

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÕES DA PROTEÍNA Vip3Aa20, *Diatraea saccharalis*
(FABRICIUS) E SEUS PARASITÓIDES, *Cotesia flavipes*
(CAMERON) E *Trichogramma galloi* ZUCCHI**

Tiago Rodrigo Lohmann
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INTERAÇÕES DA PROTEÍNA Vip3Aa20, *Diatraea saccharalis*
(FABRICIUS) E SEUS PARASITÓIDES, *Cotesia flavipes*
(CAMERON) E *Trichogramma galloi* ZUCCHI

Tiago Rodrigo Lohmann

Orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

L833i Lohmann, Tiago Rodrigo
Interações da proteína Vip3Aa20, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e seus parasitóides, *Cotesia flavipes* (Cameron) e *Trichogramma galloi* Zucchi / Tiago Rodrigo Lohmann. -- Jaboticabal, 2011
xi, 77 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientador: Odair Aparecido Fernandes
Banca examinadora: Celso Omoto, Ricardo Antonio Polanczyk
Bibliografia

1. Organismos não alvos. 2. Avaliação de risco. 3. Proteína inseticida vegetativa. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.79:632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INTERAÇÕES DA PROTEÍNA Vip3Aa20 *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) E SEUS PARASITÓIDES, *Cotesia flavipes* (CAMERON) E *Trichogramma galbi* ZUCCHI

AUTOR: TIAGO RODRIGO LOHMANN

ORIENTADOR: Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. CELSO OMOTO

Departamento de Entomologia / Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 11 de março de 2011.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TIAGO RODRIGO LOHMANN – Nasceu em 16 de outubro de 1985. Natural de Marechal Cândido Rondon, Paraná. Formou-se em Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Câmpus de Marechal Cândido Rondon. Estagiou e trabalhou no Laboratório de Entomologia sob orientação da Prof. Dra. Vanda Pietrowski. Iniciou o Mestrado em 2009 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal/SP no programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola). Recebeu bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Realizou sua pesquisa no Laboratório de Ecologia Aplicada (APECOLAB – *Applied Ecology Laboratory*) sob orientação do Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes.

A meus pais, Marli Marisa Lohmann e Lothário Dreyer Lohmann.
À minha namorada, Adriana Mendes da Silva.

DEDICO

À historiadora Adriane Hartwig.
À entomologista Vanda Pietrowski.

“O que alguém, como mestre, semeia,
no devir do tempo perpetua.”

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Odair Aparecido Fernandes, por ter aceitado a orientação deste mestrado, pela convivência e aprendizado que pudemos construir.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

À Syngenta Seeds pelo apoio na realização do trabalho, com menções especiais à Cristhiane Bothona e Lílian Saldanha.

Ao Laboratório de Controle Biológico da Usina São Martinho pelo suporte que nos foi fornecido, em especial à responsável pelo laboratório, Josy Aparecida dos Santos.

À Biocontrol pelo fornecimento de exemplares de *Trichogramma galloi*, especialmente àELITAMARA MORSOLETO DOS SANTOS e à Maria Aparecida Vicente Cano.

Aos professores Dr. Manoel Victor Franco Lemos e Dra. Janete Aparecida Desidério Sena por nos ter permitido realizar os bioensaios no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA).

À Eliane Cristina Cunha Alves, técnica responsável pelo LGBBA, pelo auxílio na execução dos bioensaios.

A José Roberto Polachini, técnico responsável pelo Laboratório de Biometria do Setor de Carcinocultura da Unesp (CAUNESP), pela disponibilidade para usar balança analítica.

Aos amigos apecolabanos pela amizade e auxílio em diversos momentos da condução do trabalho: Ana Mafra, Alana Marques, Aline Gerbasi, Bruno Gonçalves, Dayane Reis, Elton Câmara, Juliana Maquino, Leandro de Souza, Lidiane Pavani, Lindsay Vivian, Maibi Alves, Matheus Vilhena, Matheus de Moraes, Milena Vaz, Renata Miassi, Thaís de Oliveira, Victor Fábio, Wellington Secatto.

Aos amigos apecolabanos pós-graduandos pela amizade, companherismo e auxílio nos trabalhos, desde o início e sempre: Alexandre Carlos Menezes Netto, Andrea Corrêa Varella, Daniel Ferreira Caixeta, Edson Corbo, José Antonio de Souza Rossato Júnior, Juliana Duarte de Souza Alonso, Solange Bispo dos Santos.

A uma pessoa especial e amiga, Márcia Regina Macri Ferreira, sempre disposta a auxiliar.

A todos vocês, eu agradeço profundamente.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Referências.....	8
CAPÍTULO 2 - TOXICIDADE DE Vip3Aa20 À BROCA-DO-COLMO <i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i> : EFEITOS LETAL E SUBLETAL	14
Resumo.....	14
Summary.....	15
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	17
Resultados.....	19
Discussão.....	27
Conclusão.....	30
Referências.....	31
CAPÍTULO 3 – O PARASITÓIDE LARVAL <i>Cotesia flavipes</i> É AFETADO PELA PROTEÍNA Vip3Aa20?	36
Resumo.....	36
Summary.....	37
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	39
Resultados.....	43
Discussão.....	47

Conclusão.....	50
Referências.....	50
CAPÍTULO 4 – AVALIANDO O EFEITO DE UMA PROTEÍNA Bt SOBRE UM PARASITÓIDE DE OVOS: ESTUDO DE CASO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA Vip3Aa20 E O PARASITÓIDE <i>Trichogramma galloi</i> ZUCCHI (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)	57
Resumo.....	57
Summary.....	58
Introdução.....	58
Material e Métodos.....	61
Resultados.....	65
Discussão.....	68
Conclusão.....	69
Referências.....	69
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

INTERAÇÕES DA PROTEÍNA Vip3Aa20, *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) E SEUS PARASITÓIDES, *Cotesia flavipes* (CAMERON) E *Trichogramma galloi* ZUCCHI

RESUMO – O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da proteína Vip3Aa20, originária da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, sobre a broca-do-colmo *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e dois de seus parasitóides: o parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) e o parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi. *D. saccharalis* mostrou-se suscetível à proteína, apresentando efeitos letais e subletais. Foram afetadas pela proteína as características mortalidade larval, duração do período larval, número de ínstares larvais e peso de larvas, enquanto que a mortalidade pupal e a duração do período pupal não foram afetadas e o peso de pupas apresentou resultados divergentes entre os bioensaios conduzidos. Para os parasitóides, avaliaram-se os efeitos da exposição direta (ingestão da proteína pelos adultos) e indireta (ingestão da proteína por *D. saccharalis* e posterior parasitismo). Em *C. flavipes*, não foram observados efeitos pela exposição direta, enquanto que na exposição indireta ocorreu efeito negativo sobre as características peso da massa de casulos e peso do adulto. Estes efeitos podem ser associados ao efeito mediado pelo hospedeiro. Em *T. galloi*, não foram observados efeitos da proteína Vip3Aa20 sobre os parasitóides, tanto na exposição direta como na indireta.

Palavras-chave: avaliação de risco, biotecnologia, interações tritróficas, organismos modificados geneticamente, organismos não alvo, proteína inseticida vegetativa

**INTERACTIONS AMONG PROTEIN Vip3Aa20, *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS)
AND ITS PARASITIDS, *Cotesia flavipes* (CAMERON) E *Trichogramma galloi*
ZUCCHI**

SUMMARY - The aim of this study was to evaluate the effect of Vip3Aa20 protein, originating from the *Bacillus thuringiensis* Berliner bacterium, on sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) and two of its parasitoids: larval parasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron) and egg parasitoid *Trichogramma galloi* Zucchi. *D. saccharalis* was susceptible to protein, with lethal and sublethal effects. Larval mortality, larval period, number of instars and larval weight were affected by the protein, while pupal mortality and pupal period were not affected and pupal weight presented discrepant results between bioassays conducted. For the parasitoids, direct (protein ingested by adults) and indirect (protein ingested by sugarcane borer with later parasitism) exposure were evaluated. In *C. flavipes*, no effects were observed by direct exposure, while in indirect exposure negative effects occurred on the cocoons weight and adult weight. These effects may be associated with the effect mediated by the host. No effects were verified on *T. galloi* when this species was direct or indirectly exposed to Vip3Aa20 protein.

Keywords: risk assessment, biotechnology, tritrophic interactions, genetically modified organisms, nontarget organisms, vegetative insecticidal protein

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Toda história tem um começo. Às vezes vários. Esta dissertação poderia voltar no tempo e encontrar vários momentos para ter seu início, mas vamos situá-lo no ano de 1999. Neste ano algo importante ocorreu para a ciência, ou melhor, para a pesquisa científica, que repercutiu na sociedade em geral, acadêmica, científica e leiga. É esse acontecimento que fundamentalmente desencadeia uma forte linha de pesquisa científica e que podemos usar como constituinte da idéia fundadora desta dissertação.

Em 1999, LOSEY et al. fizeram uma curta correspondência científica na revista *Nature* relatando um estudo de laboratório no qual utilizaram pólen de milho Bt para avaliar seu efeito sobre a borboleta Monarca, *Danaus plexippus* L. (*Lepidoptera: Nymphalidae*). A reação do público foi imediata, repercutindo em outras mídias impressas mais populares, como *New York Times*, *Wall Street Journal* e *Time*, no rádio e na televisão, e por fim, a própria Monsanto, produtora do milho Bt, acabou tendo perdas econômicas decorrentes desta publicação (SHELTON & ROUSH 1999).

De acordo com os resultados obtidos por LOSEY et al. (1999), as borboletas Monarca foram afetadas negativamente pela ingestão de pólen de milho Bt e esse resultado poderia ter profundas implicações para a conservação da espécie com o emprego generalizado de cultivos Bt. A grande reação do público foi gerada pelo relevante apelo ecológico que a espécie desperta nas pessoas, em geral, e em grupos conservacionistas, em particular, pois *D. plexippus* apresenta um fascinante comportamento biológico e de migração.

A reação científica veio em seguida, questionando diversos aspectos metodológicos da pesquisa e chegando à conclusão de que, no geral, era uma pesquisa com sérios problemas. Como consequência, surgiram, num primeiro momento, estudos para elucidar as falhas metodológicas do trabalho de LOSEY et al. (1999) e posteriormente, foi se construindo todo um arcabouço metodológico para

subsidiar as análises de risco para organismos geneticamente modificados. Mais detalhes sobre essas questões podem ser obtidos pela leitura do artigo “The monarch butterfly controversy: scientific interpretations of a phenomenon” publicado na revista *The Plant Journal* por SHELTON & SEARS (2001).

Partindo desse cenário, passados 10 anos, ou seja, em 2009, iniciamos a pesquisa que ora apresentamos nesta dissertação, estudando a interação entre uma proteína expressa transgenicamente em plantas de milho, um herbívoro e dois parasitóides.

Apesar de enfocarmos os acontecimentos a partir de 1999, não diz que anterior a este momento não se realizavam estudos para avaliar os impactos de organismos geneticamente modificados (OGMs) sobre organismos não alvos e o ambiente em geral. Pelo contrário, desde o início esses estudos foram exigidos para a liberação comercial de OGMs. Mas é a partir do envolvimento de toda a sociedade em torno da questão de biossegurança dos OGMs, gerada a partir da publicação dos estudos com a borboleta Monarca, que se desenvolve fortemente essa linha de pesquisa e que ao longo dos anos se aperfeiçoam as metodologias para conduzir esse tipo de estudo (CANDOLFI et al. 2000; MARVIER 2002; COWGILL & ATKINSON 2003; HILL & SENDASHONGA 2003; ANDOW & HILBECK 2004; HILL 2005; ANDOW et al. 2006; JOHNSON et al. 2006; RAYBOULD 2006; ROMEIS et al. 2008).

Quando iniciamos a introdução dizendo que poderíamos situar o início desta dissertação em diversos momentos da história, fazíamos referência à própria história da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, fonte de origem da proteína presentemente em estudo (Vip3Aa20), que é longa e nos remete ao início do século XX. Em 1901, o pesquisador japonês Ishiwata isolou uma bactéria como agente causal de uma doença em larvas do bicho-da-seda e em 1911 o pesquisador Berliner descreveu a bactéria, tendo-a isolado de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) encontrada na região da Turíngia na Alemanha, que lhe emprestou o nome. Poderíamos avançar no tempo e visualizar a primeira vez em que a bactéria foi utilizada com o propósito de controlar insetos pragas no final da década de 1920, ou quando se disponibilizou o primeiro produto comercial baseado na bactéria (Sporéine, França, 1938). Outro

possível início poderia ser o primeiro registro da clonagem e expressão de uma proteína Bt com ação inseticida em *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers por SCHNEPF & WHITELEY (1981) ou em 1987 quando pela primeira vez se inseriu um gene de *B. thuringiensis* em plantas de tabaco para expressar proteínas com ação contra *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) (BARTON et al. 1987).

Até a década de 1990, conheciam-se apenas as proteínas cristais de *B. thuringiensis*, chamadas de proteínas Cry, produzidas durante a fase de esporulação da bactéria e na qual as proteínas inseticidas são envoltas por uma estrutura cristalina, formando os cristais. Mas em 1996, ESTRUCH et al. (1996) descreveram pela primeira vez a ocorrência de proteínas que não formam cristais e são produzidas durante a fase de crescimento da bactéria e por isso foram denominadas proteínas Vip (*vegetative insecticidal protein*), fato que poderia muito bem ser outro ponto inicial para nossa pesquisa.

Arriscando-nos mais ainda, poderíamos tentar encontrar outros inícios como a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 que originaria a genética moderna ou mesmo imaginar Van Leeuwenhoek descobrindo outro mundo com suas lentes. Contudo, a ideia a ser apreendida aqui é que o conhecimento é uma constante evolução em busca da verdade/realidade e o utilizamos para melhorar as nossas condições de sobrevivência e bem-estar. Dentro dessa consideração podemos incluir a necessidade de lidar com os organismos considerados por nós como pragas e ao mesmo tempo a necessidade de manter o ambiente saudável e seguro para a vida, contexto geral no qual inserimos esta pesquisa – a questão da 'biossegurança'.

Mas não foram os organismos geneticamente modificados que deram início aos estudos de avaliação de risco. A avaliação de risco tenta caracterizar os potenciais impactos adversos associados com determinadas atividades ou eventos. Metodologias para conduzir avaliações de risco existem em muitas áreas diferentes, incluindo economia, companhias de seguro, manejo de recursos pesqueiros e conservação biológica. As avaliações de risco para a saúde humana e ecológica de produtos químicos e outros estressores nos remetem à década de 1970. Assim, a avaliação de risco para OGMs utilizou, adaptou e desenvolveu metodologias que já eram

empregadas em outros contextos (HILL & SENDASHONGA 2003).

Nos Estados Unidos da América, pioneiro em cultivos transgênicos, o cultivo comercial de plantas transgênicas foi iniciado em 1994 com a variedade de tomate Flavr Savr[®] que apresentava maior resistência ao transporte e durabilidade em prateleira. Em 1996 tem início o cultivo do algodão Bollgard[®], modificado geneticamente com a inserção de um gene proveniente da bactéria *B. thuringiensis* var. *kurstaki* para expressar a proteína Cry1Ac, com efeito em lepidópteros pragas (EDGE et al. 2001). No Brasil, a primeira aprovação para cultivo de transgênicos ocorreu em 1998 com a soja Roundup Ready[®] tolerante a herbicida. Em 2009 foram cultivados 134 milhões de hectares de culturas biotecnológicas no mundo, tornando a biotecnologia a tecnologia agrícola com maior índice da adoção, apresentando aumento de 80 vezes de 1996 a 2009, um crescimento anual de 9 milhões de hectares ou 7% (JAMES 2009).

No Brasil, em 2009, foram cultivados 5 milhões de hectares de milho Bt, considerando a primeira e a segunda safras. A área cultivada de milho Bt aumentou em 3,7 milhões de hectares, representando um aumento de quase 400% em relação ao ano de 2008 e foi seguramente o maior aumento absoluto para qualquer cultura biotecnológica em qualquer país do mundo em 2009. Os índices de adoção foram de 30% para o milho primeira safra (verão) e de 53% para o milho segunda safra (safrinha) (JAMES 2009).

Em setembro de 2009 foi aprovada a liberação comercial do milho geneticamente modificado resistente a insetos denominado MIR 162, desenvolvido pela Syngenta Seeds, bem como de todas as progênies provenientes do evento de transformação MIR 162 e suas derivadas de cruzamento de linhagens e populações não transgênicas de milho com linhagens portadoras do evento, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), órgão responsável pela regulação dos OGMs no Brasil. Neste evento foi inserido um gene da bactéria *B. thuringiensis* para expressar a proteína Vip3Aa que apresenta alta toxicidade a *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), *O. nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Striacosta albicosta* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Análise sequencial demonstrou duas

modificações na sequência original do gene Vip3Aa, uma silenciosa e outra que teve como consequência a substituição de um aminoácido na sequência original da Vip3Aa. Por esta razão a sequência que foi inserida no milho foi denominada Vip3Aa20 (CTNBio 2009).

A lagarta-do-colmo *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) é um dos principais insetos que causam injúrias e ocasionam perdas econômicas na cultura do milho. De acordo com CRUZ (2007), este inseto é apontado como séria ameaça à cultura do milho no Brasil, especialmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Nos Estados Unidos, maior produtor mundial de milho, *D. saccharalis* juntamente com outras espécies brocadoras de colmo, são fatores limitantes da produção do cereal (CASTRO et al. 2004; BALDWIN et al. 2006). Também na Argentina, outro importante produtor mundial de milho, o inseto é sério problema para o cultivo do milho (MORÉ et al. 2003).

Apesar da crescente importância da broca na cultura do milho, atualmente, no Brasil, ela está mais associada com a cultura da cana-de-açúcar, na qual é uma das principais pragas. A expansão da área com cultivo de cana-de-açúcar por diversas regiões do país aumenta a associação com áreas de milho formando um mosaico destes cultivos pelo Brasil. Essa maior proximidade entre as culturas pode ocasionar maior infestação das lavouras de milho pela broca-do-colmo e aumentar a importância do inseto para os cultivos de milho.

