



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA – PIBIC

**Avaliação da mortalidade e do desempenho biológico
de *Spodoptera frugiperda* no milho Bt**

Relatório Final
Período da bolsa: de Setembro de 2022 a Agosto de 2023

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/CNPq

Orientador: Nilson Rodrigues da Silva

Autor: Michel Vinícios Gomes de Jesus Rodrigues

Resumo

A lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é a principal praga da cultura do milho, devido a sua alta capacidade de causar danos em folhas e grãos no campo. Para acabar com esse problema, a adoção de eventos milho transgênico que expressa uma ou mais toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido adotado como a principal estratégia de controle dessa praga. Diante disso, o objetivo neste trabalho é avaliar a eficácia de controle e o desempenho biológico de *S. frugiperda* no milho Bt. Para a execução do experimento foram utilizados dois genótipos de milho, sendo um convencional (não- transgênico) e um transgênico (VTPRO 2 que expressa as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab2). Neste trabalho, foram utilizadas populações de *S. frugiperda*, oriundas de coletas dos municípios de Nossa Senhora da Glória, Sergipe (GSE) e Canápolis, Minas Gerais (CMG) que foram submetidas a bioensaios em laboratório. Durante o estudo foram avaliadas os parâmetros biológicos peso de pupas, tempo de desenvolvimento e calculo do índice adaptativo das populações. De acordo com nossos resultados, o peso de pupa de 225,44 mg a 265,26 mg e o tempo de desenvolvimento larval variou de 17,05 a 18,14 dias, sendo significativamente maior para as populações GSE-CV e GSE-PRO em comparação a população CMG-CV. A população GSE-PRO apresentou o menor valor de índice adaptativo quando comparado as populações GSE-CV e CMG-CV, indicando a presença de alto custo adaptativo dessa população ao se alimentar das folhas do evento de milho Bt PRO 2. A população CMG-PRO não sobreviveu a exposição ao milho Bt, indicando uma alta susceptibilidade dessa população ao evento de milho Bt usado nesse estudo. Nenhuma das populações sobreviveram até a fase reprodutiva, quando expostas ao milho Bt. De acordo com os resultados, o híbrido de milho VTPRO 2 apresentou alta eficácia de controle de *S. frugiperda*, indicando que este evento de milho deve ser considerado nas estratégias de manejo deste inseto praga nos estados de Sergipe e Minas Gerais.

Palavras-chave: *Zea mays*; lagarta-do-cartucho; transgênico; resistência.

SUMÁRIO

1. Introdução	5
2. Objetivos	6
2.2. Objetivo geral	6
2.3. Objetivos específicos	6
3. Material e Métodos	6
3.1 Os insetos	6
3.2 Genótipos de milho e cultivo de plantas	7
3.3 Confecção de bioensaios em laboratório	7
3.4 Análise dos dados	7
4. Resultados e discussões	8
5. Conclusões	11
6. Perspectivas	12
7. Referências bibliográficas	13

1. Introdução

O milho, *Zea mays* (Lineu, 1753.), constitui um dos cereais mais cultivados no mundo, devido a sua grande importância econômica e social. Devido ao grande aumento da área cultivada com essa cultura nas últimas décadas, vários fatores tem contribuído para limitar a produção dos cultivos de milho em campo, dentre estes fatores podemos destacar o ataque de insetos pragas (Estabele *et al*, 2021). A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas do milho, devido a sua capacidade de causar perdas na produção que podem variar de 34% a 52% (Borém *et al.*, 2017). *S. frugiperda* causa danos a cultura ao realizar inicialmente a raspagem das folhas durante sua alimentação nos estágios iniciais de desenvolvimento, posteriormente, as lagartas passam a atacar o cartucho do milho nos estágios finais de desenvolvimento. No campo, o seu ataque é identificado através da presença de furos irregulares nas folhas e de "serragem" no cartucho da planta, a *S. frugiperda* pode atacar a base do caule das plantas jovens e as espigas (Picanço, 2009).

