

## CUSTO ADAPTATIVO DA RESISTÊNCIA DE *Bacillus thuringiensis* NA LAGARTA DA SOJA, *Anticarsia gemmatalis*

SOSA-GÓMEZ, D.R.<sup>1</sup>; MIRANDA J.E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Embrapa-Soja, Caixa Postal 231, Londrina, CEP 86001-970, Londrina-PR, drsg@cnpso.embrapa.br; <sup>2</sup> Embrapa-Algodão.

A introdução iminente de soja com o gene sintético Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*, no Brasil, em 2012 é uma alternativa de controle de lepidópteros praga. Porém, a disponibilidade da toxina em grandes áreas traz a preocupação da seleção de populações resistentes a estas toxinas. A presença do mesmo gene Cry1Ac em algodão transgênico também representa uma contribuição da exposição de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) à mesma toxina. Os principais alvos desta tecnologia são a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta-falsa-medideira, *P. includens* e ambas espécies apresentam ampla distribuição no Brasil.

Os campos de soja compartilham com algodão o mesmo sistema produtivo nas regiões nordeste e central do Brasil. Portanto, os estudos de custo adaptativo são importantes porque permitem realizar sua detecção e orientam sobre aspectos que podem ser utilizados para manejar a resistência. A detecção de custo adaptativo envolvendo raças resistentes a Bt é importante para entender as interações entre o uso do produto comercial (Dipel®) para o controle em áreas de refúgio e a toxina disponível nas plantas transformadas. Dipel WP é uma formulação comercial da raça HD-1, que contém toxinas Cry1A(a), Cry1A(b), Cry1A(c) (MASSON et al., 1989).

Neste trabalho investigamos se as populações *A. gemmatalis* resistentes a *B. thuringiensis* expressam custo adaptativo em parâmetros biológicos assim como sua resposta à toxina Cry1Ac presente no algodão-Bt. A raça de *A. gemmatalis* suscetível foi coletada em 1998, em Sertãoópolis, Paraná.

**Obtenção das populações resistentes:** Os insetos foram criados em dieta artificial e na 67ª geração a colônia foi dividida em duas, uma colônia foi selecionada com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel WP®, raça HD-1, 16,000 IU mg<sup>-1</sup>, 32 g kg<sup>-1</sup> e 968 g kg<sup>-1</sup>

de inerte, Abbott Laboratories) durante 144 gerações e a outra permaneceu sem pressão de seleção. Uma terceira população proveniente de Cruz Alta, Rio Grande do Sul mantida por três gerações em laboratório também foi utilizada nos bioensaios para verificar o estado de resistência ao Dipel WP® que foi inoculado por incorporação na dieta. As larvas alimentaram-se da dieta por 24 h. Após este período as larvas foram transferidas para copos com dieta sem Dipel. As concentrações letais (LC<sub>50</sub>) foram calculadas mediante probit e utilizadas para comparar as diferenças entre populações.

**Determinação de custo adaptativo:** Larvas neonatas foram individualizadas e confinadas em copos plásticos com dieta. Os parâmetros avaliados foram: duração da fase larval, viabilidade, número de instares, peso de pupas, razão sexual, longevidade do adulto, e número de ovos por fêmea e por dia. O peso das pupas foi determinado 48 h após sua formação, sendo registrados o número de pupas anormais e o peso de 700 neonatas de cada raça (grupos de 50 larvas). A cabeça e a distância entre setas frontais foram medidas para estimar as mudanças de instar. Um dia após a emergência dos adultos 20 casais foram colocados em tubos de PVC e alimentados com solução de mel. O número de ovos foi registrado diariamente, assim como a viabilidade e o período de incubação. As comparações entre raças suscetíveis e resistentes foram realizadas com testes de t e não paramétricos.

