

Maíces *Bt* expuestos al daño de lepidópteros.

MASSONI*, F.A.; TROSSERO, M.A. & FRANA J.E.

INTA, EEA Rafaela

*massoni.federico@inta.gob.ar

INTRODUCCIÓN

El primer cultivo transgénico en Argentina fue la soja tolerante a glifosato. Se aprobó en 1996 y desde ese momento el área con cultivos genéticamente modificados (GM) ha crecido en forma sostenida (Trigo, 2011). Con casi 25 millones de hectáreas en 2015, aproximadamente el 14% de la superficie global, Argentina es el tercer productor mundial de cultivos GM después de Estados Unidos y Brasil. Actualmente, en el país se siembran soja, maíz y algodón, a los que se les ha incorporado la tolerancia a herbicida (TH), la resistencia a insectos (RI) o ambas características en la misma planta. En la campaña 2015/16, el 100% de la superficie de soja y de algodón fue sembrada con variedades GM, mientras que el maíz transgénico representó el 96%. De las hectáreas totales sembradas, más del 75% fueron híbridos con características combinadas de TH y RI, y el resto fueron híbridos con TH o RI, por separado (ArgenBio, 2014; 2016).

El maíz *Bt* fue diseñado para otorgarle tolerancia a sus principales plagas, el “gusano cogollero” (*Spodoptera frugiperda*), el “barrenador del tallo” (*Diatraea saccharalis*) y la “isoca de la espiga” (*Helicoverpa zea*). Las larvas de *S. frugiperda* tienen hábitos cortadores, defoliadores, cogolleros y granívoros. *H. zea* daña los estigmas, penetran en la espiga y consumen el grano (Margheritis y Rizzo, 1965; Leiva y Iannone, 1994; Iannone & Leiva, 1995), y pueden favorecer el ingreso de hongos patógenos. El barrenador, penetra en el tallo y producen galerías; disminuye la translocación de nutrientes, provoca el quebrado de la planta desde fructificación a cosecha, facilita el ingreso de hongos productores de micotoxinas, y promueven pérdidas en la cosecha por el barrenado del pedúnculo y base de la espiga (Margheritis y Rizzo, 1965; Leiva y Iannone, 1994; Iannone y Leiva, 1995). La tolerancia del maíz *Bt* a estas plagas, está dada por la introducción de un gen de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que codifica la producción de una proteína con actividad insecticida específica. Durante el ciclo de vida de la bacteria, genera dos tipos de toxinas: en la fase vegetativa produce y secreta proteínas Vip (*Vegetative insecticidal protein*), conocidas como Vip3Aa, Vip3B, (Yu, *et al.*, 2011) y en la fase de esporulación, produce esporas e inclusiones cristalinas llamadas proteínas Cry (Cry1Ab, Cry1Fa, Cry1A.105) (Bravo, *et al.*, 2012).

Debido a su eficacia, difusión y adopción, los cultivos *Bt* ejercen alta presión de selección sobre las plagas blanco. Los programas de Manejo de la Resistencia a Insectos (MRI) destinados a retrasar la resistencia, se basan en la rotación de cultivos, buen

control de malezas y tratamiento del rastrojo, adecuada implantación del cultivo, monitoreo de plagas; y en el modelo “Alta Dosis + Refugio”. La estrategia se apoya en tres principios: 1- el uso de cultivares con dosis de la toxina al menos 25 veces superior a la concentración necesaria para el control del 99% de los insectos susceptibles; 2- la baja frecuencia inicial del alelo de resistencia (1×10^{-3} en poblaciones naturales), y 3- la siembra del refugio estructurado, con plantas no-*Bt* (Tabashnik *et al.*, 2004; Andow, 2008; Trumper, 2014). El refugio consiste en implantar un 10% con un híbrido convencional del total del lote *Bt* (ASA, 2005) y tiene por objetivo disminuir la aparición de individuos resistentes. El refugio permite generar adultos susceptibles que puedan cruzarse con los posibles individuos resistentes surgidos del lote *Bt*, y así su descendencia sería susceptible. Sin embargo, su adopción en el país fue escasa y aceleró la probabilidad de que aparición de lepidópteros resistentes a las toxinas *Bt*. En 2014, se confirmó la resistencia heredable y recesiva de una población de *D. saccharalis* en el noreste de la provincia de San Luis, donde resultaron afectadas las tecnologías Herculex I (Hx) y VT Triple Pro (VT3P), que contienen las proteínas Cry1F y Cry1A.105, respectivamente (ASA, 2016).