Várias estratégias tem sido adotadas no controle de *S. frugiperda* em campo, porém, atualmente o uso de variedades de milho transgênico que expressam uma ou mais toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem se tornado a principal estratégia de controle dessa espécie. O uso de plantas resistentes são utilizadas para minimizar os prejuízos provocados pelos lepidópteros (Lopes, 2014). De acordo com a CTNBio (2014), existem 116 eventos transgênicos favoráveis à liberação no Brasil, envolvendo o controle de insetos com diferentes genes Bt, entre os quais se encontram as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e Cry35Ab1. Segundo Tabashnik *et al.* (2013), apesar dos benefícios, a utilização de plantas transgênicas tem despertado o interesse dos órgãos de regulamentação e de pesquisadores, sobre a possibilidade de evolução de resistências dessas pragas às proteínas Bt.

Após mais de duas décadas de uso, atualmente já há relatos sobre resistência de *S. frugiperda* em milho Bt em Porto Rico (à proteína Cry1F), e no Brasil, onde se constatou a resistência às proteínas Cry1F e Cry1Ab (Faria, 2018). A evolução da resistência consiste na seleção de indivíduos resistentes, e também no aumento da frequência desses indivíduos na população da praga, consequentemente limitando a eficiência das tecnologias no manejo das pragas (Araújo, 2022). Diante disso, para evitar o surgimento de novas populações resistentes no campo, as empresas começaram a fazer investimentos na produção de cultivares Bt que expressam dois ou mais genes de proteínas Cry, esse evento é chamado piramidado (J.M. Waquil *et al*, 2013).

Estudos voltados para o entendimento da susceptibilidade de populações de

S. frugiperda ao milho Bt, ainda são escassos. De acordo com França *et al.* (2018), a susceptibilidade de populações de *S. frugiperda* as toxinas Bt pode ser avaliada através da exposição prolongada destes insetos a essas toxinas em laboratório. Diante do exposto, torna-se necessário a confecção de novos estudos para avaliar a eficácia de controle dos eventos de milho transgênico Bt em populações de *S. frugiperda* e o custo fisiológico desta exposição. Para tanto, populações de *S. frugiperda*, oriundas de coletas em Sergipe e Minas Gerais serão submetidas a bioensaios em laboratório.

2. 2. Objetivos

2.2. Objetivo geral

Avaliar a mortalidade e o desempenho biológico de diferentes populações *Spodoptera frugiperda* expostas a um evento de milho piramidado Bt.

2.3. Objetivos específicos

- i) Estabelecer populações de *S. frugiperda* oriundas de diferentes estados e histórico de cultivo de milho.
- ii) Cultivar eventos de plantas de milho convencional e transgênico Bt para obtenção de folhas para alimentação das lagartas.
- iii) Avaliar o desempenho biológico das diferentes populações de *S. frugiperda* em milho convencional e transgênico (Bt).

3. Metodologia

3.1 Os insetos

O experimento foi conduzido no laboratório multiusuário da Universidade Federal de Sergipe (UFS)/ Campus do Sertão, Nossa Senhora da Glória –SE. Populações de *S. frugiperda* foram estabelecidas em laboratório, a partir de coletas em lavouras comerciais de milho nos estados de Sergipe e Minas Gerais. No laboratório, ambas populações de insetos foram mantidas em dieta artificial segundo Greene; Leppla; Dickerson, 1976) e ambiente climatizado (de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 15\%$ e fotoperíodo de 14L: 10 L:D), de acordo com a metodologia de Kaster- junior *et al.* (1978).

3.2 Genótipos de milho e cultivo de plantas

Para a execução do experimento foram utilizados dois genótipos de milho, sendo um convencional (não- transgênico) e um transgênico (VTPRO 2 que expressa as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab2). As folhas de milho necessárias para realização dos bioensaios, foram obtidas através do plantio escalonado de ambos os genótipos de milho, que foi constituído por uma nova semeadura a cada 15 dias. Durante o cultivo não houve aplicação de inseticidas nas plantas. A irrigação das plantas foi realizada de acordo com a umidade do solo. A coleta de folhas nas plantas foi feita entre os estágios fenológicos V4-V9.