O controle de *D. saccharalis* é conduzido biologicamente com grande sucesso na cultura da cana-de-açúcar, utilizando-se o parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), num programa que se iniciou na década de 1970 (BOTELHO & MACEDO 2002). Outro importante inimigo natural de *D. saccharalis* é o parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que está distribuído pelo Brasil e ocorre naturalmente, podendo também ser utilizado em liberações inundativas associadas com liberações de *C. flavipes* (BOTELHO et al. 1999; LIMA FILHO & LIMA 2001; PINTO et al. 2003; BROGLIO-MICHELETTI et al. 2007).

Segundo LÖVEI et al. (2009), os dados existentes sobre os efeitos de proteínas inseticidas transgênicas sobre inimigos naturais são ainda incompletos em relação às

toxinas estudadas, às espécies de inimigos naturais avaliadas e à distribuição geográfica dos estudos. As proteínas mais estudadas são Cry1Ab e Cry1Ac e um pouco menos Cry3Bb, embora existam muitas outras proteínas sendo expressas em plantas. Há demasiada ênfase em apenas cinco espécies de inimigos naturais, sendo três predadores, *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae), *Coleomegilla maculata* De Geer (Coleoptera: Coccinelidae) e *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinelidae) e dois parasitóides, *Campoletis chloridae* Uchida (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Eulophus pennicornis* (Nees) (Hymenoptera: Eulophidae). Apenas *C. carnea* representava, no momento em que os autores revisaram a literatura, 22,8% das respostas de predadores, frequentemente em milho e algodão. Além disso, os estudos estão concentrados no hemisfério norte, ou seja, nos países desenvolvidos, principalmente Estados Unidos da América e países europeus.

Pela impossibilidade de avaliar todos os organismos presentes nos agroecossistemas, uma vez que todos poderiam ser considerados como organismos não alvos, excetuando-se, claro, as pragas visadas, depara-se com a necessidade de escolher um ou outro para realizar as avaliações. Assim, os pesquisadores envolvidos com avaliações de risco têm proposto critérios para selecionar espécies-chave, tais como a abundância da espécie em determinado ambiente, a suscetibilidade aos estressores em estudo, a praticabilidade para conduzir os testes de laboratório, o valor cultural da espécie e a função ecológica representada pela espécie ou o serviço ecológico que realiza (COWGILL & ATKINSON 2003; ANDOW & HILBECK 2004; BIRCH et al. 2004; PRASIFKA et al. 2008; ROMEIS et al. 2008; TODD et al. 2008). Há vários estudos avaliando o efeito sobre inimigos naturais (POPPY & SUTHERLAND 2004; LÖVEI & ARPAIA 2005; ROMEIS et al. 2006; LÖVEI et al. 2009). Porém, há também estudos sobre outros grupos de organismos, como polinizadores, decompositores e detritívoros, comunidade microbiana da rizosfera e do solo em geral, e mesmo outros insetos herbívoros, como é o caso da borboleta Monarca. O estado da arte sobre os efeitos de OGMs em organismos não alvos pode ser obtido em GROOT & DICKE (2002), O'CALLAGHAN et al. (2005) e ARPAIA (2010), por exemplo.

Um dos aspectos mais importantes a ser considerado na escolha da espécie para

os estudos é a probabilidade de exposição à proteína transgênica pela qual o inseto está sujeito em condições de campo (PRASIFKA et al. 2008). De acordo com BIRCH et al. (2004), considerando a cultura do milho como modelo para avaliações de risco, os parasitóides *C. flavipes* (Cameron) e *Trichogramma* spp. estão sujeitos aos efeitos de proteínas expressas no milho transgênico. Para *C. flavipes*, a exposição é certa e real via proteína presente no seu hospedeiro (larvas que se alimentam das plantas de milho) e condicional se a proteína estiver presente no pólen ou fezes das larvas. No caso de *Trichogramma* spp., a exposição é condicionada à presença da proteína no pólen, floema ou *honeydew*, fluidos da gutação ou ovos do hospedeiro.

De acordo com BERNAL (2010), considerando que as plantas transgênicas são desenvolvidas para atingir os insetos nos estágios em que são considerados pragas, ou seja, larvas e ninfas (e adultos em alguns casos), espera-se que não haja impactos sobre a fase de ovo. Assim, a expectativa de que parasitóides de ovos sejam afetados pelas proteínas é mínima em comparação com parasitóides das fases de alimentação, o que explica a falta de estudos com esse grupo de insetos em avaliações de risco. Apesar disso, há várias rotas de exposição plausíveis dos parasitóides de ovos a proteínas de plantas modificadas geneticamente que devem ser examinadas com maior detalhe, como também já foi ilustrado por BIRCH et al. (2004). Embora se tenha criado a expectativa de que os parasitóides de ovos não são afetados ao parasitarem ovos de hospedeiros que ingeriram proteínas expressas em plantas transgênicas, na verdade não se tem estudado a presença ou ausência das proteínas nos ovos hospedeiros e se a ingestão da proteína pelo hospedeiro pode afetar a qualidade dos ovos como alimento para os parasitóides (BERNAL 2010).

Uma das abordagens mais aceitas para se realizar estudos sobre os efeitos de cultivos transgênicos sobre organismos não alvos é a avaliação em etapas ou camadas (do inglês 'tiers') (ROMEIS et al. 2008). O sistema de avaliação consiste basicamente em três etapas. Na primeira são conduzidos bioensaios em laboratório utilizando-se elevadas dosagens das proteínas num sistema controlado, que se tem convencionalmente chamar de 'pior cenário' (do inglês 'worst case'). A passagem para a próxima etapa dependerá dos resultados obtidos. Se não forem observados efeitos negativos sobre o

organismo em estudo, não há necessidade de prosseguirem os estudos e os resultados seguem para o sistema de decisão regulatória ou avaliação de risco. Observando-se efeito negativo, passa-se para a próxima etapa. Nesta, realizam-se estudos em semicampo ou mesmo laboratório, empregando-se doses realísticas num sistema controlado. Com os resultados em mãos, aplica-se o mesmo procedimento anterior. Se forem observados efeitos negativos, avança-se para a terceira e última etapa, na qual se conduzem estudos em campo. Assim, nesta etapa avalia-se o efeito com doses realísticas num sistema agrícola real, no qual as interações ecológicas envolvidas são extremamente complexas e por isso mesmo, os efeitos negativos observados nas etapas anteriores podem ou não ocorrer. Independente dos resultados obtidos na terceira etapa são eles submetidos ao sistema de decisão regulatória ou avaliação de risco que deverá analisar todo um conjunto de dados e informações para decidir sobre a liberação dos produtos transgênicos.

Considerando o cenário acima exposto, a liberação comercial do milho MIR 162 expressando a proteína Vip3Aa20, o aumento da incidência de *D. saccharalis* em cultivos de milho, a importância de seus inimigos naturais como agentes de controle biológico, a falta de informações sobre a interação de todos estes fatores, principalmente a falta de informações sobre a ação de proteínas Vip em parasitóides, e a necessidade de se ampliar o leque de espécies avaliadas em estudos de organismos não alvos envolvendo transgênicos para melhor representar a biodiversidade encontrada nos agroecossistemas, objetivou-se realizar esta pesquisa. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da proteína Vip3Aa20 sobre *D. saccharalis* e seus inimigos naturais, *C. flavipes* e *T. galloi*.

REFERÊNCIAS

ANDOW, D. A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, v. 54, n. 7, p. 637-649, 2004.

ANDOW, D. A.; LÖVEI, G. L.; ARPAIA, S. Ecological risk assessment for Bt crops. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 749-751, 2006.

ARPAIA, S. Genetically modified plants and “non-target” organisms: analysing the functioning of the agro-ecosystem. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 5, p. 12-80, 2010.

BALDWIN, J.; HUANG, F.; LEONARD, B. R. **Corn borer pests in Louisiana corn**. LSU Baton Rouge, LA, USA, Louisiana State University AgCenter, AgCenter Research and Extension Publication 2947, 2006. 4p.

BARTON, K.; WHITELEY, H.; YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v. 85, p. 1103-1109, 1987.

BERNAL, J. S. Genetically modified crops and biological control with egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Dordrecht: Springer, p. 443-466, 2010. 479p.

BIRCH, A. N. E.; WHEATLEY, R.; ANYANGO, B.; ARPAIA, S.; D. CAPALBO, GETU DEGAGA, E.; FONTES, D. E.; KALAMA, P.; LELMEN, E.; LÖVEI, G.; MELO, I. S.; MUYEKHO, F.; NGI-SONG, A.; OCHIENO, D.; OGWANG, J.; PITELLI, R.; SCHULER, T.; SÉTAMOU, M.; SRINIVASAN, S.; SMITH, J.; VAN SON, N.; SONGA, J.; SUJII, E.; TAN, T. Q.; WAN, F. H.; HILBECK, A. Biodiversity and non-target impacts: a case study of Bt maize in Kenya. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A. (eds.) **Environmental risk assessment of transgenic organisms: A case study of Bt maize in Kenya**. Wallingsford: CABI International, p. 117-185, 2004. 304p.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (eds.) **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p. 477-494. 635p.

BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; CHAGAS NETO, J. F.; OLIVEIRA, C. P. B. Associação do Parasitóide de Ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do Parasitóide Larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no Controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em

Cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; PEREIRA-BARROS, J. L.; SANTOS, A. J. N.; CARVALHO, L. W. T.; CARVALHO, L. H. T.; OLIVEIRA, C. J. T. Efeito do número de adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) liberados em semanas sucessivas, para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2007.

CANDOLFI, M., BIGLER, F.; CAMPBELL, P.; HEIMBACH, U.; SCHMUCK, R.; ANGELI, G.; BAKKER, F.; BROWN, K.; CARLI, G.; DINTER, A.; FORTI, D.; FORSTER, R.; GATHMANN, A.; HASSAM, S.; MEAD-BRIGGS, M.; MELANDRI, M.; NEUMANN, P.; PASQUALINI, E.; POWELL, W.; REBOULET, J. N.; ROMIJN, K.; SECHSER, B.; THIEME, Th.; UFER, A.; VERGNET, Ch. VOGT, H. Principles for regulatory testing and interpretation of semi-field and field studies with non-target arthropods. **Journal of Pest Science**, v. 73, n. 6, p. 141-147, 2000.

CASTRO, B. A.; RILEY, T. J.; LEONARD, B. R.; BALDWIN, J. Borers galore: emerging pest in Louisiana corn, grain sorghum and rice. **Louisiana Agriculture** v. 47, p. 4-6, 2004.

COWGILL, S. E.; ATKINSON, H. J. A sequential approach to risk assessment of transgenic plants expressing protease inhibitors: effects on nontarget herbivorous insects. **Transgenic Research**, v. 12, p. 439-449, 2003.

CRUZ, I. **A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa (Circular Técnica), n. 90, 2007. 12p.

CTNBio. 2009. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos, milho MIR 162**. Parecer Técnico nº 2042/2009. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14056.html> (acesso em 10 janeiro de 2011).

EDGE, J. M.; BENEDICT, J. H.; CARROLL, J. P.; REDING, H. K. Bollgard cotton: an assessment of global economic, environmental, and social benefits. **The Journal of Cotton Science**, v.5, p. 121-136, 2001.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL,

M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

GROOT, A. T.; DICKE, M. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. **The Plant Journal**, v. 31, p. 387-406, 2002.

HILL, R. A. Conceptualizing risk assessment methodology for genetically modified organisms. **Environmental Biosafety Research**, v. 4, p. 67-70, 2005.

HILL, R. A.; SENDASHONGA, C. General principles for risk assessment of living modified organisms: Lessons from chemical risk assessment. **Environmental Biosafety Research**, v. 2, p. 81-88, 2003.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009**. Ithaca, NY: ISAAA, n. 41, 2009.

JOHNSON, K. L.; RAYBOULD, A. F.; HUDSON, M. D.; POPPY, G. M. How does scientific risk assessment of GM crops fit within the wider risk analysis? **TRENDS in Plant Science**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2006.

LIMA FILHO, M.; LIMA, J. O. G. Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: Número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições naturais. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 483-488, 2001.

LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S.; CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, v. 399, p. 214, 1999.

LÖVEI, G. L.; ANDOW, D. A.; ARPAIA, S. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: A detailed review of laboratory studies. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 2; p. 293-306, 2009.

LÖVEI, G. L.; ARPAIA, S. The impact of transgenic plants on natural enemies: A critical review of laboratory studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 114, p. 1-14, 2005.

MARVIER, M. Improving risk assessment for nontarget safety of transgenic crops. **Ecological Applications**, v. 12, n. 4, p. 1119–1124, 2002.

MORÉ, M.; TRUMPER, E. V.; PROLA, M. J. Influence of corn, *Zea mays*, phenological stages in *Diatraea saccharalis* F. (Lep. Crambidae) oviposition. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 512-515, 2003.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 271-292, 2005.

PINTO, A. S.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N.; ARRIGONI, E. D. B. Comparação de técnicas de liberação de *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 311-318, 2003.

POPPY, G. M.; SUTHERLAND, J. P. Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. **Physiological Entomology**, v. 29, p. 257-268, 2004.

PRASIFKA, J. R.; HELLMICH, R. L.; DIVELY, G. P.; HIGGINS, L. S.; DIXON, P. M.; DUAN, J. J. Selection of nontarget arthropod taxa for field research on transgenic insecticidal crops: using empirical data and statistical power. **Environmental Entomology**, v. 37, n. 1, p. 1-10, 2008.

RAYBOULD, A. Problem formulation and hypothesis testing for environmental risk assessments of genetically modified crops. **Environmental Biosafety Research**, v. 5, p. 119-125, 2006.

ROMEIS, J.; BARTSCH, D.; BIGLER, F.; CANDOLFI, M. P.; GIELKENS, M. M. C.; HARTLEY, S. E.; HELLMICH, R. L.; HUESING, J. E.; JEPSON, P. C.; LAYTON, R.; QUEMADA, H.; RAYBOULD, A.; ROSE, R. I.; SCHIEMANN, J.; SEARS, M. K.; SHELTON, A. M.; SWEET, J.; VAITUZIS, Z.; WOLT, J. D. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, 2008.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 63-71, 2006.

SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 78, n. 5, p. 2893-2897, 1981.

SHELTON, A. M.; SEARS, M. K. The monarch butterfly controversy: scientific interpretations of a phenomenon. **The Plant Journal**, v. 27, n. 6, p. 483-488, 2001.

SHELTON, A. M.; ROUSH, R. T. False reports and the ears of men. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 832, 1999.

TODD, J. H.; RAMANKUTTY, P.; BARRACLOUGH, E. I.; MALONE, L. A. A screening method for prioritizing non-target invertebrates for improved biosafety testing of transgenic crops. **Environmental Biosafety Research**, v. 7, p. 35-56, 2008.

CAPÍTULO 2 - TOXICIDADE DE Vip3Aa20 À BROCA-DO-COLMO *Diatraea saccharalis*: EFEITOS LETAL E SUBLETAL

RESUMO - Avaliou-se no presente trabalho a toxicidade da proteína Vip3Aa20 à broca-do-colmo *Diatraea saccharalis* (Fabricius) por meio da quantificação dos efeitos letais e subletais produzidos pela ação da proteína nos insetos. Larvas no segundo instar de desenvolvimento foram individualizadas e dispostas na superfície de dieta artificial contendo concentrações crescentes da proteína, de 0 a 713 ng.cm⁻². Foram conduzidos quatro bioensaios em sequência com o mesmo grupo de insetos, porém de idades diferentes (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias de idade), sendo que o primeiro bioensaio foi instalado logo após as larvas mudarem para o segundo instar. As análises de regressão foram significativas nos quatro bioensaios para mortalidade larval, duração do período larval, peso de larvas e número de instares larvais. A maior mortalidade larval obtida foi de 77,6% no primeiro bioensaio na concentração de 713 ng.cm⁻². A duração do período larval aumentou com a ingestão da proteína pelas larvas, dobrando no primeiro bioensaio entre a testemunha (~25 dias) e a maior concentração avaliada (~50 dias). O peso de larvas foi drasticamente reduzido em todos os bioensaios, representando, aproximadamente, entre 5% e 8% do peso em relação à testemunha para a maior concentração. O número de instares larvais aumentou nos insetos que ingeriram a proteína. A fase de pupa não apresentou efeitos significativos da ingestão da proteína pelas larvas nas características mortalidade e duração do período. Ficou evidenciado pelos resultados obtidos, que a proteína Vip3Aa20 afetou negativamente a sobrevivência e o desenvolvimento de *D. saccharalis*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, organismos alvo, proteínas vegetativas

inseticidas

SUMMARY - This study evaluated the toxicity of the protein Vip3Aa20 on the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius) by quantifying both lethal and sublethal effects caused by the action of the protein. Second-instar larvae were individualized and placed on the surface of artificial diet treated with increasing concentrations of the protein, 0 at 713 ng.cm⁻². Four bioassays were carried out using the same group of insects, but with different ages: 4.0, 4.5, 5.5 and 6.0 days old. The first bioassay was installed immediately after larvae had passed to the second instar. Regression analysis was significant in all bioassays for the larval mortality, larval period, larval weight and number of larval instars. The highest larval mortality (77,6%) was obtained in the first bioassay at a concentration of 713 ng.cm⁻². The larval period increased with protein intake by the larvae, doubling in the first bioassay between control (~ 25 days) and the highest concentration evaluated (~ 50 days). The larval weight was dramatically reduced in all trials, roughly 5% to 8% by weight compared the major concentration to the control. The number of larval instars increased in the treatments with the protein. The pupal stage had no significant effect of protein intake by larvae in mortality and period length. The results showed that the Vip3Aa20 protein negatively affected survival and development.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, target organisms, vegetative insecticidal protein

INTRODUÇÃO

Plantas de milho são hospedeiras naturais da broca-do-colmo *Diatraea*

saccharalis (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) (PEAIRS & SAUNDERS 1980), sendo que a incidência e a importância desta praga vêm aumentando ao longo do tempo em algumas regiões do Brasil onde tradicionalmente não ocasionava prejuízos expressivos na cultura do milho (CRUZ 2007). Nos Estados Unidos, maior produtor mundial de milho, a broca-do-colmo tornou-se séria ameaça à produção do cereal (CASTRO et al. 2004b; BALDWIN et al. 2006) e, segundo MORÉ et al. (2003), é a principal praga do milho na Argentina. De acordo com PINTO et al. (2004), a praga ocasiona danos à cultura do milho ao destruir a gema apical da planta, seccionar o colmo tornando a planta mais suscetível ao tombamento, abrir galerias longitudinais no colmo e atacar as espigas.

O desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos iniciou-se em 1987 com a introdução de um gene da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner em plantas de tabaco conferindo resistência a *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) (BARTON et al. 1987). As primeiras cultivares transgênicas resistentes a insetos foram aprovadas para liberação comercial nos Estados Unidos da América no ano de 1995 e plantadas em 1996. Desde então, o cultivo comercial de plantas geneticamente modificadas, no mundo, aumenta anualmente (KENNEDY 2008).

A resistência a plantas geneticamente modificadas pelos insetos constitui uma preocupação constante desde o início do cultivo de plantas transgênicas (ANDOW 2008; BRAVO & SOBERÓN 2008; TABASHNIK et al. 2009). De acordo com BATES et al. (2005), ao longo do tempo foram formuladas diversas estratégias para evitar ou atrasar o desenvolvimento da resistência pelos insetos e entre as principais estratégias estão a moderada expressão da toxina para permitir a sobrevivência de uma fração de insetos suscetíveis, a alta expressão da toxina para matar todos os insetos heterozigóticos para resistência, a combinação de toxinas, a expressão da proteína em tecidos específicos ou em determinados períodos e a provisão de plantas não transgênicas, seja na mistura de sementes ou como área de refúgio.

Alguns estudos demonstraram a possibilidade de desenvolvimento de resistência a plantas de milho expressando a proteína Cry1Ab por *D. saccharalis* (HUANG et al. 2007; WU et al. 2007; YUE et al. 2008; WU et al. 2009). Considerando que o milho Bt

expressando a proteína Cry1Ab tornou-se uma das principais ferramentas para o manejo de brocas-do-colmo nos Estados Unidos (CASTRO et al. 2004a; HUANG et al. 2007), a possibilidade da ocorrência de resistência faz com que se busquem estratégias para obstar a evolução da resistência às cultivares transgênicas por *D. saccharalis*.

As proteínas Vip (*vegetative insecticidal proteins*) foram primeiramente descritas por ESTRUCH et al. (1996), e segundo LEE et al. (2003) o modo de ação destas proteínas difere do modo de ação das proteínas Cry. A expressão de proteínas Vip e Cry numa mesma planta pode ser uma estratégia eficaz para lidar com o desenvolvimento da resistência bem como pode ampliar o número de pragas controladas pelas culturas transgênicas (ZHAO et al. 2003; LEE et al. 2006; KURTZ et al. 2007).

Genes que codificam a proteína Vip3Aa20 foram incorporados em plantas de milho e já há cultivares aprovadas para comercialização no Brasil, como é o caso do milho MIR 162. Esta proteína demonstrou ser altamente tóxica a *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), *O. nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Striacosta albicosta* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (CTNBio 2009).

Considerando a disponibilização comercial de uma variedade de milho expressando a proteína Vip3Aa20, a crescente incidência de *D. saccharalis* em lavouras de milho no Brasil e a ausência de informações sobre o efeito da proteína Vip3Aa20 sobre a broca-do-colmo, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a suscetibilidade de *D. saccharalis* a essa proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

Os insetos (*D. saccharalis*) foram provenientes do laboratório de Controle Biológico da Usina São Martinho, Pradópolis-SP. A proteína Vip3Aa20 foi fornecida pela

empresa Syngenta Seeds na forma purificada (86,5% de pureza), sendo solubilizada em solução tampão 10 mM Tris-HCl, 0,4 mM EDTA, 0,1% Tween 20.

Nos bioensaios utilizaram-se larvas de *D. saccharalis* no segundo instar, em quatro momentos diferentes. O primeiro bioensaio com larvas que recém mudaram para o segundo instar (com 4 dias de idade), o segundo com larvas de 4,5 dias, o terceiro com larvas de 5,5 dias e por último, o quarto bioensaio, com larvas de 6 dias de idade, ainda no segundo instar. A dieta de alimentação das larvas foi baseada em KING & HARTLEY (1985).

Soluções com concentrações crescentes da proteína (0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram preparadas e utilizadas nos bioensaios. Posteriormente, esses valores foram recalculados para valores de concentração por superfície da dieta, resultando nos valores de 0; 11; 22; 44; 89; 178; 356 e 713 ng.cm^{-2} de proteína Vip3Aa20 na superfície da dieta. Para isso, blocos de dieta a serem oferecidos às larvas tiveram o peso avaliado antes da imersão (1 minuto) na solução protéica e após o escoamento por 1 minuto.

Para a realização do bioensaio, blocos de dieta de igual superfície ($12,3 \text{ cm}^2$) foram mergulhados em solução, deixando-os em imersão por 1 minuto. Em seguida, os blocos foram dispostos sobre uma peneira para escorrer o excesso de solução e mantidos em laboratório sob temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas para secagem. As larvas foram colocadas sobre os blocos de dieta e individualizadas em placas Petri (6 cm de diâmetro). Cada bioensaio foi conduzido de forma inteiramente casualizada (DIC) com 8 tratamentos e 50 larvas por tratamento.

A cada 6 a 7 dias foi fornecido um novo bloco de dieta com a solução sobre a superfície, seguindo a metodologia descrita anteriormente. Os insetos foram mantidos em estufas climatizadas ($28 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas).

Avaliações diárias foram realizadas para acompanhar o desenvolvimento das larvas. No décimo dia após o início de cada bioensaio, pesaram-se aleatoriamente 20 larvas de cada tratamento. As pupas também foram pesadas, 24 horas após a empupação. Além destes, foram avaliadas as características mortalidade larval e pupal, duração do período larval, número de instares e duração do período pupal. Para as

avaliações de mortalidade, calculou-se a porcentagem de mortos dentro do conjunto de insetos de cada tratamento. Assim, para a análise de regressão obteve-se um valor por tratamento.

Com auxílio do programa estatístico Minitab 15 (MINITAB 2007) realizaram-se análises de regressão linear para apontar se houve efeito da proteína Vip3Aa20 sobre as características avaliadas de *D. saccharalis*. Adotou-se como nível de significância 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Os resultados das análises de regressão para a mortalidade de larvas foram significativos nas quatro idades avaliadas. Na primeira idade (4,0 dias) obteve-se a maior mortalidade (77,6%) e a relação entre as concentrações crescentes da proteína Vip3Aa20 com a mortalidade larval foi positiva e significativa (GL = 1, 6; F = 87,04, P < 0,001). Nas demais idades a relação também foi significativa sendo que a mortalidade obtida na maior concentração avaliada (713 ng.cm⁻²) foi de 28,0% com 4,5 dias (GL = 1, 6; F = 14,73; P = 0,009), 47,9% com 5,5 dias (GL = 1, 6; F = 108,32; P < 0,001) e 39,6% com 6,0 dias (GL = 1, 6; F = 1228,61; P < 0,001) (Figura 1).

A duração da fase de larva também foi afetada pela proteína Vip3Aa20 quando ingerida pelas larvas de *D. saccharalis*. De forma semelhante à mortalidade, observou-se relação positiva e significativa entre as concentrações da proteína e a duração da fase larval, ou seja, maiores concentrações da proteína ocasionaram a extensão do período considerado, nas quatro idades larvais. Na idade de 4,0 dias observaram-se os maiores períodos larvais, que atingiram, em média, 50,55 ± 2,12 dias de duração na maior concentração contra 25,10 ± 0,34 dias na testemunha (Figura 2) sendo que a relação entre a proteína e a duração da fase larval foi significativa (GL = 1, 318; F = 687,03; P < 0,001). Igualmente significativas foram para as demais idades: 4,5 dias (GL = 1, 340; F = 69,73; P < 0,001), 5,5 dias (GL = 1, 353; F = 257,92; P < 0,001) e 6,0 dias (GL = 1, 343; F = 250,14; P < 0,001). Os valores obtidos no tratamento testemunha

foram $26,23 \pm 0,62$, $26,40 \pm 0,40$ e $25,46 \pm 0,40$ dias de duração da fase larval respectivamente para as idades de 4,5, 5,5 e 6,0 dias, enquanto que os valores observados no tratamento com maior concentração (713 ng.cm^{-2}) de proteína Vip3Aa20 foram $39,44 \pm 0,86$, $41,88 \pm 1,98$ e $39,21 \pm 0,96$ dias de duração da fase larval respectivamente para as idades de 4,5, 5,5 e 6,0 dias (Figura 2).

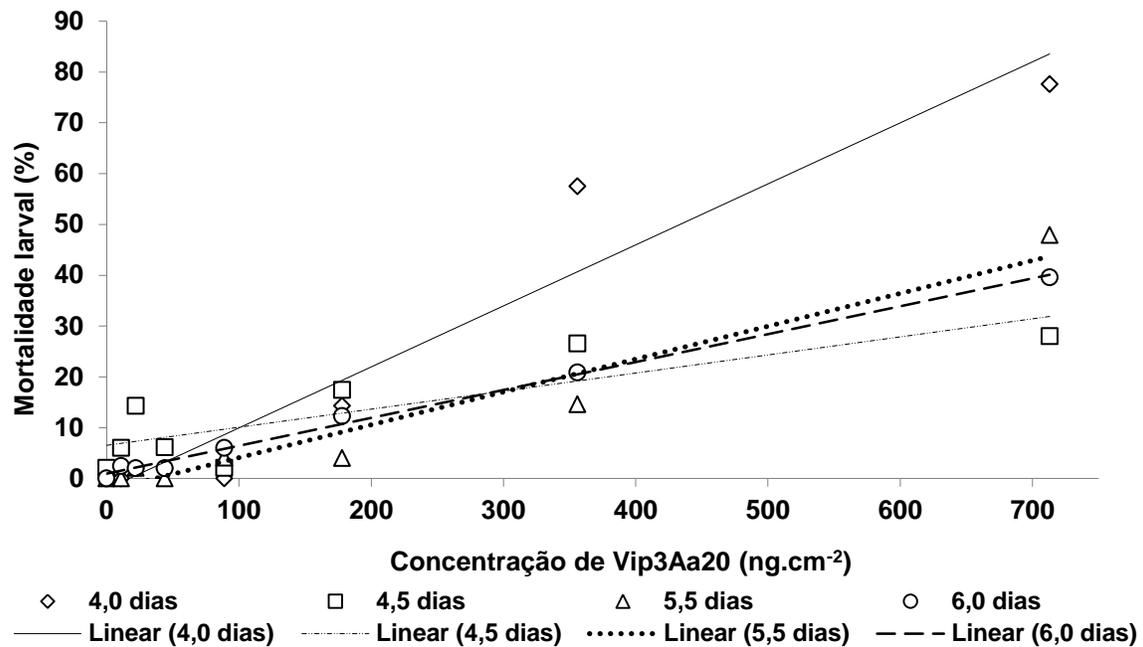


Figura 1. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e a mortalidade larval de *Diatraea saccharalis*, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias).

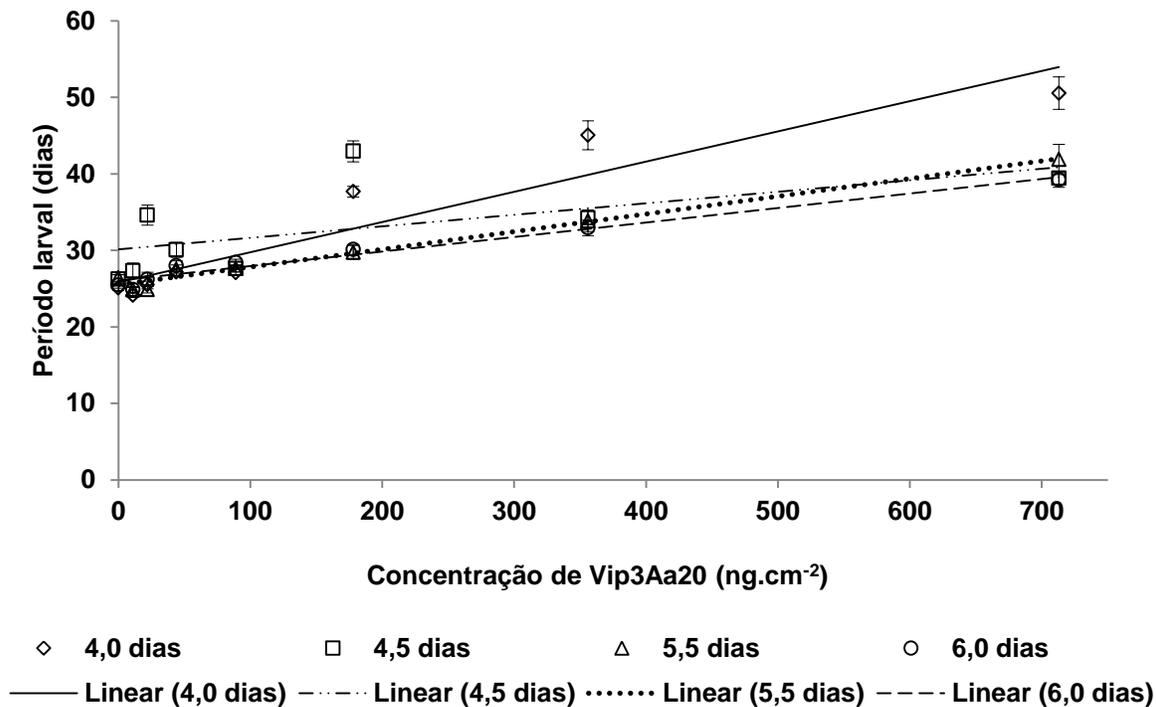


Figura 2. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e a duração da fase larval de *Diatraea saccharalis*, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias). As barras indicam o erro padrão da média.

O número de instares larvais foi alterado pela proteína. Os resultados obtidos sugerem que as larvas prolongam o desenvolvimento, por meio de maior número de ecdises quando ingerem a proteína Vip3Aa20 (Figura 3). A relação entre as concentrações da proteína e o número de instares foi significativa para as quatro idades consideradas, de 4,0 dias (GL = 1, 309; F = 22,42; P < 0,001), de 4,5 dias (GL = 1, 321; F = 7,06; P = 0,008), de 5,5 dias (GL = 1, 345; F = 25,60; P < 0,001) e de 6,0 dias (GL = 1, 337; F = 12,07; P = 0,001). As médias do número de instares obtidas no tratamento testemunha foram $5,49 \pm 0,07$, $5,49 \pm 0,08$, $5,42 \pm 0,07$ e $5,26 \pm 0,06$ respectivamente para as idades de 4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias. Por sua vez, as médias obtidas na maior concentração foram $6,09 \pm 0,16$, $5,69 \pm 0,08$, $5,84 \pm 0,09$ e $5,83 \pm 0,09$ respectivamente para as idades de 4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias.

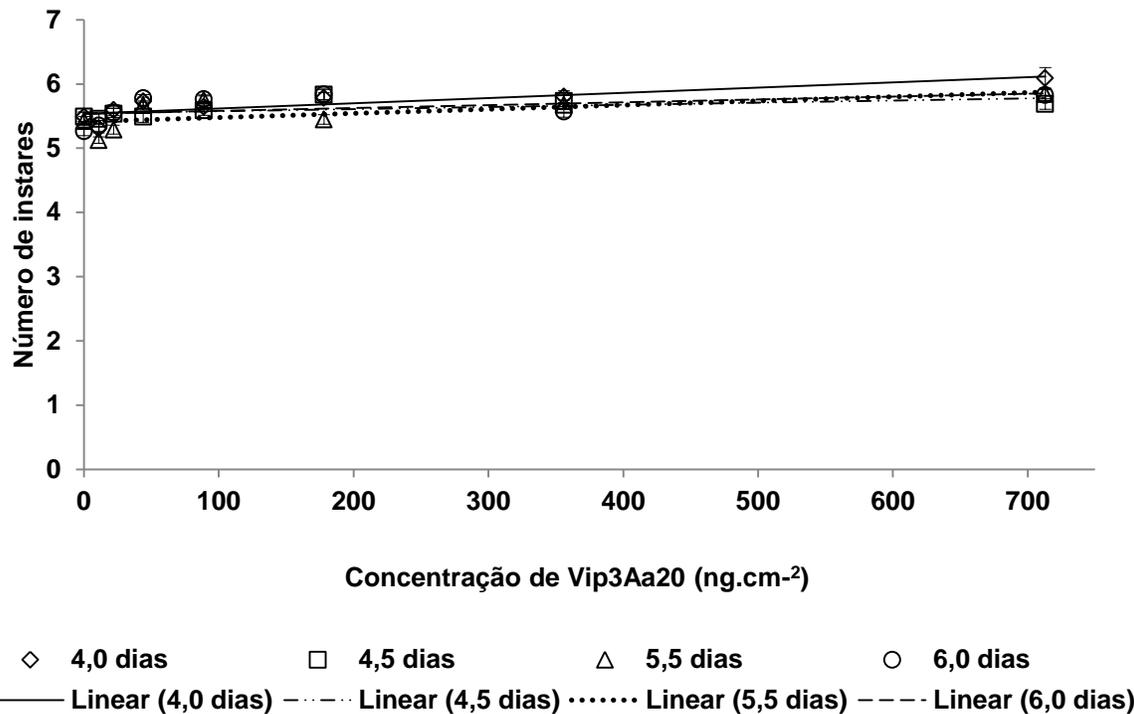


Figura 3. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e o número de instares da fase larval de *Diatraea saccharalis*, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias). As barras indicam o erro padrão da média.