Datos generados en la EEA Rafaela del INTA durante la campaña 2013/2014 revelaron que el porcentaje de plantas dañadas por *S. frugiperda* fue de 34% en el Testigo No-*Bt*, 15% en el híbrido MaizGard (MG) y 1% en un híbrido VT3P (Massoni *et al.*, 2014). Además se encontró que las plantas con espigas dañadas por *H. zea* fueron: 60% (Testigo); 56% (MG) y 25% (VT3P), pero los granos dañados en relación a los granos totales de cada espiga, fueron bajos y menores al testigo (3,1%). En 2014/2015 *H. zea* presentó el 70% de las plantas con daño en los híbridos No-*Bt*, pero el porcentaje de granos dañados por espiga en híbridos MG, Hx, VT3P, PW y Vip3, también fue bajo e inferior al testigo (2,4%) (Massoni *et al.*, 2014). Durante estos estudios se determinó que *H. zea* no produciría alta incidencia en los rendimientos. Por otro lado, *D. saccharalis* manifestó daños sólo en el híbrido testigo (2,5%) aunque fue bajo (Massoni *et al.*, 2014). En Brasil, Farias *et al.*, (2014) determinaron distintos niveles de susceptibilidad de *S. frugiperda* a la proteína Cry1F y su disminución a través de los años. El incremento de los niveles de tolerancia a las proteínas insecticidas es un proceso evolutivo, por lo que resulta necesario analizar la respuesta de los híbridos de maíz *Bt* frente a las poblaciones de lepidópteros blancos. Por tal motivo, se propuso como objetivo evaluar maíces de siembra tardía, con las tecnologías MG, Hx, VT3P, PW y Vip3 expuestos al daño de *S. frugiperda*, *D. saccharalis* y *H. zea*, con respecto a un maíz No-*Bt* durante las campañas agrícolas 2014/2015 y 2015/2016.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las experiencias se realizaron durante las campañas 2014/2015 y 2015/2016 en el campo experimental de la EEA Rafaela, del INTA sobre un suelo Agriudol típico. En ambos períodos, se aplicó un diseño experimental en bloques completos aleatorizados, con seis tratamientos (T) y cuatro repeticiones. Los híbridos utilizados fueron los siguientes:

- T1) Testigo No-*Bt* (2014/15 y 2015/16: **DK72-10 RR**);
- T2) MG (2014/15 y 2015/16: **DK72-10 MG RR2**);
- T3) HX (2014/15: **D560 HX** y 2015/16 **Baltos HX**);
- T4) VT3P (2014/15 y 2015/16: **DK72-10 VT3P**);
- T5) PW (2014/15: **510 PW** y 2015/16: **507 PW**); y
- T6) Vip3 (2014/15: **NK900 Viptera3** y 2015/16: **SYN840 Viptera3**).

Se sembraron en el sistema de siembra directa el 18/12/2014 y 21/12/2015 respectivamente, en parcelas de 208 m² compuestas por 20 surcos a 0,52 cm de espaciamiento por 20 m de largo.

