

Análise de risco para manejo da resistência de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a toxina Cry1Ac no Brasil

CAVAGUCHI, SILVIA A.¹; MARTINELLI, SAMUEL³; MOSCARDI, FLÁVIO⁴; SOSA-GÓMEZ, DANIEL, R.² ¹Universidade Federal do Paraná, ²Embrapa Soja, ³Monsanto do Brasil, ⁴Universidade Oeste Paulista.
e-mail: akimi@cnpso.embrapa.br

Introdução

A lagarta falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidade), até o final da década de 90, era considerada praga secundária da cultura da soja, porém, no Brasil, a espécie passou a ser encontrada com maior frequência a partir de 2003, em todas as áreas cultivadas com soja, e tem-se observado que sua ocorrência pode ser simultânea ou mais tardia à lagarta *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Braga et al., 2011) .

Plantas geneticamente modificada com genes expressos da proteína de *Bacillus thuringiensis* (Bt), oferecem uma estratégia para o controle da praga e reduz o uso de inseticidas químicos (Rice e Pilcher, 1998). Possivelmente em 2012/13 será introduzida no Brasil, a soja transformada com o gene Cry1Ac de Bt, o que originou a necessidade de avaliar os níveis de suscetibilidade a esta toxina em populações provenientes de diversas regiões do país. Isto permite definir as bases, no território nacional, para verificar as possíveis alterações futuras dessa suscetibilidade, uma vez que essas populações poderão ser submetidas a pressão de seleção devido a disponibilidade da soja Bt em grandes áreas.

Entre os estudos de análise de risco, um dos aspectos mais importantes, consiste na avaliação da suscetibilidade as toxinas Cry antes da liberação das culturas Bt no ambiente, possibilitando assim, estudos posteriores de evolução das frequências alélicas dos genes de resistência à toxina. Esses estudos são realizados sobre populações geográficas da praga para ter um quadro amplo dos níveis de suscetibilidade. Desta maneira, o objetivo foi determinar a suscetibilidade natural de populações geográficas de *P. includens* à toxina Cry1Ac nas regiões produtoras de soja do Brasil.

Material e Métodos

Estudo da suscetibilidade natural de populações geográficas de *P. includens* a proteína Cry1Ac

A análise da suscetibilidade natural das populações de *P. includens* a toxina Cry1Ac foi realizada mediante a incorporação na dieta artificial. Na safra 2008/2009 as populações das lagartas foram provenientes das seguintes localizações Luis Eduardo Magalhães, Bahia; Santa Helena, Goiás; Londrina, Paraná e Rondonópolis, Mato Grosso. Na safra 2009/2010 as populações foram coletadas em Morrinhos, Goiás; Sertanópolis, Paraná, Campo Verde, Mato Grosso e Santa Cruz das Palmeiras, São Paulo.

O produto formulado da toxina sintetizada Cry1Ac (MVP II, Cry1Ac encapsulada de

Pseudomonas pela Dow Chemicals, EUA) foi fornecido pela Monsanto Co. (St. Louis, MO, USA) na concentração de 11,14%. A toxina foi armazenada a -20°C. Foram estabelecidas sete concentrações para os bioensaios. Para obter a concentração desejada, uma quantidade específica da toxina foi diluída em 40 ml de dieta artificial, em tubos tipo Falcon® de 50 ml, quando a temperatura da dieta atingiu $\approx 56^\circ\text{C}$. Para a testemunha foi adicionada a solução tampão a dieta. A dieta tratada foi misturada com o auxílio de um agitador do tipo Vortex e então vertida em placas em bandejas de 128 células (16 mm de diâmetro, CD International Pitman, NJ, USA). Aproximadamente 1 ml de dieta foi dispensada em cada célula para solidificação. A dieta foi deixada para solidificar por 1 hora, e uma larva neonata foi transferida para cada célula. A célula com dieta foi coberta e selada com revestimento que apresenta permeabilidade ao ar e incubadas em câmaras BOD a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 14:10 (L:E). Os ensaios foram avaliados após 7 dias quantificando os insetos mortos e por pesagem das lagartas vivas em grupos de 16 indivíduos, representando cada grupo uma repetição, para o cálculo do peso larval médio. Os dados de mortalidade de cada população testada foram submetidos à análise de Probit para estimativa de CL50 a utilização do programa Polo-PC (LeOra Software, 1987).

Monitoramento da suscetibilidade de populações de *P. includens* a toxina Cry1Ac

A suscetibilidade de populações de *P. includens* a toxina Cry1Ac foi avaliada nas populações provenientes das regiões produtoras de soja do Brasil da safra 2009/2010. Baseado nas respostas de concentração-mortalidade da população, duas concentrações diagnósticas foram escolhidas seguindo os critérios apresentados por Roush & Miller (1986). Estas concentrações serão utilizadas no programa de monitoramento da suscetibilidade de *P. includens* após a introdução da soja Bt no Brasil. O monitoramento prévio da suscetibilidade foi realizado por meio de bioensaios de concentração única aplicando essa concentração sobre um grande número de indivíduos ($n > 100$, utilizando 4 repetições) e avaliando mortalidade após 7 dias da inoculação. Para verificar as diferenças entre populações os dados foram analisados mediante análise de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947).

Resultados

Na safra 2008/2009 a concentração letal média (CL50) da toxina variou entre 0,77 a 1,12 $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$ dieta. A população de Goiás apresentou o menor valor da CL50 e o Paraná o maior valor (Tabela 1). A CL99 os valores variaram de 5,96 a 14,86 $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$ dieta.