O peso das larvas dez dias após a instalação do bioensaio apresentou relação negativa com as concentrações de Vip3Aa20, decrescendo ante o aumento das concentrações da proteína (Figura 4). Para as quatro idades avaliadas, as análises de regressão foram significativas: 4,0 dias (GL = 1,158; F = 157,64; P < 0,001), 4,5 dias (GL = 1,158; F = 125,02; P < 0,001), 5,5 dias (GL = 1,158; F = 106,85; P < 0,001) e 6,0 dias (GL = 1,158; F = 116,73; P < 0,001). O peso das larvas foi, respectivamente para a testemunha e a maior concentração da proteína, de $48,48 \pm 2,95$ mg e $2,63 \pm 1,31$ mg na idade de 4,0 dias, de $55,35 \pm 3,54$ mg e $3,29 \pm 1,21$ mg com 4,5 dias, de $55,51 \pm 4,81$ mg e $4,42 \pm 1,25$ mg com 5,5 dias e de $92,70 \pm 7,65$ mg e $5,67 \pm 1,92$ mg para a idade de 6,0 dias.

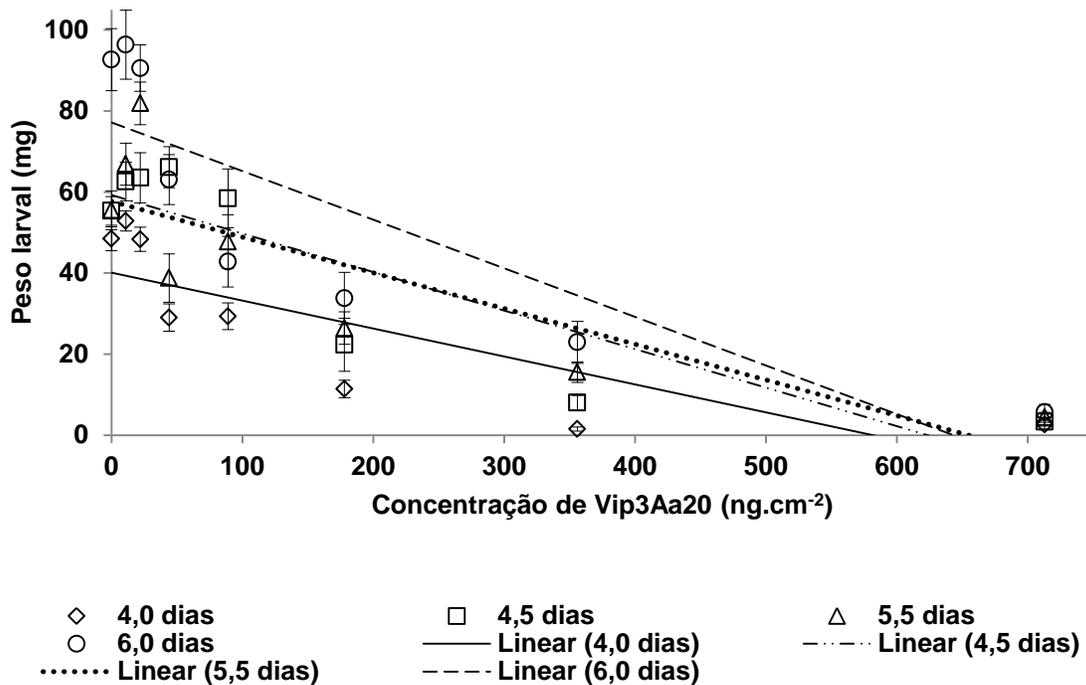


Figura 4. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e o peso larval de *Diatraea saccharalis* após dez da instalação dos bioensaios, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias). As barras indicam o erro padrão da média.

A mortalidade de pupas de *D. saccharalis* não foi influenciada pela proteína Vip3Aa20 ingerida na fase larval em nenhuma das quatro idades avaliadas (Figura 5), conforme verificado pelas análises de regressão para a idade de 4,0 dias (GL = 1, 6; F = 0,28, P = 0,614), 4,5 dias (GL = 1, 6; F = 2,17, P = 0,191), 5,5 dias (GL = 1, 6; F = 0,00, P = 0,953) e 6,0 dias (GL = 1, 6; F = 0,12, P = 0,745). A duração da fase de pupa também não foi alterada pela ingestão da proteína durante a fase larval (Figura 6). As análises de regressão não foram significativas para a idade de 4,0 dias (GL = 1, 300, F = 2,11, P = 0,147), 4,5 dias (GL = 1, 306, F = 0,33, P = 0,568), 5,5 dias (GL = 1, 336, F = 2,13, P = 0,145) e 6,0 dias (GL = 1, 327, F = 0,57, P = 0,450).

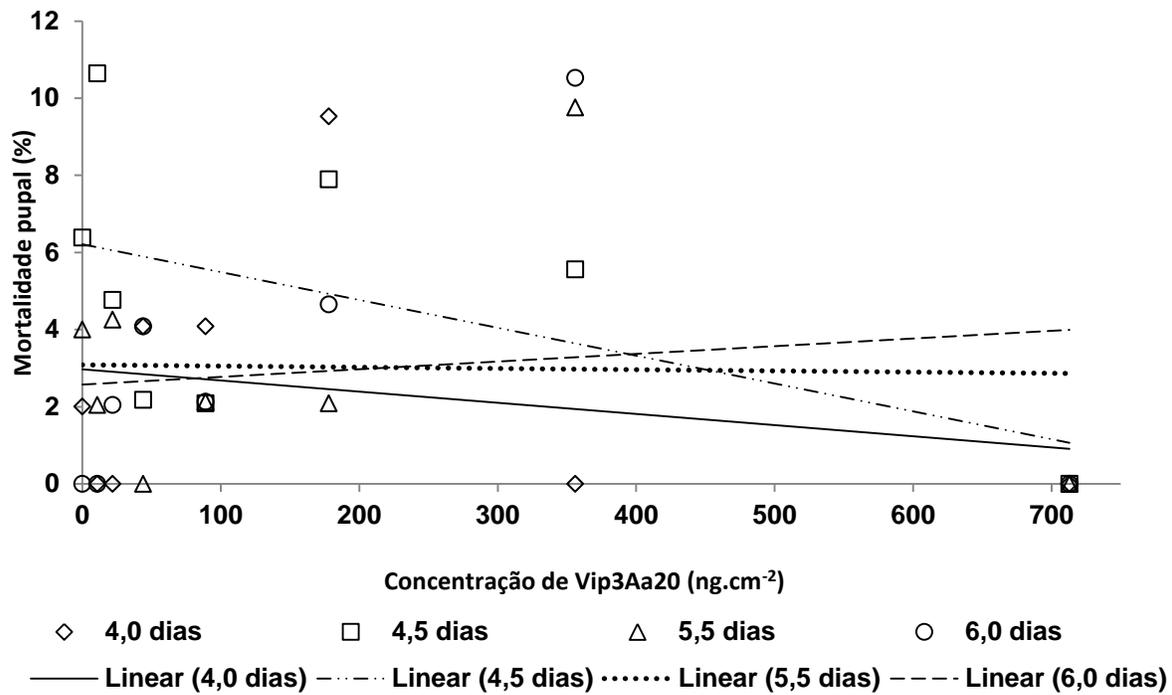


Figura 5. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e a mortalidade pupal de *Diatraea saccharalis*, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias).

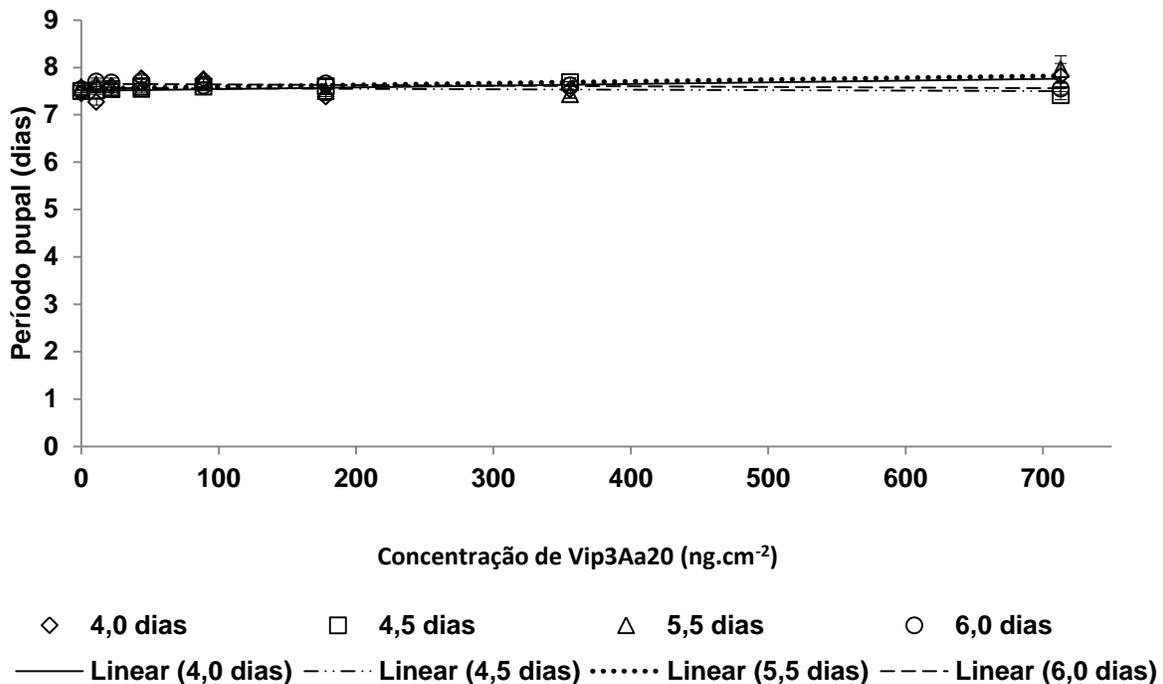


Figura 6. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e a duração da fase de pupa de *Diatraea saccharalis*, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias). As barras indicam o erro padrão da média.

Os resultados das análises de regressão para o peso de pupas foram divergentes entre as idades avaliadas, tanto para machos como para fêmeas. Em machos, as análises de regressão para as idades de 4,0 dias (GL = 1, 142; F = 16,20, P < 0,001) e 6,0 dias (GL = 1, 167; F = 9,39, P = 0,003) foram significativas e para 4,5 dias (GL = 1, 168; F = 0,73, P = 0,393) e 5,5 dias (GL = 1, 181; F = 1,31, P = 0,254) não foram significativas. Os valores variaram para a testemunha e a maior concentração entre $138,70 \pm 3,71$ mg e $114,59 \pm 8,82$ mg com 4,0 dias, entre $141,61 \pm 4,39$ mg e $128,77 \pm 6,34$ mg com 4,5 dias, entre $144,76 \pm 5,40$ mg e $131,82 \pm 7,34$ mg com 5,5 dias e entre $142,15 \pm 3,06$ mg e $129,3,73$ mg com 6,0 dias de idade no momento da instalação do bioensaio (Figura 7).

No entanto, para fêmeas, as análises de regressão foram significativas em três idades avaliadas (4,0, 4,5 e 6,0 dias) e somente na idade de 5,5 dias não houve significância para a relação entre a proteína e o peso das pupas fêmea. Na idade de 4,0

dias (GL = 1, 165; F = 7,97; P = 0,005) os valores variaram entre $227,87 \pm 7,11$ mg e $222,88 \pm 26,70$ mg, com 4,5 dias (GL = 1, 153; F = 4,96; P = 0,027) variaram entre $258,27 \pm 9,75$ mg e $191,66 \pm 11,07$ mg, com 5,5 dias (GL = 1, 165; F = 2,92; P = 0,089) entre $257,31 \pm 9,25$ mg e $219,28 \pm 18,71$ mg e com 6,0 dias (GL = 1, 172; F = 20,80; P < 0,001) entre $253,19 \pm 12,40$ mg e $201,41 \pm 12,37$ mg, respectivamente entre a testemunha e a maior concentração (Figura 8).

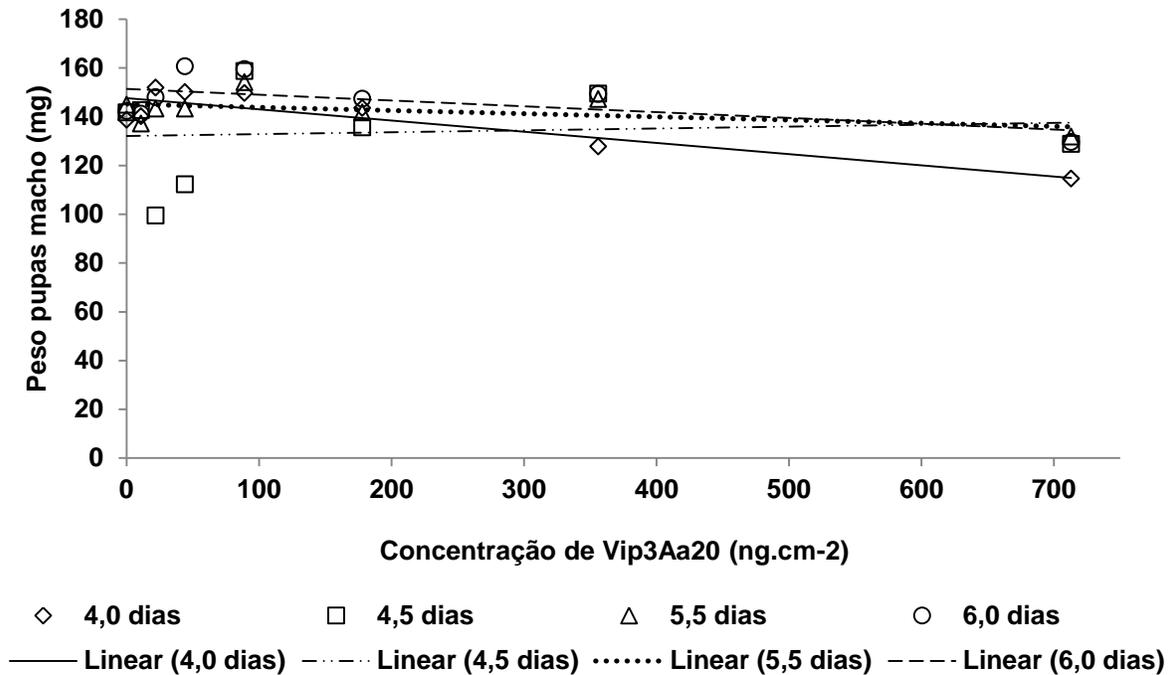


Figura 7. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e o peso de pupas macho de *Diatraea saccharalis*, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias). As barras indicam o erro padrão da média.

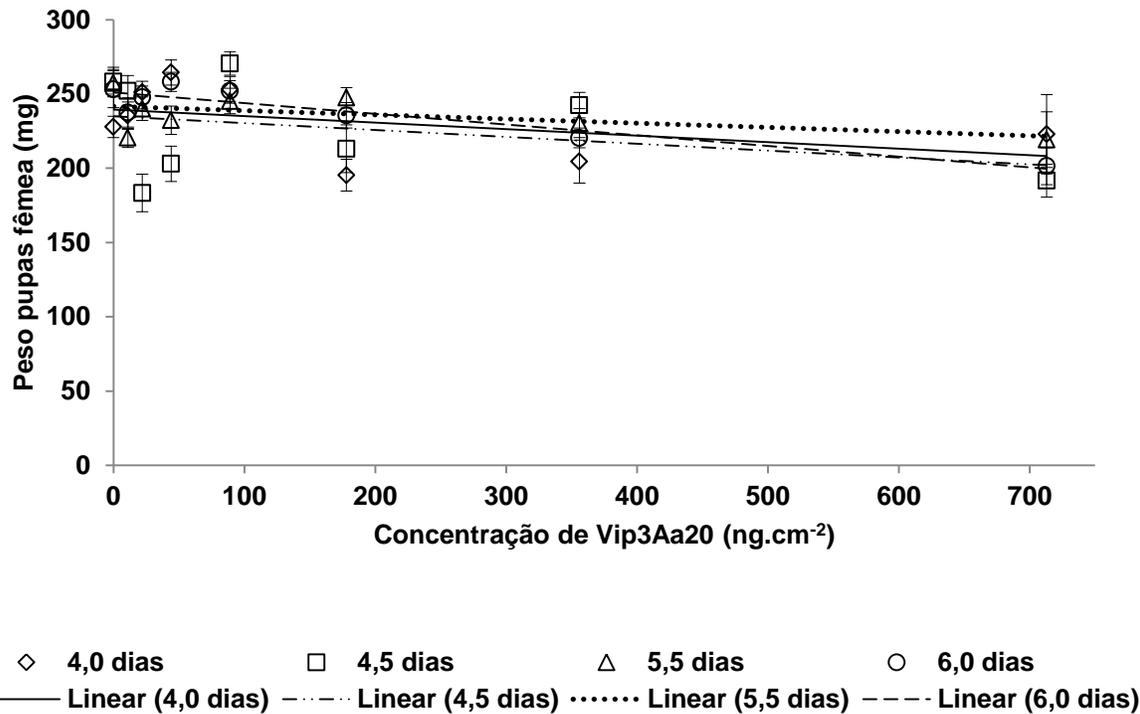


Figura 8. Relação entre as concentrações de proteína Vip3Aa20 e o peso de pupas fêmea de *Diatraea saccharalis*, considerando idades diferentes no momento da instalação do bioensaio (4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias). As barras indicam o erro padrão da média.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram a suscetibilidade de *D. saccharalis* à proteína Vip3Aa20. A proteína causou efeitos letais e subletais quando ingerida pelas larvas da broca-do-colmo. Nas concentrações avaliadas a maior mortalidade ocorreu no primeiro bioensaio, com larvas de 4 dias de idade, e atingiu 77,6% na concentração 713 ng.cm^{-2} . A diminuição nos valores de mortalidade observada nos bioensaios seguintes pode estar associada à diminuição da suscetibilidade das larvas com o aumento da idade larval, como já foi demonstrado em outros estudos que a idade é um fator importante para a suscetibilidade das larvas (KELLER et al. 1996; CHATTOPAHYAY et al. 2004; CHEN et al. 2008), embora a maior diferença entre as idades avaliadas tenha sido de apenas dois dias. Por outro lado, a mortalidade das pupas não apresentou

influência da proteína quando as larvas a ingeriram. Todavia, as concentrações intermediárias causaram maior mortalidade de pupas do que a maior concentração. Nesta, por apresentar maior efeito letal nas larvas, os insetos que conseguiram sobreviver e empupar não mais morreram na fase de pupa. No caso das concentrações intermediárias, o efeito letal sobre as larvas não foi tão pronunciado, mas a mortalidade das pupas sugere que embora as larvas continuassem vivas e empupassem, as pupas estariam debilitadas, morrendo seja no momento da empupação ou durante a fase de pupa.