La estimación de plantas dañadas por larvas de *S. frugiperda* se realizó con la Escala de Davis (Davis *et al.*, 1992). Se analizaron 20 plantas por parcela (cuatro plantas por surco, de cinco surcos centrales de una mitad de la parcela). El material se extrajo en el momento en que el testigo alcanzó el umbral de 20% de plantas dañadas, lo que ocurrió entre los estados fenológicos de V3-V4, según la escala de Ritchie & Hanway (1982). Las plantas se llevaron al laboratorio y se consideraron dañadas cuando se registró un valor igual o superior al grado 3 de la Escala de Davis. Las plantas afectadas por *H. zea* se evaluaron mediante el “porcentaje de plantas con presencia de larvas en espiga” durante el estado fenológico de grano lechoso (R3), y el “porcentaje de plantas con espigas dañadas” en el estado de grano dentado (R5), sobre 20 plantas por parcela, en cada período de muestreo. El daño por *D. saccharalis* se evaluó en 20 plantas por parcela durante R5 y se consideraron las variables “plantas atacadas” y “plantas dañadas” por el barrenador. La primera representó a plantas en las que se observó un orificio provocado por el intento de entrada de la larva en el tallo, y la segunda correspondió a plantas en las que se registró el orificio de entrada, la presencia de galerías con una longitud superior a 15 mm, y orificios de salida.

Se evaluó el rendimiento y peso de mil granos, sobre dos muestras compuestas por dos surcos de cinco metros lineales por parcela. Se ajustó la humedad al 14,5%. Se realizó el análisis de la varianza del software estadístico INFOSTAT® 2014 (Di Rienzo, *et al.*, 2014) y las diferencias entre medias se compararon con el test LSD Fisher con un 5% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

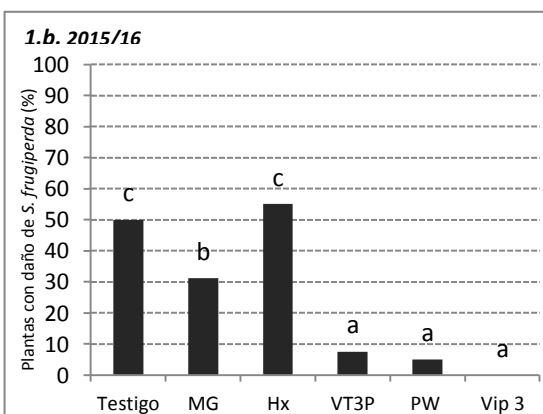
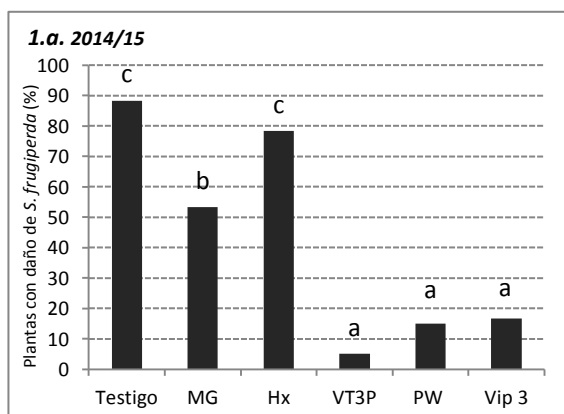
En la Tabla 1 se presentan los registros pluviométricos correspondientes a los meses en que duraron los ensayos en las dos campañas agrícolas. Las lluvias entre diciembre de 2014 y marzo de 2015 superaron en un 35% a los valores normales, con un acumulado anual hasta mayo de 22% superior a las precipitaciones de la serie de referencia (1930-2013) (Tabla 1). La abundante oferta hídrica favoreció el desarrollo del cultivo durante todo el ciclo y su recuperación frente al daño de los lepidópteros.