3.3 Confeção de bioensaios em laboratório

Para avaliação do desempenho biológico das populações de *S. frugiperda* é utilizado o delineamento inteiramente casualizados, em esquema fatorial 2 x 2 [Genótipos de milho (Bt e não-Bt) x População de *S. frugiperda* (coletadas em SE e MG)] e 16 repetições. Cada repetição foi constituída de duas células, de uma bandeja plástica com 16 células, contendo cinco lagartas neonatas (0 a 24 horas de vida) de *S. frugiperda* e a folha de milho em cada célula, onde as folhas foram cortadas próximo a região da bainha, acondicionadas em recipiente plástico contendo água, e posteriormente levadas para o laboratório e seccionadas em fragmentos de 3 cm ao longo da lâmina foliar.. Para cada tratamento foram utilizadas 160 insetos (neonatas) selecionadas ao acaso e acondicionadas em grupo de cinco neonatas em duas bandejas de policloreto de vinil (PVC) de 16 células, contendo um fragmento de 3 cm da folha de milho. Diariamente, foi realizada a limpeza das bandejas (para eliminação de fezes) e a troca das folhas de milho até as lagartas atingirem o estágio de pupa. Adultos de *S. frugiperda*, obtidos a partir do grupo de 160 neonatas de cada tratamento, foram usados de forma aleatória para a formação de 30 casais. Cada casal foi acondicionado em gaiolas de PVC (10 cm altura x 10 cm) e mantidos até a sua morte. Diariamente foram realizadas as coletas e o acondicionamento das massas de ovos em potes de 50 ml contendo um disco de papel toalha umedecido, onde estas permaneceram por 3 dias ou até sua eclosão dos ovos. Nessa parte também foi realizada a contagem do número total de neonatas por casal.

3.4 Análise dos dados

A avaliação do desempenho larval de *S. frugiperda* no híbrido de milho Bt foi realizada através do índice de adaptação (IA) proposto por Boregas et al., (2013), que

avalia o desempenho larval em diferentes hospedeiros alternativos, sendo que: IA = sobrevivência larval (%) x biomassa de pupas (mg) / período de desenvolvimento larval (dias). Com os dados corporal, taxa de sobrevivência e tempo de desenvolvimento foi calculada a taxa de acúmulo de biomassa larval usando a fórmula $ac = \frac{\text{sobrevivência (proporção)} \times \text{peso larval (mg)}}{\text{tempo de desenvolvimento (dia)}}$. Além disso, também foi calculada a taxa de sobrevivência marginal (até pupa), a taxa de viabilidade de pupas e a taxa de fertilidade das fêmeas usando a análise de modelos lineares generalizados PROC GLIMMIX (SAS Institute 2011) com distribuição gaussiana. Para todos os cálculos de graus do resíduo e o procedimento da diferença mínima significativa (DMS) foi utilizado o método Kenward-Roger.

4. Resultados e discussões

Neste trabalho foi avaliado a eficácia de controle de um evento de milho transgênico Bt em populações de *S. frugiperda* e o custo fisiológico desta exposição, em populações oriundas dos Estados de Sergipe e Minas Gerais, sendo avaliadas os parâmetros (peso de pupas, tempo de desenvolvimento, índice adaptativo e reprodutivo das populações).

Quando comparadas, os genótipos variaram de 225,44 mg a 265,26 mg, onde o peso de pupa foi maior para a população GSE-PRO e menor para a população CMG-CV. Mesmo sendo exposta ao milho PRO2 não manifestou custo em seu desenvolvimento, e muito menos houve variância significativa da população GSE-CV. Já a população CMG-CV não foi inserida, pois não ocorreu a sobrevivência da população (Figura 1). Essa diferença de peso a favor de GSE-PRO pode ser um indicativo de uma maior adaptação destes insetos a disponibilidade e a qualidade dos recursos nutricionais presentes na folha de milho, fato que influenciou diretamente o crescimento e o tamanho das pupas. Segundo Busato et al., (2006), insetos com pupas maiores e mais pesadas podem ter vantagens em termos de sobrevivência e maior sucesso reprodutivo.