A maioria dos trabalhos que avaliam o efeito de proteínas expressas em plantas transgênicas sobre os insetos pragas negligenciam os efeitos subletais, restringindo-se apenas aos letais. De acordo com FRANKENHUYZEN (2009), embora os efeitos subletais sejam indicadores mais sensíveis da toxicidade das proteínas, a maioria dos bioensaios (~95%) utiliza a mortalidade como variável resposta. Os efeitos subletais podem resultar em importantes implicações no controle das populações de insetos no campo, como por exemplo, ao estender a duração do período larval, as larvas permanecem expostas por maior tempo aos agentes de controle tais como doenças, parasitóides e predadores, ou mesmo condições ambientais adversas, aumentando a probabilidade de redução de suas populações. Assim, ao analisar os efeitos da proteína Vip3Aa20 sobre *D. saccharalis*, observa-se que a duração do período larval prolongou-se entre 50,4% a 101,4%, comparando-se as maiores concentrações com as testemunhas. BENREY & DENNO (1997) demonstraram, baseados na hipótese crescimento-lento/mortalidade-alta, que quanto maior a 'janela de suscetibilidade' do hospedeiro ao parasitóide (com o prolongamento da fase larval), maiores são as taxas de parasitismo, possibilitando maior controle das populações no campo.

Ainda na fase larval, observou-se efeito sobre o peso das larvas e o número de instares larvais. O peso das larvas foi drasticamente afetado pela proteína Vip3Aa20 no décimo dia após a ingestão da proteína. O peso na maior concentração (713 ng.cm⁻²) representou 5,43%, 5,94%, 7,95% e 6,11% em relação ao peso no tratamento testemunha, respectivamente para 4,0, 4,5, 5,5 e 6,0 dias de idade, demonstrando evidente restrição no desenvolvimento dos insetos. O número de instares aumentou

nos tratamentos com a proteína em relação à testemunha, sugerindo que as larvas mudam mais vezes de instar antes de empupar. De acordo com ESPERK et al. (2007), vários fatores podem afetar o número de instares em insetos, entre eles a temperatura, o fotoperíodo, qualidade e quantidade de alimento, a umidade, injúrias, a herança e o gênero sexual. Ainda, de acordo com os autores, o número de instares tende a ser maior sob condições adversas, num cenário de compensação, no qual instares adicionais são observados em condições ruins ou desfavoráveis quando a larva falha em atingir o tamanho limite específico da espécie para ocorrer a metamorfose, considerando o número normal de instares. Isso explica o maior número de instares observados nos tratamentos em que as larvas de *D. saccharalis* ingeriram a proteína Vip3Aa20 e apresentaram menor peso e maior duração do período larval.

A duração da fase de pupa não foi afetada pela ingestão da proteína na fase de larva. Por outro lado, o peso de pupas apresentou resultados divergentes entre os bioensaios conduzidos. Enquanto que para as pupas macho as análises de regressão foram significativas em dois bioensaios (4,0 e 6,0 dias), para as pupas fêmea houve significância em três bioensaios (4,0, 4,5 e 6,0 dias). Apesar dos resultados divergentes, os dados obtidos, como um todo, sugerem que o peso de pupas de *D. saccharalis* é afetado pela ingestão da proteína na fase larval, considerando que as larvas apresentaram menor peso e parte dos bioensaios também mostraram a diminuição do peso das pupas.

Os resultados negativos observados sobre o desenvolvimento das fases larval, principalmente, e pupal, sugerem que as mariposas podem apresentar menor desempenho biológico, o que precisaria ser investigado posteriormente. BESSIN & REAGAN (1990) demonstraram que a fecundidade das mariposas de *D. saccharalis* está relacionada com o peso pupal e que este está diretamente associado com a alimentação das larvas sobre diferentes plantas. Segundo os autores, cada miligrama de incremento no peso das pupas resulta em aumento de 4,3 ovos na fecundidade das fêmeas. Desta forma, a redução na fecundidade, através do efeito da proteína Vip3Aa20 sobre o peso de pupas, seria de 286,4 ovos, adotando-se como referência a maior diferença entre o peso de pupas da testemunha e da concentração 713 ng.cm⁻²,

obtida na idade de 4,5 dias. Se considerarmos a fecundidade entre 500 a 1000 ovos por fêmea obtida por PARRA et al. (1999), a redução de 286,4 ovos representaria cerca de 29% a 57% a menos na fecundidade de *D. saccharalis*.

MARÇON et al. (1999), avaliando o efeito das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac sobre *Ostrinia nubilalis*, utilizaram metodologia que considerou a "mortalidade prática" em lugar da 'mortalidade atual', pela qual se considera no cálculo da mortalidade também as larvas que, embora vivas, não se desenvolvem. Este método foi e continua sendo empregado por diversos autores, normalmente se procedendo a avaliação até 7 dias após o início do bioensaio. Como nós acompanhamos todo o desenvolvimento das larvas, pudemos observar por quanto tempo sobreviveram as larvas que não morreram imediatamente. Assim, tomando como exemplo o primeiro bioensaio (4 dias de idade) e a concentração 713 ng.cm⁻², observamos que as 33 larvas que morreram sem se desenvolver (permanecendo no segundo instar) , levaram 24,5 dias, em média, até morrer. Ou seja, mais de três semanas após o início do bioensaio e sem mudança de instar. Esse comportamento suscitou-nos a dúvida sobre qual foi a causa da morte: se as larvas ingeriram, mesmo que em pequena quantidade, a proteína e portanto morreram em função do seu efeito conquanto muito tempo após a ingestão, ou se elas apresentaram a capacidade/habilidade de detectar a presença da proteína Vip3Aa20 como um composto nocivo e desta forma evitaram se alimentar, morrendo por inanição. HUANG et al. (2001) registraram esse comportamento de alimentação em larvas de *O. nubilalis* quando foi misturado à dieta uma formulação comercial de *B. thuringiensis* (Dipel ESTM). De acordo com os autores, os primeiros instares, especialmente o segundo, apresentaram maior habilidade ou tendência em evitar as dietas tratadas com Dipel quando comparadas aos instares posteriores.

CONCLUSÃO

D. saccharalis é suscetível à proteína Vip3Aa20, apresentando efeitos letais e subletais devido à ação da proteína. As características afetadas negativamente pela

proteína foram a mortalidade larval, a duração e o peso larvais e o número de instares da fase de larva. A mortalidade de pupas e a duração da fase de pupa não foram afetadas.

REFERÊNCIAS

ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v.4, p.142-199, 2008.

BALDWIN, J.; HUANG, F.; LEONARD, B. R. **Corn borer pests in Louisiana corn**. LSU Baton Rouge, LA, USA, Louisiana State University AgCenter, AgCenter Research and Extension Publication 2947, 2006. 4p.

BARTON, K.; WHITELEY, H.; YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v.85, p.1103-1109, 1987.

BATES, S. L.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, v.23, n.1, p.57-62, 2005.

BENREY, B.; DENNO, R. F. The slow-growth–high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. **Ecology**, v.78, n.4, p.987–999, 1997.

BESSIN, R. T.; REAGAN, T. E. Fecundity of sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae), as affected by larval development on gramineous host plants. **Environmental Entomology**, v.19, n.3, p.635-639, 1990.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v.26, p.573-579, 2008.

CASTRO, B. A.; LEONARD, B. R.; RILEY, T. J. Management of feeding damage and

survival of southwestern corn borer and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) with *Bacillus thuringiensis* transgenic field corn. **Journal of Economic Entomology**, v.97, p.2106 – 2116, 2004b.

CASTRO, B. A.; RILEY, T. J.; LEONARD, B. R.; BALDWIN, J. Borers galore: emerging pest in Louisiana corn, grain sorghum and rice. **Louisiana Agriculture** v.47, p.4–6, 2004a.

CHATTOPADHYAY, A.; BHATNAGAR, N. B.; BHATNAGAR, R. Bacterial insecticidal toxins. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, n.1, p.33–54, 2004.

CHEN, M.; ZHAO, J. Z.; SHELTON, A. M.; CAO, J.; EARLE, E. D. Impact of single-gene and dual-gene Bt broccoli on the herbivore *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and its pupal endoparasitoid *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Transgenic Research**, v.17, p.545–555, 2008.

CRUZ, I. **A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa (Circular Técnica), n.90, 2007. 12p.

CTNBio. 2009. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos, milho MIR 162**. Parecer Técnico nº 2042/2009. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14056.html> (acesso em 10 janeiro de 2011).

ESPERK, T.; TAMMARU, T.; NYLIN, S. Intraspecific variability in number of larval instars in insects. **Journal of Economic Entomology**, v.100, n.3, p.627-645, 2007.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.93, p. 5389-5394, 1996.

FRANKENHUYZEN, K. VAN Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.101, p.1–16, 2009.

HUANG, F.; LEONARD, B. R.; WU, X. Resistance of sugarcane borer to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.124, p.117–123, 2007.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L.; HIGGINS, R. A. Larval feeding behavior of Dipel-resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis* on diet containing *Bacillus thuringiensis* (Dipel ESTM). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.98, p.141–148, 2001.

KELLER, M.; SNEH, B.; STRIZHOV, N.; PRUDOVSKY, E.; REGEV, A.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.365-373, 1996.

KENNEDY, G. G. Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. In: ROMEIS, J.; SHELTON, A. M.; KENNEDY, G. G. **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. Dordrecht: Springer, p.1-26, 2008. 441p.

KING, E. G.; HARTLEY, G. C. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R. F. (eds.) **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, p.265-270, 1985.

KURTZ, R. W.; MCCAFFERY, A.; O'REILLY, D. Insect resistance management for Syngenta's VipCot transgenic cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.95, p.227–230, 2007.

LEE, M. K.; MILES, P.; CHEN, J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.339, p.1043–1047,

2006.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.8, p. 4648–4657, 2003.

MARÇON, P. C. R. G.; YOUNG, L. J.; STEFFEY, K. L.; SIEGFRIED, B. D. Baseline susceptibility of european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.2, p.279-285, 1999.

MINITAB. **Statistical Software**. Minitab 15. State College, Pa, USA, 2007.

MORÉ, M.; TRUMPER, E. V.; PROLA, M. J. Influence of corn, *Zea mays*, phenological stages in *Diatraea saccharalis* F. (Lep. Crambidae) oviposition. **Journal of Applied Entomology**, v.127, p.512–515, 2003.

PARRA, J. R. P.; MILANO, P.; CÔNSOLI, F. L.; ZERIO, N. G.; HADDA, M. L. Efeito da nutrição de adultos e da umidade na fecundidade de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 1, p. 49-57, 1999.

PEAIRS, F. B.; SAUNDERS, J. L. *Diatraea lineolata* y *D. saccharalis*: una revision en relación con el maíz. **Agronomia Costarricense**, v.4, p.123-135, 1980.

PINTO, A. S.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos do milho e sorgo**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2004.

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

WU, X. Y.; HUANG, F.; LEONARD, B. R.; MOORE, S. H. Evaluation of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn hybrids against Cry1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, v.100, p.1880-1886, 2007.

WU, X.; HUANG, F.; LEONARD, B. R.; OTTEA, J. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, p.44–49, 2009.

YUE, B.; HUANG, F.; LEONARD, B. R.; MOORE, S.; PARKER, R.; ANDOW, D. A.; COOK, D.; EMFINGER, K.; LEE, D. R. Verifying an F1 screen for identification and quantification of rare *Bacillus thuringiensis* resistance alleles in field populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.129, p.172–180, 2008.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, v.21, n.12, 2003.

CAPÍTULO 3 – O PARASITÓIDE LARVAL *Cotesia flavipes* É AFETADO PELA PROTEÍNA Vip3Aa20?

RESUMO - O presente estudo teve o objetivo de avaliar como o parasitóide larval de *Diatraea saccharalis* (Fabricius), *Cotesia flavipes* (Cameron), é afetado pela exposição à proteína Vip3Aa20, originária da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner durante sua fase vegetativa de crescimento e transgenicamente expressa em plantas de milho. Parasitóides adultos foram alimentados com solução contendo a proteína em bioensaios de exposição direta. Na exposição indireta, larvas de *D. saccharalis* ingeriram a proteína e em seguida foram parasitadas. Nos bioensaios de exposição direta não foram observados efeitos significativos na longevidade dos adultos e nas características da prole produzida. Todavia, no bioensaio de exposição indireta foram observados efeitos negativos sobre o peso da massa de casulos e o peso dos parasitóides adultos, avaliando-se a prole desenvolvida nas larvas de *D. saccharalis* que ingeriram a proteína. Os resultados sugerem que os efeitos observados estão relacionados com a qualidade do hospedeiro como alimento para o parasitóide, e as implicações destes resultados são discutidas no contexto da utilização de plantas modificadas geneticamente.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, interações tritróficas, organismos não alvos, proteínas inseticidas, *Zea mays*

SUMMARY - This study aimed to assess how *Cotesia flavipes* (Cameron), 1891, a larval parasitoid of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), is affected by exposure to Vip3Aa20 protein, produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner during its vegetative growth and transgenically expressed in maize plants. Adult parasitoids were fed a solution containing the protein in tests of direct exposure. In the indirect exposure, larvae of *D. saccharalis* ingested protein and then were parasited. Direct exposure essays did not affect any of the parasitoid characteristics evaluated such as adult longevity and offspring fitness. However, for indirect exposure essay, the cocoon mass and adult parasitoid weights were negatively affected by the protein, evaluating the parasitoid offspring fitness developed into larvae of protein-fed *D. saccharalis*. The results suggest that the observed effects are related to host quality as food for the parasitoid, and the implications of these findings are discussed in the context of genetically modified plants.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, tritrophic interactions, nontarget organisms, insecticidal proteins, *Zea mays*

INTRODUÇÃO

O parasitóide *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) é um endoparasitóide larval cenobionte. Segundo BROUDEUR & BOIVIN (2004) parasitóides cenobiontes permitem ao seu hospedeiro a continuação do seu desenvolvimento, e estão estreitamente associados e fisiologicamente limitados pelo hospedeiro (CAMPOS-FARINHA & CHAUD-NETTO 2000). É um parasitóide micro-himenóptero, haplodiplóide, em que os machos são produzidos por partenogênese arrenótoca, ou seja, de ovos não fertilizados, enquanto as fêmeas originam-se de ovos fertilizados (NARANG et al. 1994). Este inseto apresenta ciclo de vida holometábolo com duração

média de 20 dias, dependendo da temperatura e da idade do hospedeiro (PÁDUA et al. 1994; CAMPOS-FARINHA 1996), parasitando larvas do hospedeiro a partir do terceiro instar (WIEDENMANN et al. 1992). A fase larval apresenta três instares, e ao atingir o final do terceiro instar, as larvas saem do hospedeiro para empupar, tecendo casulos para proteção das pupas e normalmente os indivíduos provenientes do mesmo hospedeiro se agrupam formando uma massa de casulos (BOTELHO & MACEDO 2002).

C. flavipes é um parasitóide originário da região indo-australiana que foi introduzido em diversas regiões do mundo para controlar larvas brocadoras do colmo de plantas da família Poaceae (milho, cana-de-açúcar, sorgo), sendo que parasita com sucesso larvas da espécie *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) (ALLEYNE & WIEDEMANN 2001). Foi introduzido no Brasil em 1974, sendo utilizado com grande sucesso em programas de controle biológico da broca-do-colmo, *D. saccharalis*, em lavouras de cana-de-açúcar (BOTELHO & MACEDO 2002).

A ocorrência de *D. saccharalis* em milho aumentou em importância nos últimos anos no Brasil (CRUZ 2007). Em outras regiões do mundo, importantes produtoras de milho, como os Estados Unidos da América e a Argentina, a broca-do-colmo é séria ameaça à produção do cereal (MORÉ et al. 2003; CASTRO et al. 2004; BALDWIN et al. 2006). A ampliação das áreas de cultivo com cana-de-açúcar, atualmente principal hospedeira da broca-do-colmo e a proximidade com áreas de milho, aumentam a probabilidade de maior ocorrência da praga nas lavouras de milho do Brasil. Em relação ao parasitismo por *C. flavipes*, SHAMI & MOYUDDIN (1992), verificaram que este parasitóide apresenta grande plasticidade, sendo capaz de mudar a preferência por hospedeiros criados em cana-de-açúcar e milho em poucas gerações.

A adoção do cultivo de plantas transgênicas aumenta ano a ano, tendo alcançado 134 milhões de hectares em 2009 (JAMES 2009). A resistência de plantas a insetos melhora a produção e diminui o uso de produtos fitossanitários para o controle das pragas (QUISENBERRY & CLEMENT 2002; CHAPOTIN & WOLT 2007). Todavia, as populações de insetos pragas podem desenvolver resistência às plantas modificadas (ANDOW, 2008) e a adoção de medidas que visem impedir ou retardar a evolução da

resistência devem ser empregadas (BATES et al. 2005). A associação entre plantas transgênicas e o controle biológico de pragas pode gerar resultados sinérgicos (BELL et al. 2001; POPPY & SUTHERLAND 2004; ROMEIS et al. 2006), mas é preciso primeiramente avaliar os efeitos das plantas modificadas e de suas proteínas expressas para o controle das pragas sobre os inimigos naturais e demais organismos não alvos (GROOT & DICKE 2002; ANDOW & HILBECK 2004; O'CALLAGHAN et al. 2005; ROMEIS et al. 2009).

