

## ***Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) como indicador biológico da expressão de proteína Cry1Ac em folíolos de soja**

PENTEADO, F.G.<sup>1</sup>; LOPES, I. de O.N.<sup>2</sup>; ALMEIDA, A.M.R.<sup>2</sup>; SOSA-GÓMEZ, D.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa, <sup>2</sup>Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, Distrito de Warta, C.P. 231, CEP 86001-970, Londrina-PR, daniel.sosa-gomez@embrapa.br.

### **Introdução**

Aprovada no ano de 2010 e lançada no mercado no ano de 2013, a tecnologia Intacta RR2 Pro permite o controle de algumas espécies de lagartas, minimizando a necessidade de aplicação de inseticidas químicos na cultura da soja devido à produção da proteína Cry1Ac no tecido vegetal. O manejo de resistência a essa proteína depende da forma de herança dos genes de resistência no inseto, do potencial de expressão do gene inserido na planta e da utilização de refúgio. Portanto, a inferência dos níveis de expressão da proteína na planta por meio de sua atividade biológica na lagarta pode ser um bom indicador do seu potencial de controle.

Quantificações da proteína Bt em folhas de soja por meio do método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em Macrae et al. (2005) e Yu et al. (2013) produziram resultados contrastantes quanto ao potencial de expressão de proteína Cry1Ac. A adoção de um indicador biológico pode auxiliar nos trabalhos de quantificação da expressão de proteínas Cry em cultivares Bt, como uma metodologia adicional que poderá complementar inferências realizadas por outras técnicas.

A variabilidade genética existente dentro de populações de lagartas possibilita diferentes níveis de tolerância à proteínas Bt entre indivíduos, o que nos permite calcular curvas de suscetibilidade de diferentes populações a essas proteínas inseticidas. Tendo em vista que as curvas de suscetibilidade à proteína Cry1Ac para *A. gemmatalis* são conhecidas (Yano et al., 2012) e que esse inseto apresenta elevada suscetibilidade quando comparado a outras espécies, ele pode atuar como indicador biológico da quantidade dessa proteína presente nas folhas de soja e contribuir com os trabalhos atuais de quantificação.

### **Material e Métodos**

Em diferentes períodos do desenvolvimento da cultura, amostras de 10 folíolos de soja da cultivar BRS 1010 IPRO foram coletadas e armazenadas a -80°C durante a safra 2017/18, por um período de aproximadamente seis meses, até a realização dos bioensaios. A soja foi implantada a campo no dia 19/10/2017, seguindo o manejo recomendado para a região.

Os níveis de proteína Cry1Ac nas folhas de soja foram determinados pela relação de equivalência de mortalidade nas concentrações letais a 50% da população (CL<sub>50</sub>). Para tanto, foram realizados bioensaios utilizando-se extratos de folíolos de soja coletados aos 32, 43, 62, 81, 102 e 123 dias após o plantio (DAP) e bioensaios com a proteína formulada padrão. A partir das curvas de mortalidade, foram estimadas as CL<sub>50</sub> e seus respectivos intervalos de confiança, para cada data de coleta.

Para se obter o extrato de folíolos, foi realizada a maceração do tecido foliar (1g de folíolos: 10 mL de água) em microtubos com auxílio do abrasivo carborundum e pistilo plástico. Os resíduos sólidos foram descartados e concentrações do sobrenadante desse extrato foram testadas para se determinar as concentrações letais à 1% e 99% da população de *A. gemmatalis*. A partir dessas, foram obtidas sete diluições dentro desse intervalo, além de uma testemunha constituída apenas por água destilada. Uma alíquota de 20 µL de solução tratamento foi aplicada e espalhada sobre a superfície de 1mL de dieta, a qual estava acondicionada em bandejas de 128 células (BIO-BA-128; CD International Inc., Pitman, NJ), subdivididas em 8 partes de 16 células. Após a secagem (aproximadamente 20 min), uma lagarta neonata foi

aconditionada em cada célula e as bandejas mantidas em câmaras B.O.D. a 26°C ± 2°C, UR de 60% ± 10% e fotofase de 14 horas. As mortalidades sob cada concentração foram avaliadas em quatro repetições, executadas em dias subsequentes.