Durante la campaña 2015/16, las lluvias entre diciembre y marzo fueron inferiores al 10% de los valores de la serie histórica (1930-2014), pero con un acumulado anual hasta mayo de 17% superior a la misma (Tabla 1). A diferencia de lo sucedido en el ciclo agrícola 2014/15, las escasas precipitaciones en los períodos fenológicos iniciales y las temperaturas superiores a la media histórica, favorecieron la presión continua de *S. frugiperda* y retrasaron la recuperación de los híbridos expuestos al daño. El inhabitual fenómeno de lluvias prolongadas por el efecto Niño ocurrido en la Provincia de Santa Fe, que comenzó el 1 de abril de 2016 y se continuó por veinte días posteriores, generó anegamientos en extensas regiones y el ascenso del nivel freático hasta la superficie, y permitió acumular 307 mm durante ese mes (Tabla 1). Esta situación afectó el potencial de rendimiento de todos los cultivos, incluidos a los híbridos del ensayo que se encontraban en la etapa de pre cosecha.

Tabla 1: Precipitaciones durante el período experimental y sus respectivas series históricas. Estación Meteorológica, INTA EEA Rafaela.

Mes	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May
Lluvia mensual, Campaña 2014/15 (mm)	144,8	187,9	244,3	206,1	44,0	6,8
Lluvia Serie Histórica 1930-2013 (mm)	125,5	118,6	111,8	153,7	92,3	47,2
Lluvia mensual Campaña 2015/16 (mm)	87,3	79,7	244,3	55,0	307,0	14,6
Lluvia Serie Histórica 1930-2014 (mm)	125,1	118,8	114,2	154,9	91,7	46,9

En la campaña 2014/15 se hallaron diferencias estadísticas en el porcentaje de plantas con daño de *S. frugiperda* igual o mayor al grado 3, según “Davis” ($p < 0,0001$). Los tratamientos VT3P=5%, PW=15% y Vip3=17%, difirieron del MG=53% y éstos, del Hx=78% y Testigo=88% que resultaron los más afectados. Las tecnologías VT3P,



PW y Vip3 sufrieron los menores niveles de daño (Figura 1.a). Durante 2015/16 la presión de infestación de *S. frugiperda* fue del 50% en V3 y también existieron diferencias estadísticas en el porcentaje de plantas con daño igual o mayor al grado 3, según “Davis” ($p<0,0001$). Las tecnologías Vip3=0%; PW=5% y VT3P=8% tuvieron los menores daños, difirieron de MG=31%, y todas del Testigo=50% y Hx=55% (Figura 1.b).

Figura 1. Porcentaje de plantas de híbridos de maíz con daños de *S. frugiperda* igual o superior al grado 3, según la Escala de Davis, en función de las tecnologías *Bt* ensayadas en las campañas agrícolas 2014/15 (1.a) y 2015/16 (1.b) en la EEA Rafaela. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Se observa una tendencia en relación a distintos niveles de protección entre las tecnologías y pueden diferenciarse tres grupos: 1°) Herculex I, presentó escasa y nula protección, al igualar o superar incluso a los valores de daños del tratamiento control; 2°) Maíz Gard, manifestó un control intermedio y 3°) VT Triple Pro, Powercore y Viptera3, expresaron el mejor control debido a la eficacia de los eventos apilados.

Con respecto a *D. saccharalis* en ambas campañas, durante la etapa fenológica de grano dentado, las plantas con orificios o “atacadas” por el barrenador, fueron estadísticamente diferentes ($p<0,0001$) entre las *Bt* y las No-*Bt*. En 2014/15, la presión de infestación fue: Testigo= 57%, Vip3= 0%, PW= 10%, VT3P= 12%, MG= 13% y Hx= 25% (Figura 2.a); mientras que en 2015/16 fue: Testigo= 58%, Vip3= 12%, PW= 14%, MG= 28%, Hx= 28% y VT3P= 39% de los tallos atacados (Figura 2.b).