Genes codificando a proteína inseticida Vip3Aa20 foram incorporados em plantas de milho e, no Brasil recentemente foi aprovada para comercialização a cultivar MIR 162 que expressa a proteína acima. Esta proteína é originária da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner e demonstrou ser altamente tóxica a *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), *O. nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Striacosta albicosta* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (CTNBio 2009).

Considerando essa nova cultivar de milho, o aumento da incidência de *D. saccharalis* nos cultivos de milho e a falta de informações sobre os efeitos em organismos não alvos de proteínas expressas transgênicamente em plantas, este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da proteína Vip3Aa20 sobre o parasitóide larval *C. flavipes*, importante agente de controle biológico da broca-do-colmo.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Os parasitóides *C. flavipes* e as brocas-do-colmo *D. saccharalis* utilizados nos bioensaios foram provenientes do laboratório de Controle Biológico da Usina São Martinho, Pradópolis-SP.

Proteína

A proteína em estudo, Vip3Aa20, foi fornecida pela empresa Syngenta Seeds na forma purificada (86,5% de pureza). Para a solubilização da proteína, utilizou-se a solução tampão 10 mM Tris-HCl, 0,4 mM EDTA, 0,1% Tween 20.

Exposição Direta

Foram conduzidos dois bioensaios para avaliar o efeito da exposição direta à proteína Vip3Aa20 sobre o parasitóide larval *C. flavipes*. No primeiro, foi fornecida a adultos do parasitóide solução de mel contendo a proteína via alimentação e avaliada a longevidade de machos e fêmeas. Adultos com até 6 horas de vida foram individualizados, acondicionados em tubos de bioensaio de fundo chato (2,5 cm de diâmetro x 8 cm de altura) e separados de acordo com o sexo. Os tubos foram fechados com filme plástico (cloreto de polivinila - PVC). O alimento foi fornecido diariamente por meio de uma gota de 3 μL da solução de mel e proteína colocada sobre uma tira de alumínio fixada na parte superior do tubo.

Todos os tratamentos contiveram a mesma quantidade de solução de mel e de solução tampão, variando apenas a concentração da proteína e a ausência da proteína na testemunha. A solução de mel foi preparada com 50% de mel e 50% de água destilada. Após a instalação do bioensaio, os parasitóides foram mantidos em estufa climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas).

O bioensaio foi delineado de forma inteiramente casualizada (DIC) com 5 tratamentos e 100 insetos (50 machos e 50 fêmeas) por tratamento, sendo que cada inseto representou uma repetição. As concentrações avaliadas foram: 0; 50; 100; 250 e 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ da proteína Vip3Aa20. Avaliações foram realizadas a cada 12 horas, registrando-se o número de insetos mortos. Para certificar que os parasitóides se alimentaram com a gota disponibilizada, adicionou-se mais um tratamento ao bioensaio

contendo um inseticida (fipronil) na solução alimentar. Utilizou-se fipronil na concentração de 0,024% (v/v), pois que apresenta pressão de vapor baixa, estando menos sujeito à volatilização (BCPC 1997).

No segundo bioensaio avaliou-se a influência da ingestão da proteína sobre aspectos reprodutivos do parasitóide. Insetos alimentados com solução contendo concentrações crescentes da proteína inseticida Vip3Aa20 foram avaliados quanto ao seu desempenho reprodutivo por meio do parasitismo em larvas de *D. saccharalis*. Adultos recém-emergidos de *C. flavipes* foram mantidos juntos em recipientes plásticos por um período de 24 horas em temperatura de $26\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas, para acasalamento e alimentação. O alimento contendo a proteína inseticida foi fornecido por meio de gotas colocadas sobre uma tira de alumínio de acordo com o tratamento. Acrescentou-se um tratamento com inseticida (fipronil) diluído em concentração de 0,024% (v/v) na solução alimentar, para certificar que os insetos se alimentaram com as soluções. Após 24 horas, fêmeas do parasitóide foram individualmente colocadas em contato com larvas de 5°. instar de *D. saccharalis* para oviposição. Foi permitida apenas uma oviposição por hospedeiro. As larvas de *D. saccharalis*, após a oviposição pelo parasitóide, foram alimentadas com dieta artificial e mantidas em placas de Petri em câmaras climatizadas ($26\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas). A dieta das larvas foi baseada em KING & HARTLEY (1985). Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 50 larvas parasitadas por tratamento, constituindo cada larva uma repetição. Os parâmetros avaliados foram: período ovo-larva; período pupal; número de adultos emergidos/hospedeiro; razão sexual (total de fêmeas/total de insetos); peso do parasitóide adulto; porcentagem de empupação e porcentagem de emergência dos adultos. Foram realizadas avaliações diárias para registrar os períodos de desenvolvimento. Após um dia da emergência, os adultos foram congelados para a posterior avaliação dos demais parâmetros. O peso do parasitóide adulto foi obtido pesando-se todos os indivíduos emergidos do mesmo hospedeiro para, posteriormente, obter-se o peso médio por parasitóide.

Exposição Indireta

Foram utilizadas larvas de *D. saccharalis* de 5º. instar, para as quais foi fornecida uma gota de 5 µL de solução contendo a proteína Vip3Aa20, corante Fluorella Blue (0,01%) e açúcar (10%) como fagoestimulante, conforme metodologia adaptada de HUGHES & WOOD (1981).

Larvas de *D. saccharalis* no quinto instar foram retiradas da dieta de alimentação e mantidas sem alimentação por um período de 24 horas, a fim de deixá-las propensas a se alimentar. Após esse período, foram disponibilizadas para as larvas, individualmente, gotas de solução com volume de 5 µL por meio de micropipeta, conforme as concentrações de proteína avaliadas, que foram: 0; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 µg.µL⁻¹ da proteína Vip3Aa20. Para cada concentração, avaliou-se o parasitismo de 50 larvas de *D. saccharalis* por *C. flavipes*.

Após ingerirem a gota de solução, as larvas foram dispostas individualmente em placas de Petri, alimentadas com dieta artificial e mantidas em estufa climatizada (26±1°C e fotofase de 12 horas) por um período de 24 horas. Passado esse período, realizou-se a exposição ao parasitóide *C. flavipes* para oviposição, permitindo-se apenas uma oviposição em cada larva e por fêmeas diferentes. Após a oviposição, as larvas foram retornadas às placas de Petri e mantidas em estufa nas mesmas condições anteriores.

Observações diárias foram realizadas para registrar o desenvolvimento dos parasitóides, avaliando-se o período ovo-larva, o peso da massa de casulos, o período pupal, a porcentagem de empupação e de emergência do parasitóide, a emergência de adultos por larva do hospedeiro, a razão sexual e o peso do parasitóide adulto.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de regressão linear com auxílio do

programa estatístico Minitab 15 (MINITAB 2007). Adotou-se como nível de significância 5 % de probabilidade. Em todas as comparações da razão sexual (efeito direto e indireto), as repetições que apresentavam apenas machos (indicando que a fêmea parental não havia acasalado) foram desconsideradas para as análises.

RESULTADOS

Exposição direta – longevidade de adultos e desempenho reprodutivo

Nos dos dois bioensaios conduzidos para avaliar o efeito da exposição direta via alimentação sobre *C. flavipes* não houve interação significativa entre as concentrações da proteína e os parâmetros avaliados. Tanto a longevidade de adultos como o desempenho reprodutivo de *C. flavipes* não foram afetados pela ingestão da proteína Vip3Aa20 pelos insetos (Tabela 1).

A longevidade de adultos não foi afetada pela ingestão da proteína Vip3Aa20, tanto para machos (GL = 1, 246; F = 1,277; P = 0,259) como para fêmeas (GL = 1, 241; F = 1,780; P = 0,183). A idade média dos machos adultos variou entre 3,15 e 3,89 dias enquanto que para as fêmeas variou entre 2,79 e 3,50 dias. Os resultados das análises de regressão para o bioensaio de desempenho reprodutivo são a seguir relacionados: período ovo-larva (GL = 1, 233; F = 1,699; P = 0,194), período pupal (GL = 1, 232; F = 2,813; P = 0,095), número de parasitóides por lagarta (GL = 1, 232; F = 0,000; P = 0,984), razão sexual (GL = 1, 209; F = 3,294; P = 0,709), porcentagem de empupação (GL = 1, 232; F = 0,259; P = 0,612), porcentagem de emergência de adultos (GL = 1, 232; F = 0,253; P = 0,615), peso do parasitóide adulto (GL = 1, 232; F = 3,405; P = 0,066).

Tabela 1. Longevidade de adultos, duração dos períodos ovo-larva e pupal, número de parasitóides emergidos por larva, razão sexual, porcentagem de empupação e emergência de adultos e peso de adultos de *Cotesia flavipes* em avaliações da exposição direta à proteína Vip3Aa20 via ingestão. Média ± erro padrão da média; (n) = número de repetições.

	Concentração proteína ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					Significância	Equação da reta
	0	50	100	250	500		
Longevidade de machos (dias)	3,74 ± 0,19 (50)	3,76 ± 0,23 (50)	3,15 ± 0,14 (49)	3,89 ± 0,20 (50)	3,84 ± 0,17 (49)	NS	$y = 0,0005x + 3,582$
Longevidade de fêmeas (dias)	2,92 ± 0,19 (46)	3,48 ± 0,26 (50)	2,79 ± 0,26 (50)	3,17 ± 0,26 (49)	3,50 ± 0,28 (48)	NS	$y = 0,0008x + 3,022$
Período ovo-larva (dias)	11,12 ± 0,06 (48)	11,04 ± 0,04 (49)	10,93 ± 0,06 (46)	11,00 ± 0,06 (47)	10,98 ± 0,06 (46)	NS	$y = -0,0002x + 11,050$
Período pupal (dias)	6,00 ± 0,03 (48)	5,86 ± 0,05 (49)	5,85 ± 0,06 (46)	5,76 ± 0,06 (46)	5,84 ± 0,05 (45)	NS	$y = -0,0002x + 5,903$
Parasitóides/larva	59,60 ± 2,36 (48)	66,10 ± 1,70 (49)	70,56 ± 2,28 (46)	65,43 ± 2,76 (46)	63,51 ± 2,82 (45)	NS	$y = -0,0001x + 65,038$
Razão sexual	0,70 ± 0,05 (37)	0,70 ± 0,04 (44)	0,77 ± 0,03 (46)	0,60 ± 0,05 (41)	0,64 ± 0,05 (43)	NS	$y = -0,0002x + 0,722$
Empupação (%)	99,65 ± 0,11 (48)	99,31 ± 0,20 (49)	99,52 ± 0,19 (46)	99,54 ± 0,16 (46)	99,62 ± 0,23 (45)	NS	$y = 0,0002x + 99,485$
Emergência adultos (%)	99,6 ± 0,15 (48)	99,39 ± 0,21 (49)	98,68 ± 0,48 (46)	97,52 ± 1,50 (46)	99,31 ± 0,29 (45)	NS	$y = -0,0009x + 99,070$
Peso adulto (mg)	0,38 ± 0,02 (48)	0,32 ± 0,01 (49)	0,31 ± 0,02 (46)	0,34 ± 0,03 (46)	0,30 ± 0,02 (45)	NS	$y = -0,00003x + 0,346$

NS – Não significativo

Exposição indireta

Quando se avaliou o efeito da proteína Vip3Aa20 sobre *C. flavipes* através do parasitismo em larvas de *D. saccharalis* que ingeriram a proteína, observou-se efeito significativo no peso da massa de casulos (GL = 1, 207; F = 11,01; P = 0,001) e peso de adultos (GL = 1, 205; F = 12,17; P = 0,001). Ambas as características foram negativamente afetadas pela proteína ingerida pelo hospedeiro. O peso da massa de casulos foi de $51,36 \pm 2,12$ mg na testemunha e de $39,88 \pm 2,68$ mg na maior concentração avaliada ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Tabela 2). O peso do parasitóide adulto variou de $0,35 \pm 0,03$ mg na testemunha a $0,27 \pm 0,02$ mg na maior concentração (Tabela 2). As características período ovo-larva (GL = 1, 209; F = 0,29; P = 0,593), período pupal (GL = 1, 205; F = 3,83; P = 0,052), número de parasitóides adultos emergidos por larva do hospedeiro (GL = 1, 206; F = 2,16; P = 0,143), porcentagem de empupação (GL = 1, 209; F = 0,25; P = 0,619), porcentagem de emergência de adultos (GL = 1, 207; F = 0,72; P = 0,397) e razão sexual (GL = 1, 165; F = 0,41; P = 0,525) não apresentaram relação significativa com as concentrações avaliadas da proteína Vip3Aa20 (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados do bioensaio de exposição indireta para duração dos períodos ovo-larva e pupal, peso da massa de casulos, número de parasitóides emergidos por larva, razão sexual, porcentagem de empupação e emergência de adultos e peso de adultos de *Cotesia flavipes* em avaliações da exposição indireta à proteína Vip3Aa20 via hospedeiro (*Diatraea saccharalis*). Média \pm erro padrão da média; (n) = número de repetições.

	Concentração proteína ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)					Significância	Equação da reta
	0	0,125	0,25	0,5	1		
Período ovo-larva (dias)	11,08 \pm 0,06 (48)	11,28 \pm 0,11 (47)	11,28 \pm 0,10 (47)	11,24 \pm 0,09 (37)	11,22 \pm 0,10 (32)	NS	$y = 0,066x + 11,197$
Massa de casulos (mg)	51,36 \pm 2,12 (48)	46,06 \pm 2,06 (47)	44,54 \pm 2,15 (47)	42,32 \pm 2,54 (36)	39,88 \pm 2,68 (31)	**	$y = -10,297x + 48,658$
Período pupal (dias)	5,90 \pm 0,05 (48)	5,94 \pm 0,05 (47)	5,98 \pm 0,06 (47)	5,68 \pm 0,08 (34)	5,81 \pm 0,10 (31)	NS	$y = -0,174x + 5,929$
Parasitóides/larva	60,19 \pm 3,87 (48)	53,87 \pm 2,69 (47)	50,40 \pm 2,54 (47)	55,65 \pm 2,93 (34)	50,66 \pm 3,53 (32)	NS	$y = -6,340x + 56,372$
Razão sexual	0,69 \pm 0,05 (42)	0,79 \pm 0,04 (41)	0,78 \pm 0,04 (36)	0,66 \pm 0,07 (24)	0,70 \pm 0,06 (24)	NS	$y = -0,030x + 0,735$
Empupação (%)	95,16 \pm 1,56 (48)	97,48 \pm 0,62 (47)	96,75 \pm 1,01 (47)	93,30 \pm 3,34 (37)	95,58 \pm 3,13 (32)	NS	$y = -1,316x + 96,194$
Emergência adultos (%)	91,26 \pm 1,92 (48)	92,36 \pm 1,75 (47)	93,65 \pm 1,29 (47)	86,71 \pm 3,94 (36)	90,74 \pm 2,27 (31)	NS	$y = -2,607x + 92,014$
Peso adulto (mg)	0,35 \pm 0,03 (48)	0,33 \pm 0,01 (47)	0,32 \pm 0,01 (47)	0,28 \pm 0,01 (34)	0,27 \pm 0,02 (31)	**	$y = -0,084x + 0,344$

NS – não significativo, ** - $P < 0,01$

DISCUSSÃO

Quando se analisa a exposição direta de *C. flavipes* à proteína Vip3Aa20 através da ingestão via alimentação, observa-se que não há nenhum efeito sobre as características avaliadas tanto na longevidade de adultos como no desempenho reprodutivo pela prole produzida por insetos que ingeriram a proteína. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por LIU et al. (2005) quando alimentaram adultos de *Microplitis mediator* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) com a proteína Cry1Ac. Neste estudo, a longevidade de adultos do parasitóide e a maioria das características da prole não foram afetadas pela proteína até a concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todavia, os autores observaram efeito sobre o período ovo e larva, aumentando na proteína em relação à testemunha. Diferentemente dos resultados obtidos presentemente, BELL et al. (2004) avaliando a toxicidade oral das proteínas GNA ('*Galanthus nivalis* agglutinin') e Con A ('Concanavalin agglutinin') e do inibidor de tripsina CpTI para o parasitóide *Eulophus pennicornis* (Nees) (Hymenoptera: Eulophidae) observaram efeitos negativos sobre a longevidade e parâmetros da progênie de adultos alimentados com solução contendo as proteínas. Esses resultados distintos podem estar relacionados com o modo de ação das proteínas estudadas. As proteínas avaliadas por BELL et al. (2004) foram originárias de plantas e estavam associadas com a resistência das plantas ao ataque dos insetos. Por outro lado, as proteínas Vip e Cry são oriundas da bactéria *B. thuringiensis* e apresentam ação inseticida a uma ampla gama de insetos. A primeira é produzida pela bactéria na sua fase vegetativa de crescimento enquanto que a segunda é produzida na fase de esporulação da bactéria e as proteínas são envoltas por um envelope formando cristais (SCHNEPF et al. 1998; DE MAAGD et al. 2003). Todavia, já foi demonstrado que o modo de ação não é igual para as duas proteínas podendo levar a resultados diferentes em relação à especificidade de ação da proteína (LEE et al. 2003; LEE et al. 2006; BRAVO et al. 2007; ABDELKEFI-MESRATI et al. 2009).