A diferença no tempo de desenvolvimento larval entre populações de *S. frugiperda* resistentes e suscetíveis à toxina Bt destacam o papel crucial da resistência em favorecer determinadas características fundamentais do ciclo de vida desses insetos. O tempo de desenvolvimento larval acabou variando de 17,05 a 18,14 dias, sendo significativamente maior nas populações GSE-CV e GSE-PRO em comparação a população CMG-CV, não ocorreu a comparação com a população CMG-PRO

porque as neonatas não sobreviveram (Figura 2). Nossos resultados estão em concordância com estudos prévios que indicam que a resistência a toxinas Bt pode

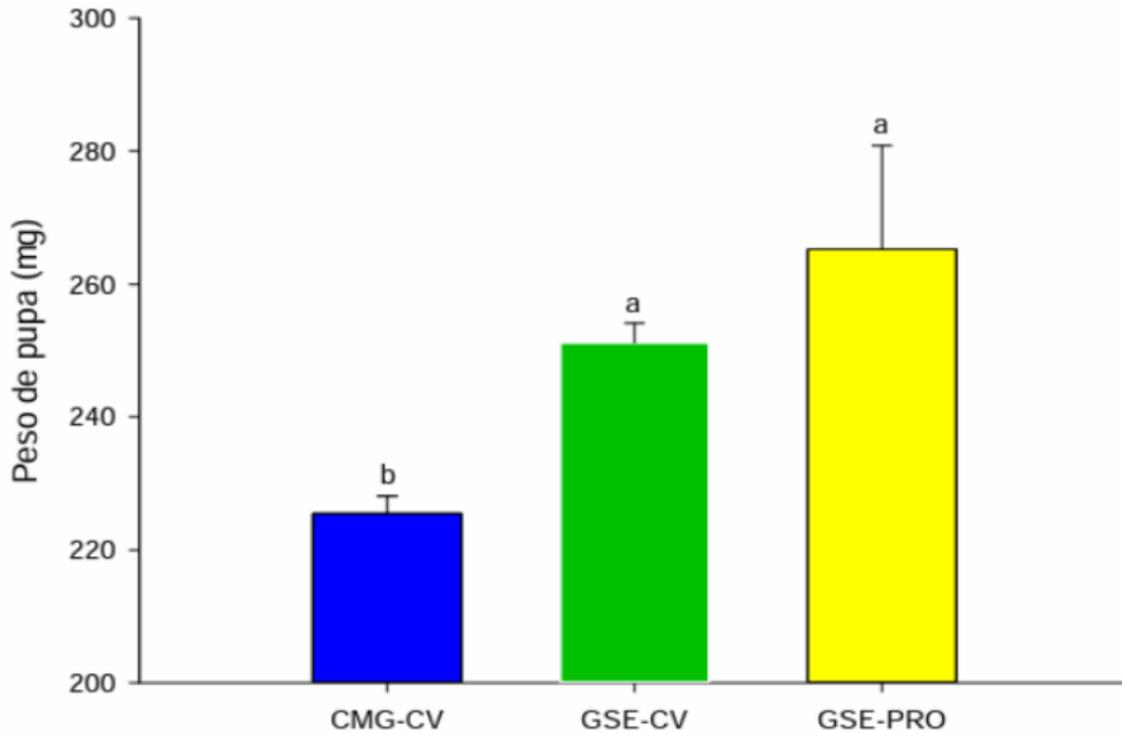


Figura 1. Peso (média \pm erro padrão) de pupa de duas populações de *S. frugiperda* alimentadas com milho PRO 2 e convencional. As médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si no método Holm- Sidak. $P = 0.05$. Não houve sobreviventes na população CMG – PRO.

levar a mudanças fenotípicas associadas ao desenvolvimento, como observado por Santos-Amaya et al. (2017). As populações GSE-PRO e GSE-CV apresentaram um maior custo adaptativo para completar seu ciclo, uma vez que ocorreu um maior tempo de desenvolvimento larval (Figura 2). O custo da resistência pode alterar os padrões de alimentação, taxa metabólica e comportamento alimentar, culminando em diferenças substanciais no tempo necessário para atingir os estágios subsequentes do desenvolvimento larval. A capacidade das populações resistentes de *S. frugiperda* de continuar se desenvolvendo em um ambiente com presença de toxinas Bt evidencia a dificuldade de manejo dessa espécie em função da complexa interação entre as respostas adaptativas desse inseto e as pressões seletivas exercidas pelo uso extensivo das tecnologias Bt.