O estudo com padrão conhecido de proteína Cry1Ac foi conduzido de modo semelhante, tendo sido a formulação MVP II (Gilroy; Wilcox, 1992) o padrão de proteína utilizado. Nesse estudo, as concentrações utilizadas foram 0,5; 0,333; 0,222; 0,148; 0,099; 0,066 e 0,044 ng de Cry1Ac/cm<sup>2</sup> de dieta artificial. Para se calcular as quantidades de proteína inseticida nos extratos, foi utilizada a Equação 1, em que os fatores 1000 e 20 correspondem respectivamente às transformações 1ng para 1µg e de 1µL para 20µL, que foi alíquota distribuída na dieta.

$$\mu\text{g de Cry1Ac. g}^{-1}\text{folha fresca} = \frac{CL_{50} \text{ bioensaio Cry1Ac (ng.cm}^{-2}\text{).1000}}{CL_{50} \text{ bioensaio extrato de folha (}\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}\text{.cm}^{-2}\text{).20} \quad (1)$$

A análise de dados foi realizada utilizando-se o modelo log-logístico, com quatro parâmetros, adotando-se o pacote drc do ambiente R (Ritz et al., 2015) para o ajuste dos modelos e estimativas das concentrações letais.

## Resultados e Discussão

Dois bioensaios foram realizados para obtenção das curvas de mortalidade de *A. gemmatilis* alimentadas com dieta tratada superficialmente com a proteína Cry1Ac. A Tabela 1 mostra os parâmetros dessas curvas (1 e 2): concentrações letais a 50% da população (CL<sub>50</sub>), estimativas das taxas de variação da mortalidade em torno da CL<sub>50</sub> ( $\hat{b}$ ) e respectivos erros padrões dessas estimativas ( $\hat{\sigma}_b$  e  $\hat{\sigma}_{CL_{50}}$ ) e os intervalos de confiança para as estimativas da CL<sub>50</sub>. Conforme pode ser observado por meio dos intervalos de confiança, não houve diferença significativa entre as CL<sub>50</sub> entre os dois bioensaios, tendo sido obtidas as estimativas de 0,18 ng.cm<sup>-2</sup> (IC: 0,10 – 0,26) e 0,09 ng.cm<sup>-2</sup> (IC: 0,08 – 0,11) de proteína para matar 50% dos insetos. Os valores de  $\hat{b}$  que apontam a inclinação da reta tangente à curva de mortalidade na CL<sub>50</sub> também não diferiram significativamente.

Conforme a Tabela 2 mostra, nos bioensaios com extratos de folhas ocorreram apenas variações aleatórias entre os valores das CL<sub>50</sub> obtidas nas cinco primeiras datas de coleta, tendo sido as estimativas aos 123 dias significativamente maiores que os obtidos nas amostras coletadas aos 81 e 102 (R6) dias após o plantio (DAP). Esse aumento significativo na CL<sub>50</sub> aos 123 DAP seria um indicador de uma queda na produção da proteína inseticida na fase final reprodutiva, em estágio avançado de senescência. Explorando as relações entre os dias da coleta e as estimativas de CL<sub>50</sub> nas datas anteriores a 123 DAP, observou-se uma fraca relação linear entre os dias de coleta e a produção de Cry1Ac pela planta, porém uma forte associação polinomial quadrática (R<sup>2</sup>=79,5%), na qual a CL<sub>50</sub> máxima seria obtida em torno de 61 DAP. Esses padrões possivelmente refletem a produção da proteína inseticida pela planta no período mais crítico para a ocorrência da praga.

Comparando as CL<sub>50</sub> obtidas para os extratos de folhas das diferentes coletas com as CL<sub>50</sub> do padrão de proteína Cry1Ac, é possível inferir a concentração de proteína Cry1Ac em folíolos de soja BRS 1010 IPRO, os quais estão mostrados na Figura 1. Conforme essa figura e a Tabela 2 mostram, as relações entre as CL<sub>50</sub> e os teores de proteína foram inversamente proporcionais, considerando-se os dois bioensaios com a proteína padrão. As diferenças significativas observadas entre as estimativas dos teores nos extratos, em relação aos bioensaios 1 e 2, possivelmente resultaram das variações nas populações dos insetos utilizados.

## Conclusão

O método de quantificação é promissor como indicador biológico dos teores de Cry1Ac em folíolos de soja, uma vez que os resultados foram consistentes em múltiplos bioensaios com os extratos. As diferenças encontradas entre os valores

relativos aos diferentes bioensaios que utilizaram o padrão Cry1Ac podem ser explicadas pelas variações entre as populações de lagartas utilizadas em cada bioensaio.

## Referências

GILROY, T. E., WILCOX, E. R. **Hybrid *Bacillus thuringiensis* gene plasmid, and transformed *Pseudomonas fluorescens***. US Patent, 5,128-130, 1992.

MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A.; GAMUNDI, J. C.; HARRISON, L. A.; KABUYE, V. T.; MCPHERSON, R. M.; MIKLOS, J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry1A gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 577-587, abr. 2005.

RITZ, C., BATY, F., STREIBIG, J. C., GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **Plos One**, v. 10, n. 12, e0146021, 2015.