Os resultados observados no bioensaio de exposição indireta da proteína inseticida Vip3Aa20, ao parasitóide larval *C. flavipes* se desenvolvendo em larvas de *D.*

saccharalis que ingeriram a proteína, apresentaram efeito significativo em algumas características avaliadas. Como as larvas do hospedeiro se mostraram suscetíveis à proteína, constatado pela mortalidade de larvas e prolongamento da fase de desenvolvimento, provavelmente os efeitos negativos observados estão relacionados com a qualidade do hospedeiro como alimento para o parasitóide, semelhante ao que foi observado em outros estudos avaliando a interação entre proteínas e parasitóides através do hospedeiro (BAUER & BOETHEL 2003; PRÜTZ & DETTNER 2004; LIU et al. 2005; VOJTECH et al. 2005; RAMIREZ-ROMERO et al. 2007; WALKER et al. 2007; CHEN et al. 2008). Quando se avaliou a interação entre proteínas e parasitóides utilizando-se hospedeiros resistentes às proteínas, não mais se observou efeito sobre os parasitóides (SCHULER et al. 2004; CHEN et al. 2008). Esses resultados sugerem que os efeitos significativos observados em *C. flavipes* parasitando larvas de *D. saccharalis* que ingeriram a proteína Vip3Aa20 são devidos ao efeito da proteína sobre o hospedeiro e, portanto, afetaram de forma indireta as características do parasitóide.

WALKER et al. (2007) demonstraram que dieta com reduzidos teores de nutrientes teve efeito relativamente maior que a adição da proteína Cry1Ac sobre a sobrevivência de *Cotesia kazak* (Telenga) (Hymenoptera: Braconidae) e *Meteorus pulchricornis* (Wesmael) (Hymenoptera: Braconidae) se desenvolvendo em larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Estes resultados indicam que hospedeiros com restrições nutricionais quando usados como alimento por parasitóides influenciam as características do parasitismo. A interação pode envolver o primeiro nível trófico, considerando a qualidade da planta que o herbívoro consome e influenciando o desempenho do parasitóide (SARFRAZ et al. 2009). Todavia, apesar de existir relação entre a qualidade do hospedeiro como alimento e o desempenho do parasitóide, não há uma relação direta entre o tamanho do hospedeiro e a sua qualidade como alimento (SEQUEIRA & MACKAUER 1992; HÄCKERMANN et al. 2007).

No bioensaio para avaliar a exposição indireta, a massa dos casulos e o peso do parasitóide adulto foram afetados significativamente, resultando na produção de parasitóides com menor peso, considerando tanto os casulos como os adultos. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por PRÜTZ & DETTNER (2004) que

observaram diminuição do peso de pupas e de adultos quando *C. flavipes* parasitou larvas de *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Crambidae) alimentadas com milho expressando a proteína Cry1A(b). Para o peso da massa de casulos, os valores obtidos variaram entre $51,36 \pm 2,12$ mg a $39,88 \pm 2,68$ mg (testemunha e maior concentração, respectivamente). De modo geral esses valores foram inferiores aos obtidos por BOIÇA Jr et al. (1997) que observaram valores de $65,7 \pm 2,04$ mg e $66,4 \pm 2,14$ mg avaliando o efeito sobre *C. flavipes* de cultivares de cana-de-açúcar como alimento para *D. saccharalis*, e essa diferença pode ser devida às linhagens do parasitóide utilizadas. Em relação ao peso do parasitóide adulto, PRÜTZ & DETTNER (2004) também observaram diminuição quando os hospedeiros consumiram milho expressando a proteína Cry1A(b).

De forma geral, mesmo havendo efeito significativo observado quando os parasitóides se desenvolveram em larvas que consumiram a proteína Vip3Aa20, evidenciando o efeito mediado pela qualidade do hospedeiro, a redução em termos de magnitude não foi tão drástica quanto pode ocorrer quando se utilizam produtos fitossanitários convencionais para controlar as populações de insetos pragas. RAMIREZ-ROMERO et al. (2005), por exemplo, conduziram estudos comparativos entre produtos convencionais (imidacloprid e deltametrina) e a proteína Cry1Ab sobre os efeitos em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) concluindo que os inseticidas sintéticos convencionais apresentam maior risco às abelhas que a proteína Cry1Ab. Esse é um importante aspecto para se discutir quando da adoção do cultivo de plantas transgênicas e normalmente tem levado à conclusão de que estas são ambientalmente mais seguras e menos impactantes para a fauna nos agroecossistemas em geral, e especificamente para os inimigos naturais que exercem importante papel na regulação de insetos herbívoros, sejam eles pragas primárias ou secundárias, quando comparados aos produtos fitossanitários convencionais (SHELTON et al. 2002; CONNER et al. 2003; ROMEIS et al. 2006; KUMAR et al. 2008), além dos benefícios econômicos com a diminuição na aplicação dos produtos fitossanitários e o aumento na produção agrícola (BROOKES & BARFOOT 2009; BROOKES & BARFOOT 2010).

CONCLUSÃO

A exposição direta do parasitóide *C. flavipes* à proteína Vip3Aa20 não afetou as características da prole e a longevidade dos adultos que ingeriram a proteína, enquanto que a exposição indireta via hospedeiro apresentou efeito negativo sobre as características peso das massas de casulo e do parasitóide adulto. Esses efeitos podem ser associados ao efeito indireto via hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ABDELKEFI-MESRATI, L.; ROUIS, S.; SELLAMI, S.; JAOUA, S. *Prays oleae* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3LB differs from that of Cry1Ac toxin. **Molecular Biotechnology**, v. 43, p. 15-19, 2009.

ALLEYNE, M.; WIEDENMANN, R.N. Suitability of lepidopteran stemborers for parasitization by novel-association endoparasitoids. **BioControl**, v.46, p.1–23, 2001.

ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 142-199, 2001.

ANDOW, D. A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, v. 54, n. 7, p. 637-649, 2004.

BALDWIN, J.; HUANG, F.; LEONARD, B. R. **Corn borer pests in Louisiana corn**. LSU Baton Rouge, LA, USA, Louisiana State University AgCenter, AgCenter Research and Extension Publication 2947, 2006. 4p.

BATES, S. L.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 57-62, 2005.

BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J. Effect of Bt-cotton expressing Cry1A(c) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. **Biological Control**, v. 26, p. 325-332, 2003.

BCPC. The British Crop Protection Council. **The Pesticide Manual: A world compendium: fipronil**. 11th ed. Hampshire: TomLin, p. 545-546, 1997.

BELL, H. A.; KIRKBRIDE-SMITH, A. E.; MARRIS, G. C.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, A. M. R. Oral toxicity and impact on fecundity of three insecticidal proteins on the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v. 6, p. 215-222, 2004.

BELL, H. A.; FITCHES, E. C.; MARRIS, G. C.; BELL, J.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Transgenic GNA expressing potato plants augment the beneficial biocontrol of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera; Noctuidae) by the parasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera; Eulophidae). **Transgenic Research**, v. 10, p. 35-42, 2001.

BOIÇA Jr., A. L.; LARA, F. M.; BELLODI, M. P. Influência de variedades de cana-de-açúcar, incorporadas em dieta artificial, no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e no seu parasitismo por *Cotesia flavipes* (Cam.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 3, p. 537-542, 1997.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (eds.) **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p. 477-494. 635p.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.

BRODEUR, J.; BOIVIN, G. Functional ecology of immature parasitoids. **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 27-49, 2004.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: environmental effects, 1996-2008. **AgBioForum**, v. 13, n. 1, p. 76-94, 2010.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: income and production effects, 1996-2007. **AgBioForum**, v. 12, n. 2, p. 184-208, 2009.

CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). 1996. 97 f. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

CAMPOS-FARINHA, A. E. C.; CHAUD-NETTO, J. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) V. Avaliação do número de posturas, prole e razão sexual do parasitóide em relação ao tamanho do hospedeiro *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 249-252, 2000.

CASTRO, B. A.; RILEY, T. J.; LEONARD, B. R.; BALDWIN, J. Borers galore: emerging pest in Louisiana corn, grain sorghum and rice. **Louisiana Agriculture**, v. 47, p. 4-6, 2004.

CHAPOTIN, S. M.; WOLT, J. D. Genetically modified crops for the bioeconomy: meeting public and regulatory expectations. **Transgenic Research**, v. 16, p. 675–688, 2007.

CHEN, M.; ZHAO, J. Z.; COLLINS, H. L.; EARLE, E. D.; CAO, J.; SHELTON, A. M. A Critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, e2284, p. 1-7, 2008.

CONNER, A. J.; GLARE, T. R.; NAP, J. P. The release of genetically modified crops into the environment Part II. Overview of ecological risk assessment. **The Plant Journal**, v. 33, p. 19-46, 2003.

CRUZ, I. **A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa (Circular Técnica), n. 90, 2007. 12p.

CTNBio. 2009. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos, milho MIR 162**. Parecer Técnico nº 2042/2009. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14056.html> (acesso em 10 janeiro de 2011).

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming

entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 409-33, 2003.

GROOT, A. T.; DICKE, M. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. **The Plant Journal**, v. 31, p. 387-406, 2002.

HÄCKERMANN, J.; ROTT, A. S.; DORN, S. How two different host species influence the performance of a gregarious parasitoid: host size is not equal to host quality. **Journal of Animal Ecology**, v. 76, p. 376-383, 2007.

HUGUES, P. R.; WOOD, H. A. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 154-159, 1981.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009**. Ithaca, NY: ISAAA, n. 41, 2009.

KING, E. G.; HARTLEY, G. C. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R. F. (eds.) **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, p. 265-270, 1985.

KUMAR, S.; CHANDRA, A.; PANDEY, K. C. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: An environment friendly insect-pest management strategy. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 5, p. 641-653, 2008.

LEE, M. K.; MILES, P.; CHEN, J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, p. 1043-1047, 2006.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4648-4657, 2003.

LIU, X. X.; ZHANG, Q. W.; ZHAO, J. Z.; LI, J. C.; XU, B. L.; MA, X. M. Effects of Bt transgenic cotton lines on the cotton bollworm parasitoid *Microplitis mediator* in the laboratory. **Biological Control**, v. 35, p. 134-141, 2005.

MINITAB. **Statistical Software. Minitab 15.** State College, Pa, USA, 2007.

MORÉ, M.; TRUMPER, E. V.; PROLA, M. J. Influence of corn, *Zea mays*, phenological stages in *Diatraea saccharalis* F. (Lep. Crambidae) oviposition. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 512-515, 2003.

NARANG, S. K.; BARTLETT, A. C.; FAUST, R. M. **Applications of genetics to arthropods of biological control significance.** Boca Raton: CRC Press, 1994. 199p.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 271-292, 2005.

PÁDUA, L. E. M.; PARRA, J. R. P.; HADDAD, M. L. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na biologia de *Cotesia flavipes* (Cameron). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, p. 105-114, 1994.

POPPY, G. M.; SUTHERLAND, J. P. Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. **Physiological Entomology**, v. 29, p. 257-268, 2004.

PRÜTZ, G.; DETTNER, K. Effect of Bt corn leaf suspension on food consumption by *Chilo partellus* and life history parameters of its parasitoid *Cotesia flavipes* under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 111, p. 179-187, 2004.

QUISENBERRY, S. S.; CLEMENT, S. L. Conservation and use of global plant genetic resources for insect resistance. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 53, p. 865-872, 2002.

RAMIREZ-ROMERO, R.; BERNAL, J. S.; CHAUFAUXC, J.; KAISER, L. Impact assessment of Bt-maize on a moth parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), via host exposure to purified Cry1Ab protein or Bt-plants. **Crop Protection**, v. 26, p. 953-962, 2007.

RAMIREZ-ROMERO, R.; CHAUFAX, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie**, v. 36, p. 601-611, 2005.

ROMEIS, J.; LAWO, N. C.; RAYBOULD, A. Making effective use of existing data for case-by-case risk assessments of genetically engineered crops. **Journal of Applied Entomology**, v. 133, p. 571-583, 2009.

ROMEIS, J.; MEISSE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 63-71, 2006.

SARFRAZ, M.; DOSDALL, L. M.; KEDDIE, B. A. Host plant nutritional quality affects the performance of the parasitoid *Diadegma insulare*. **Biological Control**, v. 51, n. 1, p. 34-41, 2009.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SCHULER, T. H.; DENHOLMA, I.; CLARK, S. J.; STEWART, C. N.; POPPY, G. M. Effects of Bt plants on the development and survival of the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) insusceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 435-443, 2004.

SEQUEIRA, R.; MACKAUER, M. Nutritional ecology of an insect host-parasitoid association: The pea aphid-*Aphidius ervi* system. **Ecology**, v. 73, n. 1, p. 183-189, 1992.

SHAMI S.; MOHYUDDIN A. I. Studies on host plant preference of *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) an important parasitoid of graminaceous stalk borers. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 24, p. 313-316, 1992.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 845-881, 2002.

VOJTECH, E.; MEISSE, M.; POPPY, G. M. Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). **Transgenic Research**, v. 14, p. 133-144, 2005.

WALKER, G. P.; CAMERON, P. J.; MACDONALD, F. M.; MADHUSUDHAN, V. V.; WALLACE, A. R. Impacts of *Bacillus thuringiensis* toxins on parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 40, p. 142-151, 2007.

WIEDENMANN, R. N.; SMITH JR., J. W.; DARNELL, P. O. Laboratory rearing and biology of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) using *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) as a host. **Environmental Entomology**, v. 21, p.1160-1167, 1992.

CAPÍTULO 4: AVALIANDO O EFEITO DE UMA PROTEÍNA Bt SOBRE UM PARASITÓIDE DE OVOS: ESTUDO DE CASO DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA Vip3Aa20 E O PARASITÓIDE *Trichogramma galloi* ZUCCHI (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

RESUMO - A interação de proteínas expressas em plantas transgênicas e parasitóides de ovos é pouco estudada em comparação aos estudos com parasitóides de larvas e outros organismos não alvos, como predadores e polinizadores. De modo geral, espera-se que os parasitóides de ovo sejam menos afetados pelas proteínas expressas em plantas transgênicas do que os outros grupos de organismos. Mesmo assim, eles estão expostos por diversas vias ao contato com as proteínas e estudos para determinar possíveis efeitos sobre eles são necessários em avaliações de risco para organismos geneticamente modificados. Desta forma, o presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da proteína Vip3Aa30, originária da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, através da exposição direta e indireta via hospedeiro sobre o parasitóide *Trichogramma galloi* Zucchi e utilizando como hospedeiro a broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius). Os resultados indicam que não há efeito da proteína sobre as características do parasitóide seja quando o adulto ingere a proteína através de solução alimentar seja quando se avalia o parasitismo em ovos do hospedeiro que ingeriu a proteína na fase larval. As implicações destes resultados para a avaliação de risco são discutidas.

Palavras-chave: avaliação de risco, *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, organismos não alvos, proteína inseticida vegetativa

SUMMARY - The interaction between proteins expressed in transgenic plants and egg parasitoids has been little studied in comparison to studies with larval parasitoids and other non-target organisms such as pollinators and predators. In general, it is expected that egg parasitoids are less affected by the proteins expressed by transgenic plants than other groups of organisms. Despite that, they are exposed to proteins through several exposure routes and studies to determine the possible effects are needed in risk assessment analysis for genetically modified organisms. Thus, this study aimed to evaluate the effects of protein Vip3Aa30 originating from the bacterium *Bacillus thuringiensis* on the parasitoid *Trichogramma galloi* Zucchi through direct and indirect exposure via the host *Diatraea saccharalis* (Fabricius). The results indicate no effect of protein on the characteristics of the parasitoid when the adult ingests the protein solution through food or evaluating parasitism in host eggs that ingested protein in the larval stage. The implications of these results for risk assessment are discussed.

Keywords: risk assessment, *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, nontarget organisms, vegetative insecticidal protein

INTRODUÇÃO

De acordo com JAMES (2009), o cultivo de variedades transgênicas ou biotecnológicas apresentou crescimento anual desde o início de seu cultivo, aumentando cerca de 7% ao ano em área cultivada, alcançando 134 milhões de hectares em 2009. As culturas biotecnológicas contribuem para o aumento da produção global de quatro principais culturas adicionando, por exemplo, 62 e 68 milhões de toneladas à produção global de milho e soja, respectivamente (BROOKES & BARFOOT 2009). Apesar do evidente sucesso das culturas transgênicas, há uma série de

preocupações em relação à biossegurança dos cultivos biotecnológicos, principalmente relacionados com a “invasão” do ambiente pelas plantas modificadas (DUKE & CERDEIRA 2005; McNEELY 2005), a transferência horizontal e vertical de genes no ambiente (NIELSEN 2003; WILKINSON & FORD 2007), efeito sobre espécies não alvo (O'CALLAGHAN et al. 2005; ARPAIA, 2010) e desenvolvimento de resistência dos organismos contra a característica expressada pelas plantas (CONNER et al. 2003; ANDOW, 2008).

A avaliação de risco para organismos geneticamente modificados (OGM) fundamenta as decisões regulatórias sobre a liberação, por exemplo, de plantas OGM para cultivo comercial, sendo que as informações são sistematicamente adquiridas com o propósito de avaliar o potencial que uma característica GM tem de causar dano, a probabilidade e as consequências se o dano efetivamente ocorrer (GARCIA-ALONSO et al. 2006). De forma geral, há consenso de que a avaliação de risco deve ser cientificamente embasada, ser conduzida caso a caso, ao invés de generalizar os resultados, e deve considerar o gene transferido, o organismo e o ambiente no qual se pretende cultivá-lo (ANDOW & HILBECK 2004).

Pesquisadores envolvidos num projeto internacional desenvolveram uma 'abordagem representativa do ecossistema' para a seleção de espécies e sua função no ecossistema como foco de bioensaios complementares para a avaliação de risco sobre organismos não alvos (BIRCH et al 2004; ANDOW et al 2006). BIRCH et al. (2004) sugeriram diversas vias de exposição a proteínas para artrópodes num agroecossistema com cultivo de milho, e considerando *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae), os autores sugerem que a exposição é condicional a determinados fatores podendo ocorrer se a proteína Bt estiver presente no pólen, no floema ou *honeydew*, em fluidos da gutação, ou através dos ovos de lepidópteros.