O índice adaptativo indicou o maior custo adaptativo para a população GSE-PRO expostas ao milho Bt, obtendo uma diferença significativa quando comparada às

populações CMG-CV e GSE-CV que foram expostas ao milho convencional (Figura 3). Provavelmente, essa diferença nos valores do índice adaptativo pode ter ocorrido

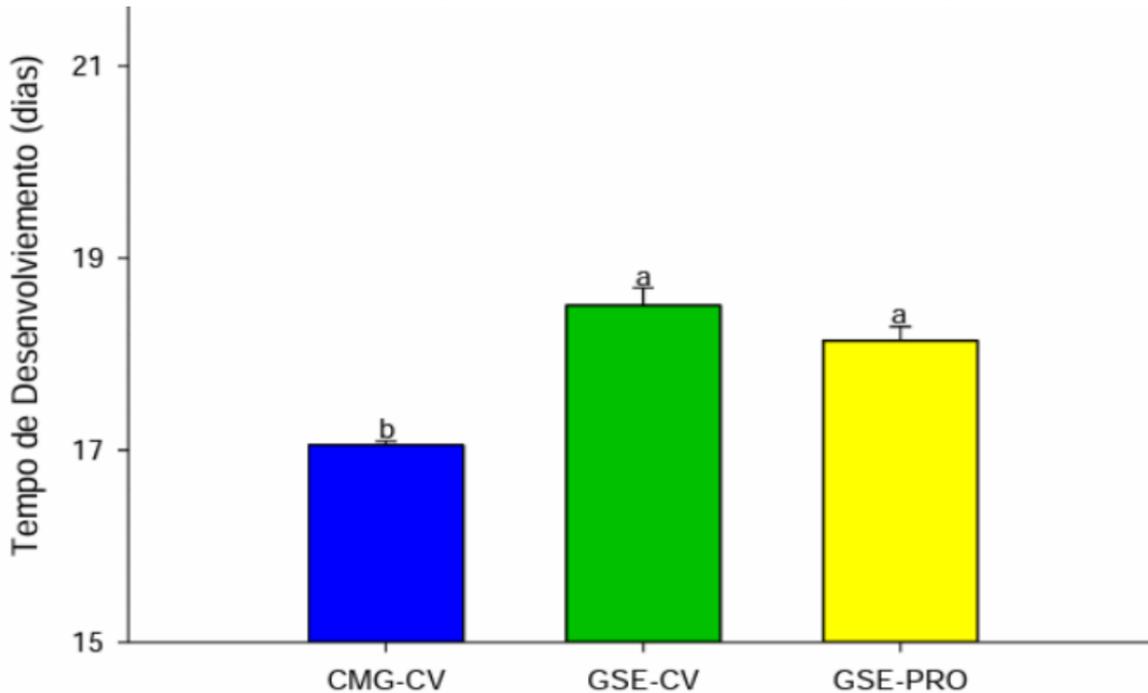


Figura 2. Tempo (média \pm erro padrão) de desenvolvimento de duas populações de *S. frugiperda* alimentadas com milho PRO 2 e convencional. As médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si no método Holm - Sidak $P = 0.05$. Não houve sobreviventes na população CMG - PRO.

em função da intensa pressão de seleção sobre a linhagem resistente, fato que pode ter contribuído para estabilizar a resistência na ausência de pressão de seleção, diminuindo assim os possíveis efeitos do custo adaptativo (GASSMANN et al. 2009). Nossos resultados estão de acordo com as observações de adaptação fenotípica descritas por Vélez, et al., (2014) e Santos-Amaya et al. (2017), destacando a interação entre os mecanismos de resistência e os componentes da aptidão, como a taxa de reprodução e a sobrevivência. Essa grande redução observada no valor de índice adaptativo da população GSE-PRO no milho Bt (Figura 3), destaca a importância da compreensão detalhada das consequências da resistência não apenas em relação à sobrevivência, mas também aos aspectos reprodutivos, o que tem implicações diretas para estratégias de manejo integrado e conservação da cultura do milho.