**Resposta a toxina Cry1Ac:** Devido a indisponibilidade da toxina Cry1Ac, bioensaios com algodão-Bt e não Bt foram realizados com folhas de plantas Bt e não Bt (Delta Opal e NuOpal) com 30 dias. O tecido foi liofilizado, moído e adicionado a dieta artificial na proporção de 2g de peso seco em 40 ml da dieta de Greene et al. (1976). A dieta com e sem algodão (Bt e não Bt) foi oferecida a larvas neonatas de *A. gemmatalis* resistentes a Dipel e duas populações suscetíveis (uma mantida por 194 gerações em laboratório e outra de

Cruz Alta, RS, mantida por três gerações). A sobrevivência após sete dias, peso larval, e número de instares foram comparadas estatisticamente (ANOVA e Tukey). As análises foram realizadas com o programa Sigmaplot 11.0 (www.systat.com).

Os resultados da análise de probit para a população resistente foram:  $CL_{50}=6642,1$   $\mu\text{g}$  de i.a.  $\text{mL}^{-1}$  de dieta;  $n=248$  lagartas,  $IC_{95}=4312,4 - 15589,9$ ;  $b=0,97 \pm SE=0,33$ ;  $X^2=0,79$  e para a população suscetível foram:  $CL_{50}=77,2$   $\mu\text{g}$  de i.a.  $\text{mL}^{-1}$  de dieta;  $n=309$  lagartas,  $IC_{95}=66.181,0 - 89.181,0$ ;  $b=3,4 \pm SE=0,4$ ;  $X^2=2,5$ . A taxa de resistência da população Dipel-resistente foi 86 vezes maior que a da suscetível. As lagartas suscetíveis ( $n=700$ ) pesaram em média  $0,078 \pm 0,006$  mg e a Dipel-resistente  $0,083 \pm 0,005$  mg, sem diferenças estatísticas entre elas (t test,  $t=0,58$ ,  $P=0,569$ ). Número de instares, dias na fase de pupa, longevidade de adultos, sobrevivência, ovos por fêmea e fertilidade de ovos da população resistente não diferiram da população suscetível (Tabela 1).

Araça Dipel-resistente de *A. gemmatalis* apresentou diferenças significativas na duração da fase larval, sendo 1,9 dias maior que na suscetível. Porém, o peso de pupas foi menor na população Dipel-resistente que na suscetível (Tabela 1). Não foram encontradas pupas anormais. A população de Cruz Alta foi afetada pelos tecidos de algodão na dieta, e foi significativamente afetada pela toxina Cry1Ac dos tecidos de algodão (Tabela 2). O peso larval de todas as populações foi afetado pela presença de algodão na dieta e foi severamente afetado pela toxina, ainda na população Dipel-resistente (Tabela 2). O número médio de mudas realizado pelas lagartas foi afetado pelo Delta Opal e fortemente afetado por

tecidos do Bollgard (Tabelas 2 e 3).

A raça Dipel-resistente de *A. gemmatalis* foi suscetível a toxina Cry1Ac das folhas de algodão. A pressão de seleção realizada com Dipel não provocou a seleção de indivíduos resistentes a Cry1Ac, a pesar de esta toxina estar presente nos cristais da raça HD-1 (MASSON et al. 1989). Assim, uso ocasional de Dipel em áreas de refúgio pode eventualmente ser considerado. As populações mantidas por mais de 144 gerações em laboratório tiveram um maior número de mudas e maior tolerância ao Dipel que as populações recentemente introduzidas na criação artificial e mantidas por três gerações. Estudos adicionais com *A. gemmatalis* são necessários porque é possível que populações de diferentes origens respondam diferente a pressão de seleção com entomopatógenos e/ou suas toxinas. Existe um pequeno custo associado com resistência ao Dipel para os parâmetros avaliados neste trabalho. Estas informações são úteis para definir estratégias de manejo em soja-Bt.

### Referências

- GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-488, 1976.
- MASSON, L.; PRÉFONTAINE, G.; PÉLOQUIN, L.; LAU, P.C.K.; BROUSSEAU, R. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. **Biochemical Journal**, v.269, p.507-512, 1989.