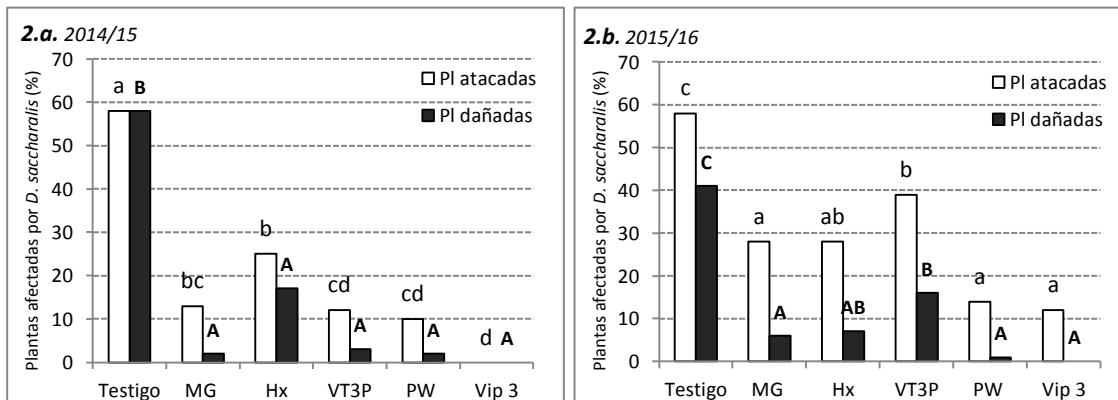


Figura 2. Porcentaje de plantas atacadas y dañadas por *D. saccharalis*, en función de las tecnologías *Bt* ensayadas en las campañas agrícolas 2014/15 (2.a) y 2015/16 (2.b) en la EEA Rafaela. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Al analizar las “plantas dañadas” o con orificios de entrada, galerías y perforaciones de salida de la larva, en ambos períodos evaluados se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p<0,0001$). En el primer ciclo agrícola, el daño observado entre los híbridos *Bt* fueron diferentes del testigo y significativamente

menores (Testigo= 58%, Hx= 17%, VT3P= 3%, MG= 2%, PW= 2%, Vip3= 0%). A diferencia de este, en el segundo período analizado, en el Testigo se observó el 41% de los tallos dañados, les siguió VT3P= 16%, que se diferenció de éste y del resto de los tratamientos con valores intermedios; y por último PW y MG, quienes presentaron bajos porcentajes de plantas con galerías. La tecnología Vip3 en ambas campañas estudiadas, no tuvo plantas dañadas por *D. saccharalis*.

Respecto a la “isoca de la espiga” *H. zea*, durante la etapa de grano lechoso (R3), en 2014/15 hubo una presión del 45% de plantas con presencia de larvas en la espiga (Testigo No-*Bt*). Este valor fue superado por algunos híbridos *Bt* como el Herculex I que alcanzó el mayor porcentaje (Hx=63%) (Figura 3.a). Respecto a las plantas con daño observable en espigas durante la etapa de grano dentado (R5), se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,0001$). La tecnología Viptera3 presentó el menor porcentaje de daño en espigas (Vip= 5%) y se diferenció del resto, que igualaron o superaron el 37% (MG= 47%, Hx= 53%, VT3P= 37%, PW= 38%) (Figura 3.a).