Tabela 1. Concentração letal cinquenta e noventa e nove (CL50 e CL99) da toxina Cry1Ac *B. thuringiensis*, incorporadas na dieta para lagartas neonatas de *P. includens*, 7 dias após inoculação. Safra 2008/2009.

População	N ¹	CL ₅₀	IC (95%)	CL ₉₉	IC (95%)	Coeficiente angular \pm (EPM ²)
Londrina, Paraná	1152	1,12	0,61- 1,58	14,86	7,31- 89,59	2,08 \pm 0,19
Sta. Helena, Goiás	1536	0,77	-	5,96	-	2,63 \pm 0,31
Luis Eduardo Magalhães, Bahia	1472	0,82	0,47- 1,12	8,10	4,66- 27,73	2,34 \pm 0,19
Rondonópolis, Mato Grosso	1712	0,88	0,47- 1,23	9,30	5,29-32,58	2,27 \pm 0,18

n¹= número de insetos submetidos ao teste;

EPM²= erro padrão da média.

Na safra 2009/10 as CL50 variaram 0,81 a 1,53 $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$ dieta e suas CL99 entre 9,78 e 21,02 $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$ dieta. Quando comparadas as CLs entre as populações não foram observadas diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração letal cinquenta e noventa e nove (CL50 e CL99) da toxina Cry1Ac, incorporada na dieta para lagartas neonatas de *P. includens*, 7 dias após inoculação.

População	N ¹	CL ₅₀	IC (95%)	CL ₉₉	IC (95%)	Coeficiente angular ± (EPM ²)
Morrinhos, Goiás	768	1,39	0,57- 1,92	9,78	5,19- 108,97	2,75 ± 0,31
Sertanópolis, Paraná	1008	1,24	0,95- 1,53	13,20	8,73- 25,01	2,27 ± 0,16
Sta. Cruz das Palmeiras, São Paulo	1728	0,81	0,65- 0,96	9,92	6,91- 16,68	4,23 ± 0,26
Campo Verde, Mato Grosso	1232	1,53	0,98- 2,08	21,02	11,33- 79,54	2,05 ± 0,19

N¹= número de insetos submetidos ao teste;

EPM²= erro padrão da média.

Na safra 2009/10 foi iniciado o monitoramento com duas concentrações, 5,6 e 18 µg Cry1Ac ml⁻¹ dieta. A menor concentração provocou mortalidades entre 88,2 e 97,3%, sendo que a menor mortalidade ocorreu na população de Morrinhos - GO (88,2%), seguidas de Campo Verde - MT (93,7%), Santa Cruz das Palmeiras- SP (95,4%) e Sertanópolis - PR (97,3%). A maior dose causou mortalidade total nas populações de Sertanópolis - PR e Morrinhos - GO. Entretanto, nas populações de Campo Verde - MT e Santa Cruz das Palmeiras - SP ocorreu menor mortalidade e os insetos não se desenvolveram normalmente portanto, não foi possível fazer sua pesagem (Tabela 3). A concentração de 5,6 µg Cry1Ac ml⁻¹ dieta afetou significativamente o peso larval da população de Campo Verde - MT quando comparada com a testemunha (teste de Mann - Whitney, T= 87,000, P= 0,001).

Tabela 3. Mortalidade (%) e peso (mg) de *P. includens* submetida a bioensaios com concentrações diagnósticas da toxina Cry1Ac, incorporadas na dieta para lagartas neonatas, 7 dias após inoculação.

Localidade	Tratamento	n ¹	Número de insetos mortos (%)	Peso (mg por lagarta ± EP ²)
Sertanópolis, PR	Testemunha	160	28,1	7,4 ± 1,0
	18 µg.ml ⁻¹	496	100	-
	5,6 µg.ml ⁻¹	512	97,3	0,8
Campo Verde, MT	Testemunha	128	7,0	4,9 ± 0,4
	18 µg.ml ⁻¹	448	99,5	-
	5,6 µg.ml ⁻¹	448	93,7	0,6 ± 0,1
Santa Cruz das Palmeiras, SP	Testemunha	160	1,2	3,9 ± 0,1
	18 µg.ml ⁻¹	480	99,8	-
	5,6 µg.ml ⁻¹	480	95,4	0,4 ± 0,1
Morrinhos, GO	Testemunha	128	1	11,3 ± 2,5
	18 µg.ml ⁻¹	448	100	-
	5,6 µg.ml ⁻¹	448	88,2	0,7 ± 0,2

n¹= número de insetos submetidos ao teste;

EP²= erro padrão da média

Conclusões

Não houve diferença na suscetibilidade entre as populações de *P. includens* para toxina Cry1Ac.

As concentrações diagnósticas para monitorar a evolução de resistência a toxina Cry1Ac foram 5,6 e 18 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ de dieta.

Referências

BRAGA, D.P.V.; OLIVEIRA, W.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; OLIVEIRA, M.F. 2011. **Estudo de caso da soja Mon 87701x Mon 89788 (Bt/RR2)**. Cap. 17. In: Plantas Geneticamente Modificadas. Desafios e Oportunidades para os Trópicos. Editores Aluizio Borém e Gustavo Almeida UFV. p. 347-390 . 534 p. ISBN 978.85.60249.81-7

LEORA SOFTWARE. Polo-PC: A user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, CA, USA: **LeOra Software**, 22p. 1987.

MANN, H.B.; WHITNEY, D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. **Annals of Mathematics and Statistics**, v.18, p.50-60, 1947.

RICE, M.E.; PILCHER, C.D. Potential benefits and limitation of transgenic *B. thuringiensis* corn for management of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **American Entomologist**. v. 44, p. 75- 78, 1998.

ROUSH, R.T.; MILLER, G.L. Consideration for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economic Entomology**. v. 79, p. 293-298, 1986.