YANO, S. A. C.; SANTANA, G. K. S.; NEIVA, M. M.; MOSCARDI F.; MARTINELLI, S.; SOSA-GOMEZ, D.R. Tolerância de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Pseudoplusia includens* (Walker) e *Rachiplusia nu* (Guenée) à proteína Cry1Ac. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6. 2012, Cuiabá. **Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável: anais**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 5 p. 1 CD-ROM.

YU, H.; LI, Y.; LI, X.; ROMEIS, J.; WU, K. Expression of Cry1Ac in transgenic bt soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. **Pest Management Science**, v. 69, n. 12, p. 1326-1333, 2013.

Tabela 1. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* à proteína Cry1Ac proveniente do padrão MVP II com 11,2% de concentração. N=448 insetos;  $\hat{b}$ =taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL<sub>50</sub>; CL<sub>50</sub>=concentração letal para 50% dos indivíduos;  $\hat{\sigma}_b$ =erro padrão da estimativa  $\hat{b}$ ;  $\hat{\sigma}_{CL50}$ =erro padrão da estimativa da CL<sub>50</sub>; IC=intervalo de confiança para CL<sub>50</sub>

Bioensaios	$\hat{b} \pm \hat{\sigma}_b$	CL <sub>50</sub> (ng.cm <sup>-2</sup> )	$\hat{\sigma}_{CL50}$	95% - IC
1	-1,66 ± 0,24	0,18	0,037	0,10 – 0,26
2	-2,27 ± 0,40	0,09	0,008	0,08 – 0,11

Tabela 2. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* a extratos de folíolos de soja Bt coletados em diferentes períodos do ciclo da soja. N=448 insetos;  $\hat{b}$ =taxa de variação da mortalidade nas proximidades da CL<sub>50</sub>; CL<sub>50</sub>=concentração letal para 50% dos indivíduos expressa em µg de folha. µl<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>;  $\hat{\sigma}_b$ =erro padrão da estimativa  $\hat{b}$ ;  $\hat{\sigma}_{CL50}$ =erro padrão da estimativa da CL<sub>50</sub>; IC=intervalo de confiança para CL<sub>50</sub>

Amostra de folhas (DAP*)	$\hat{b} \pm \hat{\sigma}_b$	CL <sub>50</sub> (µg.µl <sup>-1</sup> .cm <sup>-2</sup> )	$\hat{\sigma}_{CL50}$	95% - IC
20/11/2017 (32)	-3,60 ± 1,03	1,69	0,14	1,40 – 1,98
01/12/2017 (43)	-2,89 ± 0,58	1,76	0,13	1,50 – 2,01
20/12/2017 (62)	-2,24 ± 0,37	2,07	0,20	1,65 – 2,49
08/01/2018 (81)	-3,19 ± 0,82	1,72	0,13	1,44 – 1,99
08/02/2018 (102)	-3,34 ± 1,04	1,49	0,14	1,20 – 1,79
01/03/2018 (123)	-1,95 ± 0,25	2,59	0,28	2,00 – 3,17

\*DAP – dias após o plantio.

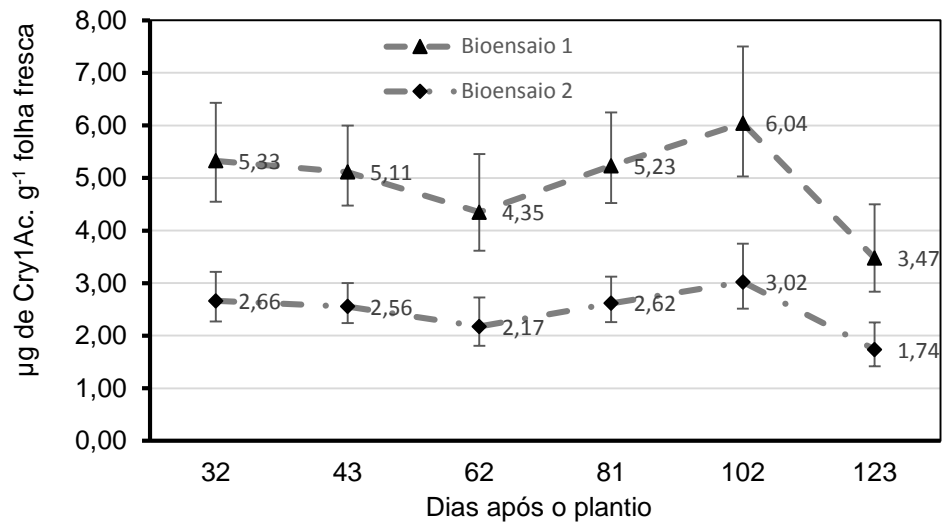


Figura 1. Teor de proteína Cry1Ac (IC 95%) em folhas de soja BRS 1010 IPRO em diferentes períodos de desenvolvimento da cultura, relativos aos bioensaios 1 e 2 com o padrão de Cry1Ac.