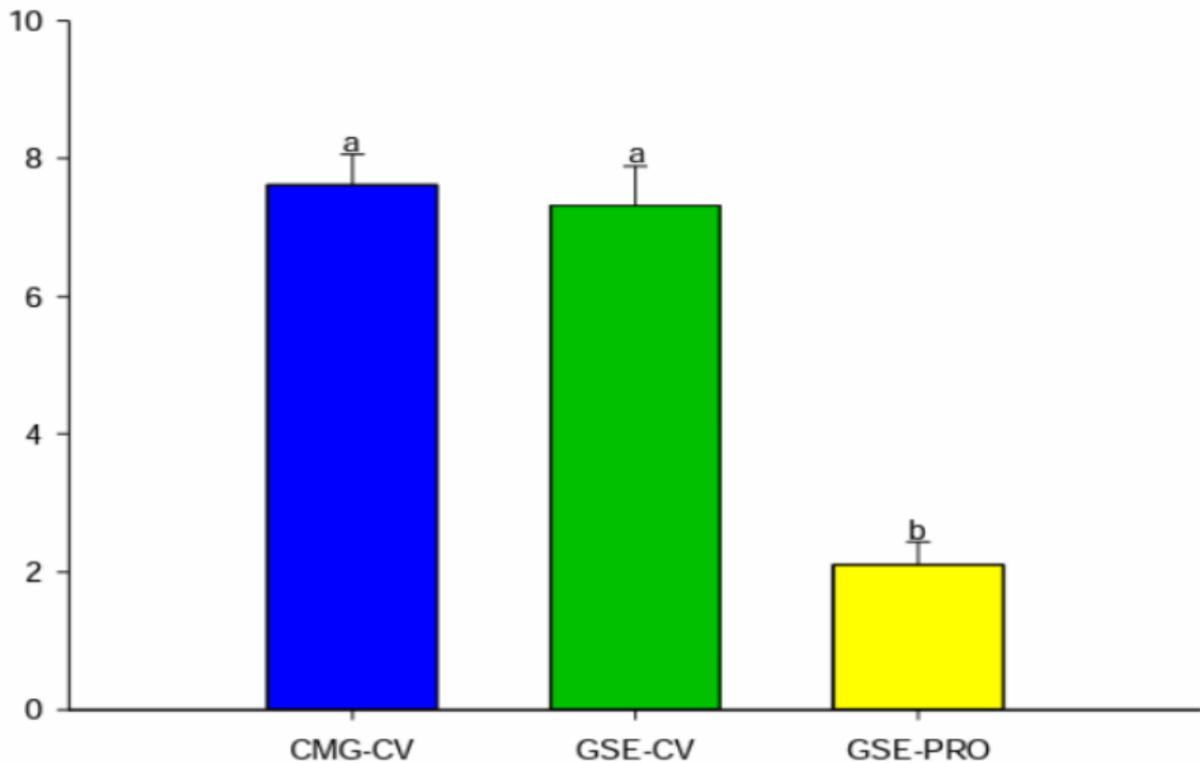


Figura 3 – Índice adaptativo (média \pm erro padrão) de duas populações de *S. frugiperda* alimentadas com milho PRO 2 e convencional. As médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si no teste de Tukey. $P = <0.05$. Não houve sobreviventes na população CMG-PRO.

