesma toxina (1.2, 4.2, 5.2). Isto implica que existe interação evento geneticamente modificado (GM) e o híbrido no qual esse evento foi introgridido, mostrando comportamento diferenciado do evento *Bt*, dependendo do híbrido (WAQUIL et al., 2002; MENDES et al., 2009). No híbrido 1 houve diferença quanto a sobrevivência da lagarta-do-cartucho entre as toxinas Cry 1 F (1.1) e Cry 1 A(b) (1.2).

## **Avaliação do período de desenvolvimento larval da *S. frugiperda* em folhas de milho**

O período de desenvolvimento larval de *S. frugiperda* foi significativamente diferente para as diferentes toxinas *Bts*, presentes em milho GM avaliadas. Quando comparados os eventos que contêm a toxina Cry1A(b) com os demais, observa-se um atraso no desenvolvimento das larvas (Tabela 2), exceto se observamos o híbrido 3.2, onde não houve diferença do seu isogênico não *Bt*, mostrando que existe interação entre o efeito da toxina introgridida e o híbrido. Esse fato também foi observado por Mendes et al. (2009). Esse atraso acarreta num ciclo de vida mais longo, estando assim as larvas mais suscetíveis a fatores bióticos e abióticos de mortalidade. O que pode ser considerado um efeito indireto da tecnologia *Bt* Cry 1 A(b).

Em híbridos GM, expressando a toxina Cry 1 F, as larvas obtiveram menor período de desenvolvimento. Esses resultados evidenciam o efeito diferenciado das toxinas *Bts* avaliadas, sendo que ambas alteram os aspectos biológicos de *S. frugiperda*.

## **Avaliação da biomassa em 14 dias de *S. frugiperda* em folhas de milho *Bt* Cry 1 A(b) e Cry 1F**

Quando observou-se a biomassa de larvas (14 dias), constatou-se que as alimentadas pelo milho não-*Bt* tiveram uma média de biomassa superior quando comparadas com as que foram alimentadas por folhas do milho *Bt*; essas tiveram uma perda significativa em seu peso. As lagartas que ingeriram o milho com a toxina Cry 1A(b) tiveram um biomassa um pouco maior do que as lagartas que ingeriram o milho com a toxina Cry 1F, como o verificado por Mendes et al. (2009), em que os insetos sobreviventes apresentaram menor acúmulo de biomassa quando alimentadas com milho *Bt*, reduzindo sua competitividade no ambiente, o que pode comprometer o desempenho dessa população de insetos.

## **Avaliação do período e biomassa de pupa da *S. frugiperda* em folhas de milho *Bt* Cry 1 A(b) e Cry 1F**



Verificou-se que o período de pupa de *S. frugiperda* criadas em milho *Bt* de ambos eventos, foi menor do que os alimentados nos seus isogênicos não-*Bt*. Sendo que as lagartas mantidas em milhos com toxina Cry 1 A(b) 4.2 e seu isogênico não-*Bt* 4.0, obtiveram resultados significativamente iguais, o que não aconteceu com os demais eventos *Bt* e seus respectivos isogênicos.

As lagartas mantidas em milho não-*Bt*, tiveram biomassa de pupas semelhantes entre si. Quando se comparou com as lagartas mantidas no milho com a toxina Cry 1A(b) e isogênicos, percebeu-se um decréscimo acentuado na biomassa após alimentação no híbrido *Bt*. Já nas lagartas alimentadas com milho que expressa a toxina Cry 1F, a biomassa das pupas foi significativamente inferior que as alimentadas com a toxina Cry 1 A(b). Tal resultado também foi comprovado por Mendes et al. (2009), que obtiveram biomassa menor para os insetos desenvolvidos em milho *Bt*.

A redução de biomassa também foi observado por Sá et al. (2009), em hospedeiros menos adequados para o desenvolvimento da LCM. As pupas apresentaram menor biomassa, indicando que hospedeiros não apropriados comprometem o desenvolvimento dessa espécie.

O parâmetro biomassa de pupa é importante, pois, segundo Pencoe e Martin (1982), há uma correlação direta entre a biomassa de pupas da LCM e a fecundidade dos indivíduos.

## Conclusão

As larvas de LCM, mantidas se alimentando em milho expressando a toxina Cry 1 F, apresentaram maior mortalidade que as mantidas se alimentado do milho expressando Cry 1A(b);

O período de desenvolvimento foi prolongado, a biomassa de larva e de pupa, reduzida e um menor período de pupa aconteceu quando as larvas foram mantidas se alimentando de Cry 1 A(b);

As larvas alimentadas com milho expressando a toxina Cry 1 F apresentam menor período de desenvolvimento, biomassa de larvas e pupas.

## Referências

CAPALBO, D. M. F.; FONTES, E. M. G. **GMO Guidelines project**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 56 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 38).

CESCONETTO, A. O.; FAVERO, S.; OLIVEIRA, A. K. M.; SOUZA, C. C. Distribuição espacial do dano da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797), em Sidrolândia, Mato Grosso do Sul. **Ensaio e Ciência**, Campo Grande, v. 9, n. 2, p. 305-314, ago. 2005.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *trichogramma***. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1999. (Embrapa-CNPMS. Circular técnica, 30).

ETGES, H. **Pioneer responde: milho Bt; Híbridos Pioneer® com o gene YieldGard®**. 2008. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/ProdutosBiotecnologiaMilhoBT>>. Acesso em: 8 maio 2010.



FERNANDES, O. D. **Efeito do milho geneticamente modificado (MON810) em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e no parasitóide de ovos *Trichogramma spp.*** 2003. 182 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 5.0**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **2009, safra de grãos deve atingir 136,4 milhões de toneladas.** 2009. Disponível em: <[http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1568&id\\_pagina=1](http://www1.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1568&id_pagina=1)>. Acesso em: 5 maio 2010.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; FERMINO, T. C.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M.; CARNEIRO, M. A. A.; COSTA, M. C. A.; MARUCCI, R. C.; WAQUIL, J. M. Efeito da interação entre genótipo de milho e evento geneticamente modificado contendo a toxina Cry 1 A(B) nas variáveis biológicas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 10., 2009, Rio Verde. **Anais...** Rio Verde: FESURV, 2009. p. 368-374.

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M. **Uso do milho Bt no manejo integrado de lepidópteros-praga**: recomendações de uso Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 170).

PENCOE, N. L.; MARTIN, P. B. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development and adult fecundity on five grass hosts. **Environmental Entomology**, College Park, v. 11, n. 3, p. 720-723, 1982.

PURCINO, A. A. C.; WAQUIL, J. M.; CRUZ, J. C.; DUARTE, J. O.; GARCIA, J. C.; MENDES, S. M. Milho *Bt*: vantagens para a cadeia produtiva e a viabilidade da coexistência. **Grão em Grão**, Sete Lagoas, ano 3, ed. 15, jun./jul. 2009. Jornal eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/grao/15\\_edicao/index.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/grao/15_edicao/index.htm)>. Acesso em: 5 maio 2010.

SÁ, V. G. M.; FONSECA, B. C. V.; BOREGAS, K. G. B.; WAQUIL, J. M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 108-115, 2009.

WAQUIL, J. M.; VILELLA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt.*) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2002.