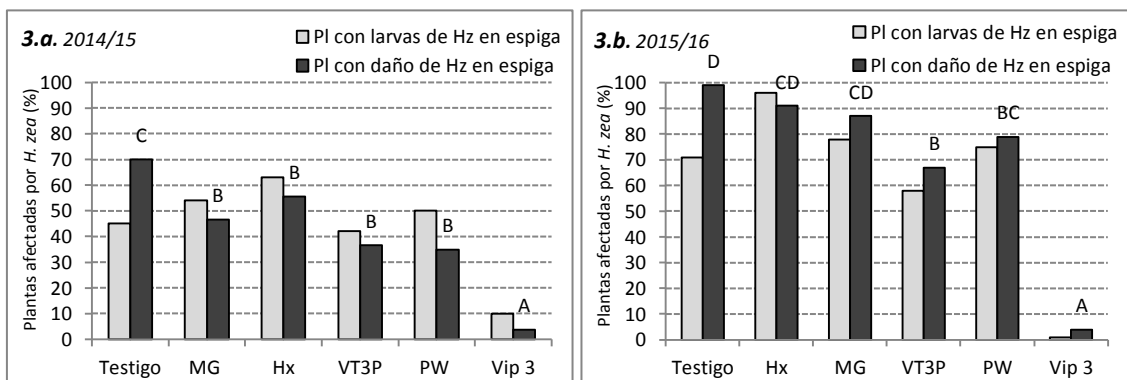


Figura 3. Plantas con larvas y plantas con daño en espiga provocado por *H. zea* en las tecnologías *Bt* ensayadas en las campañas agrícolas 2014/15 (2.a) y 2015/16 (2.b) en la EEA Rafaela. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el segundo período (2015/16), hubo una presión de infestación de la isoca de la espiga del 71% en el Testigo No-*Bt*. Este híbrido convencional, al igual que en el primer ciclo agrícola, fue superado por el número de larvas hallado en los materiales *Bt* donde también en la tecnología Herculex I se encontró el mayor número de *H. zea* en espiga (Hx= 96%). Respecto al daño en espigas, Viptera3 resultó la menos afectada con sólo 4% de daño y se diferenció del resto que igualaron o superaron el 67% de las espigas dañadas (Hx= 91%, MG= 87%, PW= 79%, VT3P= 67%) (Figura 3.b).

En los rendimientos logrados en 2014/2015, DK 72-10 VT3P fue distinto del resto de los tratamientos ($p < 0,0367$) con una diferencia de 2.436 kg/ha respecto al Testigo. En 2015/2016, también existieron diferencias significativas ($p < 0,0073$) con

valores máximos alcanzados por SYN 840 Viptera3 y 507 PW, con una brecha de 3.655 kg/ha entre el primero y el control (Tabla 2).

Tabla 2. Producción promedio por hectárea y peso de mil granos, en función de los tratamientos evaluados en ambas campañas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Campaña 2014/2015		Campaña 2015/2016	
Tratamientos	Rendimientos (kg/ha)	Tratamientos	Rendimientos (kg/ha)
D 560 HX	9.037 A	DK 72-10 RR2	2.986 A
DK 72-10 RR2	9.662 A B	Baltos Hx	3.506 A
NK 900 Vip3	9.871 A B	DK 72-10 MG	3.607 A B
DK 72-10 MG RR2	10.218 A B	DK 72-10 VT3P	5.684 B C
510 PW	10.560 B	507 PW	6.462 C
DK 72-10 VT3PRO	12.098 C	SYN 840 Vip3	6.641 C

CONCLUSIONES

Las tecnologías con eventos apilados de tolerancia a insectos: VT Triple Pro, Powercore y Agrisure Viptera3, alcanzaron valores inferiores al umbral de tratamiento (20% de plantas con grado 3 de la Escala Davis) en las etapas V3-V4 de ambas campañas. Estas herramientas expresaron una correcta protección frente al daño de *S. frugiperda* por lo que constituyen eficaces estrategias de manejo de la isoca cogollera en maíces tardíos o de segunda fecha de siembra.

Respecto al daño causado por *D. saccharalis* entre las tecnologías *Bt*, Viptera3 no presentó plantas barrenadas y fue altamente eficaz, mientras que los híbridos Herculex I y VT TriplePro fueron las más afectadas en los períodos 2014/15 y 2015/16, respectivamente.

La tecnología Viptera3 brindó tolerancia a *H. zea* y se diferenció del resto de los materiales *Bt* que presentaron altos porcentajes de plantas con daño. Sin embargo, la elevada presencia de larvas no implicaría que *H. zea* provoque un impacto significativo sobre los rendimientos, debido a estudios previos (Massoni *et. al.*, 2014) que determinaron el bajo porcentaje de esos granos dañados en relación al total de los granos de cada espiga.