5. Conclusões

Neste trabalho nós reportamos que o híbrido de milho transgênico PRO 2 apresentou alta eficácia no controle contra o ataque de *S. frugiperda* paras as populações de Sergipe (GSE) e Minas Gerais (CMG). Embora a população GSE tenha sobrevivido a exposição durante a fase larval, os valores de índice adaptativo indicam que há um alto custo fisiológico para a sobrevivência dessa espécie no milho Bt. Todos os resultados indicam que o plantio do evento de milho transgenico PRO 2 ainda são viáveis para o controle de *S. frugiperda* nos municípios de N. Sra. Da Glória-SE e Canápolis-MG.

6. Perspectivas de futuros trabalhos

Os resultados obtidos neste trabalho representa o primeiro passo para o entendimento da susceptibilidade de populações de *S. frugiperda* aos eventos de milho transgenicos Bts cultivados no estado de Sergipe. Porém, a continuação desses estudos estão diretamente assocoda a disponibilidade de recursos. A priori, objetiva a publicação de um artigo científico com os resultados desse estudo, porém outros estrudos complementares são necessários. Além disso, parte dos resultados serão publicados na forma de resumos em simpósio de iniciação científica (SEMAC). Todas essas ações visam difundir o conhecimento estabelecido neste trabalho e contribuir para a melhoria das estratégias de manejo integrado de pragas do milho na região.

7. Referências bibliográficas

ARAÚJO, R.M. Análise da Conjuntura Atual, desafios e Oportunidades do uso do Controle Biológico no Manejo de Resistência de Pragas às Plantas Geneticamente Modificadas de algodão, milho e soja com Tecnologia Bt no Brasil. **São Paulo**, Fundação Getulio Vargas, 2022.

BORÉM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Ed.). **Milho: do plantio à colheita**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2017. 382 p.

BUSATO, Gustavo Rossato et al. Adequação de uma dieta artificial para os biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bragantia**, v. 65, p. 317-323, 2006.

CTNBIO, **Resumo geral de Plantas Geneticamente modificadas aprovada para Comercialização**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 2016

ESTABELE, D. L.1; BASSETTO FILHO, J. J.; PINHO, C. A.; OLIVEIRA, T. L.; GOMES, L. R. O.; ZAMBRANA, G. O.; PRESTES, C. F.; FUGA, F.; ROGGIA, S. **Controle da lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho com inseticidas químicos associados a extratos de planta**. Embrapa Soja Londrina- PR , 2021.

FARIA, S.C.Q.S. **Resistência de milho convencional e transgênico e o efeito no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. Jaboticabal, 2018.

FRANÇA, J.C.O.; PITTA, R.M.; COELHO, C.C.S.; TEATINI, B.C.; MIRANDA, M.S.; DAMASCO, N.C.R.; MENDES, S.M. **Desempenho de populações de campo de *Spodoptera frugiperda* em milhos Bt Cry1A.105 + Cry2Ab E Vip3Aa**. Lavras-MG, 2018.

GASSMANN, A.J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. **Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis***. Annual Review of Entomology, Stanford, v. 54, p. 147-163, 2009.

Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W. A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J. Econ. Entomol. 69, 487–488. <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>.

LOPES, G. S. **Resistência de cultivares de milho convencional e transgênico à *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**. Jaboticabal, 2014.

PICANÇO, Marcelo Coutinho; GONRING, A. H. R.; OLIVEIRA, IR de. **Manejo integrado de pragas**. Viçosa: UFV, p. 144, 2010.

SANTOS-AMAYA, Oscar F. et al. Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, v. 73, n. 1, p. 35-43, 2017.

TABASHNIK, B. E. RENSBURG, J. B. J. V.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n.6, p. 2011-2025, 2009.

VÉLEZ, A. M. et al. Fitness costs of Cry1 F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of applied entomology**, v. 138, n. 5, p. 315-325, 2014.

WAQUIL, J. M.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; OLIVEIRA, W.S.; BERGUES, G.U.; HEAD, G.P.; MARTINELLI, S. **Manejo de lepidópteros-praga na cultura do milho com o evento Bt pirimidado Cry1A.105 e Cry2Ab2**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.48, n.12, p.1529-1537, dez. 2013.