**Tabela 1.** Parâmetros biológicos de raças Dipel-resistentes e suscetíveis de *A. gemmatalis*, quando a raça resistente apresentava uma taxa de resistência de 86 vezes

Parâmetro	Sertanópolis	
	Suscetível	Resistente
Fase larval (dias)	13,88 ± 0,06 a	15,76 ± 0,07 b
Fase e pupa (dias)	8,50 ± 0,05 a	8,45 ± 0,76 a
Peso de pupa (mg)	266,00 ± 1,97 a	241,00 ± 1,89 b
Sobrev. na fase pupa (%)	92,00 ± 2,26 a	87,33 ± 2,67 a
Longevidade adulto (dias)	13,70 ± 0,80 a	14,1 ± 0,79 a
Ovos/ fêmea	755,06 ± 89,69 a	673,39 ± 70,88 a
Fase de oviposição (dias)	11,44 ± 1,04 a	10,56 ± 0,90 a
Eclosão ovos (%)	84,53 ± 2,93 a	78,88 ± 5,33 a

Médias ± SEM seguidas pela mesma letra dentro da linha não são significativamente diferentes, teste de Mann-Whitney Rank Sum ( $\alpha = 0,05$ ). Fecundidade definida como número de ovos depositados durante a vida do adulto

**Tabela 2.** Peso larval (mg) e sobrevivência (%) de *A. gemmatalis* alimentada durante sete dias em dieta de Greene e dieta contendo algodão não-Bt (Delta Opal) e algodão-Bt (Bollgard). Entre parêntesis o número de gerações em laboratório.

	<i>A. gemmatalis</i> , suscet. Sertanópolis, PR (194)	<i>A. gemmatalis</i> -suscet., Cruz Alta, RS (3)	A.g. resistente (144)	Dipel-
Dieta de Greene	228 ± 6,1 a <sup>1</sup> A <sup>2</sup> 100 % a A	254 ± 3,0 a B 93,7 ± 6,2% a A	170 ± 7,6 a A 97,9 ± 2,1 % a A	
Dieta de Greene + Delta Opal	16,4 ± 1,5 b A 85,8 ± 2,5 % a A	1,5 ± 0,2 b A 23,7 ± 9,4 % b B	6,3 ± 0,5 b A 90,0 ± 10,0 % a A	
Dieta de Greene + Bollgard	1,1 ± 0,1 c A 22,5 ± 14,3% b A	0,7 ± 0,1 <sup>3</sup> 4,6 ± 2,7 % b A	1,9 ± 0,2 c A 51,2 ± 11,6 % b A	

Médias (±SEM) seguidas da mesma letra nas colunas<sup>1</sup> (minúsculas) ou nas linhas<sup>2</sup> (maiúsculas) não são significativamente diferentes pelo teste Tukey (P<0,05). <sup>3</sup> Número insuficiente para realizar análise estatística.

**Tabela 3.** Número médio de instares de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta de Greene e dieta contendo algodão não-Bt (Delta Opal) e algodão-Bt (Bollgard). Entre parêntesis o número de gerações em laboratório.

	<i>A. gemmatalis</i> , suscet. Sertanópolis, PR (194)	<i>A. gemmatalis</i> -suscet., Cruz Alta, RS (3)	A.g. resistente (144)	Dipel-
Dieta de Greene	4,9 ± 0,02 a A	3,6 ± 0,19 a B	4,8 ± 0,08 a A	
Dieta de Greene + Delta Opal	3,7 ± 0,08 b A	2,1 ± 0,09 b B	2,9 ± 0,07 b A	
Dieta de Greene + Bollgard	1,8 ± 0,05 c A	1,2 ± 0,06 c A	1,8 ± 0,06 c A	

Médias (±SEM) seguidas da mesma letra nas colunas<sup>1</sup> (minúsculas) ou nas linhas<sup>2</sup> (maiúsculas) não são significativamente diferentes pelo teste Tukey (P<0,05).