CONSIDERACIONES FINALES

El incremento de los niveles de tolerancia a las proteínas insecticidas es un proceso evolutivo y resulta clave la siembra de refugios para mitigar la resistencia. El nivel de infestación de las especies de lepidópteros en los distintos materiales, está determinado por la fecha de siembra, las condiciones ambientales, la genética del

híbrido y su tecnología de protección. La capacidad de recuperación de los maíces frente al daño de estas plagas, depende a su vez de factores físicos, principalmente humedad y temperatura. En un escenario climatológico de escasas precipitaciones la tasa de recuperación será menor y por lo tanto, el monitoreo sistemático en etapas fenológicas tempranas resultará clave para un posible control oportuno y lograr el potencial de producción esperado.

BIBLIOGRAFÍA

- Andow, D.A. 2008. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of Biosafety Reviews* 4:142-199.
- ArgenBio, A.S.A, Casafe. 2014. Tecnologías para una agricultura sustentable. *Biología Agrícola*, 72 p.
- ArgenBio, 2016. Cultivos aprobados y adopción. <http://www.argenbio.org/index.php?action=cultivos&opt=5>. Accedido en Junio de 2016.
- A.S.A. 2005. Claves para un buen manejo del maíz *Bt*. <http://programamri.com/notas/16/Claves-para-un-buen-manejo-del-Maz-Bt>
- A.S.A. 2016. Preguntas y respuestas sobre cultivos Bt y manejo de resistencia de insectos. Programa MRI-ASA. 1º edición.
- Bravo, A.; Gomez, I.; Porta, H.; García-Gómez, B; Rodríguez-Almazan, C. Pardo, L. & M. Soberón, 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology* 6:17-26.
- Davis, F. M.; S. S. Ng, S. S. and W. P. Williams, W. P. 1992. Visual rating scale for screening whorl-stage corn resistance to fall armyworm. *Mississippi Agric. and Forestry Exp. Stn. Tech. Bull.* 186. 9 pp.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Farias, J.R.; Horikoshi, J.R.; Santos, C.A. y Omoto, C. 2014. Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Population in Brazil. *J. Economic Entomology* 107 (6): 2182-2189.
- Iannone, N. y Leiva, P.D. 1995. Bioecología y control de la isoca de la espiga *Heliothis zea* (Boddie) en el cultivo de maíz. *Carpeta de Producción Vegetal, Serie: Maíz, Tomo XIV, Información N° 129*. INTA, EEA Pergamino, 5p.
- Leiva, P.D y Iannone N. 1994. Manejo de insectos plaga del cultivo de maíz. 1ra Ed. EEA INTA Pergamino. Pergamino, Buenos Aires 73 p.

- Margheritis, A.E y Rizzo, H.F. 1965. Lepidópteros de Interés Agrícola. Orugas, isocas y otras larvas que dañan a los cultivos. Editorial Sudamericana S.A. Buenos Aires. 197 p.
- Massoni, F.A. Schlie, G.; Frana, J.E. 2014. Evaluación del daño causado por insectos lepidópteros en híbridos de maíz *Bt* (VT Triple PRO y MG) y Convencional, determinación del impacto sobre el rendimiento. X Congreso Nacional de Maíz, Rosario, 2014. <http://www.congresodemaiz.com.ar/areas/proteccion>
- Ritchie, S. and J. Hanway. 1982. How a corn plant develops. Iowa State Univ. Special Report No. 48.
- Tabashnik, B.E; Gould, F. & Y. Carrie, 2004. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heredability. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 904-12.
- Trigo, E.J. 2011. Quince Años de Cultivos Genéticamente Modificados en la Agricultura Argentina. 52 p.
- Trumper, E.V. 2014, Resistencia de insectos a cultivos transgénicos con propiedades insecticidas. Teoría, estado del arte y desafíos para la República Argentina. *AgriScientia* 31 (2): 109-126.
- Yu, X.; Zheng, A.; Zhu, J.; Wang, S.; Wang, L.; Deng, Q. Li, S., Liu, H. & P. Li. 2011. Characterization of vegetative insecticidal protein vip genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Current Microbiology* 62: 752-757.