Sabe-se que alguns insetos armazenam em seus ovos compostos que não possuem valor nutricional para o embrião (EISNER et al. 2002) e que estes compostos podem apresentar função defensiva contra predadores e parasitóides (BLUM & HILKER, 2002). Apesar destas considerações, faltam estudos avaliando a probabilidade de transferência de proteínas expressas transgenicamente em plantas para os ovos, as

potenciais mudanças na qualidade dos ovos como fonte alimentar para outros organismos e as interações entre plantas transgênicas e suas proteínas, ovos dos insetos que ingeriram as proteínas e organismos não alvos, principalmente predadores e parasitóides. Segundo BERNAL (2010), a falta de estudos sobre a interação entre plantas GM e parasitóides de ovos reflete a baixa expectativa de que a qualidade dos ovos para os parasitóides seja afetada e também a provável ausência das proteínas nos ovos hospedeiros, embora de acordo com o autor este fato não parece ter sido investigado.

Trichogramma spp. são diminutos parasitóides amplamente utilizados como agentes de controle biológico em diversas culturas para controlar várias espécies de lepidópteros-pragas (ZUCCHI et al. 1991; LI 1994; SMITH 1996; PARRA & ZUCCHI 2004). Ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) são parasitados por *Trichogramma galloi* Zucchi (ZUCCHI et al. 1991; PRATISSOLI et al., 2004; PERREIRA-BARROS et al. 2005), sendo que este parasitóide pode ser utilizado em associação ou não com o parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) para controlar as populações de *D. saccharalis* (BOTELHO et al. 1995; BOTELHO et al. 1999; PINTO et al. 2003; BROGLIO-MICHELETTI et al. 2007). Por ser parasitóide de ovos apresenta a vantagem de controlar a praga antes que ocasione injúrias às plantas, pois mata o embrião e impede a eclosão das larvas (BOTELHO et al. 1995). Embora atualmente *D. saccharalis* seja considerada uma das principais pragas na cultura da cana-de-açúcar, sua incidência e importância na cultura do milho aumentou nos últimos anos (CRUZ 2007) e em outros países importantes produtores de milho, como os Estados Unidos da América e a Argentina, é uma praga limitante na produção do cereal (MORÉ et al. 2003; CASTRO et al. 2004; BALDWIN et al. 2006).

A área de plantio de cultivares de milho com características biotecnológicas representou mais de um quarto (26%) dos 158 milhões de hectares cultivados mundialmente com plantas transgênicas no ano de 2009 (JAMES 2009). A inserção de genes oriundos da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner que expressam proteínas com ação inseticida é uma das principais características do milho biotecnológico. Cultivares

de milho expressando a proteína Vip3Aa20 estão atualmente disponíveis para cultivo nas principais áreas produtoras do mundo, sendo que esta proteína apresenta alta toxicidade a *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), *O. nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Striacosta albicosta* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (CTNBio 2009).

Considerando a falta de informações sobre as interações de proteínas expressas em plantas transgênicas e parasitóides de ovos, a ocorrência de *D. saccharalis* na cultura do milho e as novas cultivares de milho expressando proteínas inseticidas, este trabalho teve o objetivo de avaliar a exposição direta e indireta de *T. galloi* à proteína Vip3Aa20, utilizando-se ovos de *D. saccharalis* como hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Os parasitóides *T. galloi* foram obtidos na empresa Biocontrol de Sertãozinho-SP e as brocas-do-colmo *D. saccharalis* foram provenientes do laboratório de Controle Biológico da Usina São Martinho/Pradópolis-SP.

Proteína

A proteína em estudo, Vip3Aa20, foi fornecida pela empresa Syngenta Seeds na forma purificada (86,5% de pureza). Para a solubilização da proteína, utilizou-se a solução tampão 10 mM Tris-HCl, 0,4 mM EDTA, 0,1% Tween 20.

Exposição Direta

Conduziram-se dois ensaios para avaliar a exposição direta de *T. galloi* à

proteína Vip3Aa20: longevidade de adultos e características da prole de adultos que ingeriram a proteína via solução alimentar.

Adultos de *T. galloi* com até 12 horas de vida, num total de 100 para cada tratamento, foram individualizados em tubos de bioensaio de fundo chato com 2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento, sendo-lhes fornecido alimento contendo a proteína. Os tubos foram fechados com filme plástico (cloreto de polivinila - PVC). O alimento foi fornecido diariamente por meio de uma gota de 3 μL da solução de mel e proteína colocada sobre uma tira de alumínio fixada na parte superior do tubo com auxílio do filme plástico. Todos os tratamentos contiveram a mesma quantidade de solução de mel e de solução tampão, variando apenas a concentração da proteína. A solução de mel foi preparada com 50% de mel e 50% de água destilada. Após a instalação do bioensaio, os parasitóides foram mantidos em estufa climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas). O bioensaio foi conduzido de forma inteiramente casualizada (DIC) com 5 tratamentos e 100 adultos por tratamento e, após a morte, os insetos foram separados por gênero sexual para determinar a longevidade de machos e fêmeas. As concentrações avaliadas foram: 0; 50; 100; 250 e 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de Vip3Aa20. Foram realizadas avaliações a cada 12 horas, registrando-se o número de insetos mortos. Para certificar que os parasitóides se alimentaram com a gota disponibilizada, adicionou-se mais um tratamento ao bioensaio contendo um inseticida (fipronil) na solução alimentar. Utilizou-se fipronil na concentração de 0,024% (v/v) pois apresenta baixa pressão de vapor, estando menos sujeito à volatilização (BCPC 1997).

Na avaliação do desempenho reprodutivo de indivíduos expostos à proteína pela quantificação das características da prole, fêmeas do parasitóide foram individualizadas em tubos de ensaio, após 24 horas de acasalamento e exposição à proteína via alimentação. Em seguida, foram oferecidas posturas de *D. saccharalis* com menos de 24 horas às fêmeas de *T. galloi* para que fossem parasitadas. As posturas permaneceram disponíveis por um período de 24 horas. Foi disponibilizada alimentação para as fêmeas durante o período de parasitismo através de uma gota de solução de mel mais proteína, colocada sobre uma lâmina de alumínio, conforme cada tratamento. Após a retirada das fêmeas, as posturas permaneceram no tubo de ensaio, sendo

mantidas em estufa climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas). Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos e 50 fêmeas por tratamento. Os parâmetros avaliados para a prole de *T. galloi* foram: período ovo-adulto; número de ovos parasitados/fêmea; porcentagem de emergência de adultos; número de adultos emergidos/fêmea; número de adultos emergidos/ovo de *D. saccharalis* e razão sexual (total de fêmeas/total de insetos). Realizaram-se avaliações diárias para registrar o período de desenvolvimento ovo-adulto. Os demais parâmetros foram avaliados após a emergência dos adultos.

Exposição indireta

Utilizaram-se larvas de *D. saccharalis* no 5º. instar, para as quais foi fornecida uma gota de 5 μL de solução contendo a proteína Vip3Aa20, corante Fluorella Blue (0,01%) e açúcar (10%) como fagoestimulante, conforme metodologia adaptada de HUGHES & WOOD (1981). As larvas foram retiradas da dieta de alimentação e mantidas sem alimentação por um período de 24 horas, a fim de deixá-las propensas a se alimentar. Após esse período, dispôs-se uma gota de solução do respectivo tratamento para cada larva individualmente numa placa de Petri. As concentrações da proteína Vip3Aa20 avaliadas foram 0; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Após consumirem a solução contendo a proteína, as larvas foram colocadas em placas de Petri, com 10 larvas por placa, sendo-lhes fornecida dieta artificial baseada em KING & HARTLEY (1985) e mantidas em estufa climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas) até empupar e durante o estágio de pupa.

As pupas foram mantidas em estufa climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas) e próximo à emergência dos adultos, foram separadas e acondicionadas em tubos de PVC (gaiola de adultos). Cada gaiola continha entre 20 e 30 pupas, aproximadamente na proporção 1:1 entre macho:fêmea. As gaiolas foram internamente revestidas com papel sulfite, sobre o qual as mariposas realizaram a postura. Para alimentação das mariposas, foi disposto um chumaço embebido em solução de mel 10% sobre o tecido *voil* que revestia a abertura superior dos tubos. As gaiolas

permaneceram em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Após início da oviposição, posturas de *D. saccharalis* (< 24 horas) foram oferecidas a adultos de *T. galloi* para parasitismo. Os parasitóides adultos foram mantidos em recipientes plásticos com alimento para permitir o acasalamento antes de parasitarem os ovos de *D. saccharalis*. No parasitismo, as fêmeas foram mantidas em tubos de ensaio de fundo chato (8cm x 2,5cm) juntamente com as posturas de *D. saccharalis*, por um período de 24 horas em estufa climatizada ($26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas). Foi disponibilizada uma gotícula de mel, na parede interior do tubo de ensaio, para alimentação das fêmeas.

O bioensaio foi conduzido com 30 fêmeas para cada tratamento. A quantidade de ovos de *D. saccharalis* disponibilizada para cada fêmea de *T. galloi* foi em número sempre superior à capacidade de postura das fêmeas. Este fato foi constatado ao se observar que em nenhuma ocasião houve total parasitismo dos ovos, ou seja, em nenhum momento as fêmeas parasitaram todos os ovos disponíveis.

Após 24 horas, as fêmeas foram retiradas dos tubos de ensaio e mantidas em estufa climatizada para o desenvolvimento dos parasitóides. As características da prole avaliada foram: período ovo-adulto, total de ovos parasitados por fêmea, porcentagem de emergência de adultos do parasitóide, número total de adultos emergidos, razão sexual (fêmeas/total) e adultos emergidos por ovo eclodido.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de regressão com auxílio do programa Minitab 15 (MINITAB 2007). Adotou-se como nível de significância 5 % de probabilidade. Em todas as comparações da razão sexual (efeito direto e indireto), as repetições que apresentavam apenas machos (indicando que a fêmea parental não havia acasalado) foram desconsideradas para as análises.

RESULTADOS

Exposição direta

A avaliação do efeito da exposição direta de *T. galloi* à proteína Vip3Aa20 demonstrou que ela não afetou os parasitóides quando estes a ingeriram (Tabela 1). A longevidade de machos variou de 1,80 a 2,38 dias e a das fêmeas entre 3,04 e 3,48 dias. Nenhum dos parâmetros avaliados foi afetado pela proteína Vip3Aa20 com relação ao desempenho reprodutivo dos parasitóides. Os resultados das análises de regressão são relacionados a seguir: longevidade de machos (GL = 1, 120; F = 0,496; P = 0,482), longevidade de fêmeas (GL = 1, 366; F = 3,791; P = 0,052), período ovo-adulto (GL = 1, 238; F = 3,553; P = 0,061), número de ovos parasitados (GL = 1, 239; F = 0,108; P = 0,742), porcentagem de emergência de adultos (GL = 1, 239; F = 3,115; P = 0,079), total de adultos (GL = 1, 239; F = 0,600; P = 0,440), número de adultos por ovo (GL = 1, 238; F = 1,614; P = 0,205) e razão sexual (GL = 1, 223; F = 0,386; P = 0,535).

Exposição indireta

As análises de regressão não foram significativas para nenhuma das características avaliadas. O número de ovos parasitados por fêmea não apresentou significância pela análise de regressão (GL = 1, 114; F = 0,24; P = 0,62), sendo que seus valores variaram entre $28,50 \pm 1,90$ e $28,42 \pm 2,03$ respectivamente para a testemunha e a maior concentração avaliada ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Vip3Aa20) (Tabela 2). As demais características avaliadas também não apresentaram relação significativa com as doses da proteína, cujos valores obtidos para período ovo-adulto (GL = 1, 112; F = 0,35, P = 0,554), porcentagem de emergência de adultos (GL = 1, 114; F = 1,66; P = 0,200), número de adultos emergidos (GL = 1, 113; F = 0,32; P = 0,573), número de adultos por ovo (GL = 1, 113; F = 0,00, P = 0,979) e razão sexual (GL = 1, 108; F = 0,90; P = 0,345) (Tabela 2).

Tabela 1 Longevidade de adultos, duração do período ovo-adulto, número de ovos parasitados por fêmea, porcentagem de emergência de adultos, total de adultos emergidos, número de adultos emergidos por ovo parasitado e razão sexual de *Trichogramma galloi* em avaliações da exposição direta à proteína Vip3Aa20 via alimentação. EPM = erro padrão da média; (n) = número de repetições.

	Concentração proteína ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)					Significância	Equação da reta
	0	50	100	250	500		
Longevidade de machos (dias)	1,80 \pm 0,11 (28)	2,31 \pm 0,19 (16)	2,38 \pm 0,22 (21)	1,92 \pm 0,16 (24)	1,94 \pm 0,11 (33)	NS	$y = -0,0006x + 49,939$
Longevidade de fêmeas (dias)	3,04 \pm 0,14 (69)	3,16 \pm 0,13 (83)	3,48 \pm 0,12 (78)	3,36 \pm 0,12 (74)	3,46 \pm 0,14 (64)	NS	$y = 0,00007x + 3,185$
Período ovo-adulto (dias)	8,77 \pm 0,06 (48)	8,45 \pm 0,89 (48)	8,51 \pm 0,74 (47)	8,84 \pm 0,05 (49)	8,72 \pm 0,06 (48)	NS	$y = 0,00003x + 8,604$
Número ovos parasitados	15,69 \pm 0,89 (48)	15,52 \pm 0,89 (48)	17,04 \pm 0,90 (48)	16,41 \pm 0,87 (49)	15,41 \pm 1,04 (48)	NS	$y = -0,00007x + 16,152$
Emergência de adultos (%)	68,54 \pm 3,23 (48)	70,66 \pm 2,75 (48)	68,01 \pm 2,94 (48)	76,11 \pm 2,73 (49)	73,90 \pm 2,42 (48)	NS	$y = 0,0124x + 69,233$
Total de adultos	20,79 \pm 1,71 (48)	20,46 \pm 1,53 (48)	22,00 \pm 1,80 (48)	24,84 \pm 1,88 (49)	21,75 \pm 1,67 (48)	NS	$y = 0,0033x + 21,382$
Número adultos/ovo	1,87 \pm 0,05 (48)	1,87 \pm 0,05 (48)	1,83 \pm 0,04 (47)	1,91 \pm 0,03 (49)	1,91 \pm 0,05 (48)	NS	$y = 0,00001x + 1,825$
Razão sexual	0,83 \pm 0,02 (48)	0,82 \pm 0,03 (46)	0,89 \pm 0,01 (43)	0,87 \pm 0,02 (48)	0,80 \pm 0,03 (40)	NS	$y = -0,000004x + 0,851$

NS – não significativo

Tabela 2. Duração do período ovo-adulto, número de ovos parasitados por fêmea, porcentagem de emergência de adultos, total de adultos emergidos, número de adultos emergidos por ovo parasitado e razão sexual de *Trichogramma galli* em avaliações da exposição indireta à proteína Vip3Aa20 via hospedeiro. EPM = erro padrão da média; (n) = número de repetições.

	Concentração da proteína ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)					Significância	Equação da reta
	0	0,125	0,25	0,5	1		
Período ovo-adulto (dias)	10.29 ± 0.09 (24)	10.28 ± 0.11 (18)	10.14 ± 0.08 (21)	10.40 ± 0.10 (25)	10.31 ± 0.09 (26)	NS	$y = 0,069x + 10,261$
Número de ovos parasitados	28.50 ± 1.90 (24)	31.28 ± 2.10 (18)	29.76 ± 2.46 (21)	28.15 ± 2.37 (27)	28.42 ± 2.03 (26)	NS	$y = -1,321x + 29,596$
Emergência de adultos (%)	69.77 ± 4.29 (24)	70.42 ± 4.07 (18)	65.93 ± 3.68 (21)	66.49 ± 4.72 (27)	76.17 ± 3.29 (26)	NS	$y = 6,521x + 67,204$
Total adultos	38.17 ± 3.25 (24)	41.56 ± 3.81 (18)	36.33 ± 3.46 (21)	37.42 ± 3.80 (26)	41.46 ± 3.59 (26)	NS	$y = 2,490x + 37,932$
Número adultos/ovo	1.94 ± 0.07 (24)	1.90 ± 0.04 (18)	1.84 ± 0.04 (21)	1.95 ± 0.06 (26)	1.91 ± 0.05 (26)	NS	$y = 0,002x + 1,909$
Razão sexual	0.82 ± 0.04 (24)	0.87 ± 0.02 (18)	0.81 ± 0.04 (20)	0.87 ± 0.03 (24)	0.86 ± 0.02 (24)	NS	$y = 0,037x + 0,833$

NS – não significativo

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos tanto na exposição direta como na indireta do parasitóide *T. galloi* à proteína Vip3Aa20 sugerem que não há efeito da proteína sobre as características biológicas do inseto. Estes resultados ressaltam a expectativa de que os parasitóides de ovos não são afetados por proteínas expressas transgenicamente em plantas, como é discutido por BERNAL (2010). Há poucos trabalhos na literatura estudando a interação entre parasitóides de ovos e proteínas/plantas transgênicas. MANACHINI & LOZZIA (2004) estudaram o efeito do milho transgênico expressando a proteína Cry1Ab sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma brassicae* se desenvolvendo em ovos de *O. nubilalis* que haviam consumido o milho transgênico. Os autores não observaram nenhum efeito sobre a porcentagem de parasitismo, número, longevidade e mortalidade de adultos de *T. brassicae* emergindo de ovos de *O. nubilalis*.

De forma semelhante, trabalhos avaliando a comunidade de artrópodes em cultivos de plantas transgênicas expressando proteínas Vip não observaram diferenças entre parcelas transgênicas e não transgênicas em relação à fauna de parasitóides de ovos (FERNANDES et al. 2007, WHITEHOUSE et al. 2007).

Segundo BERNAL (2010), a exposição do adulto de parasitóides de ovos a proteínas expressas em plantas transgênicas parece ser mais provável que a exposição indireta com a proteína presente nos ovos do hospedeiro, e as principais rotas de exposição ocorrem através do *honeydew*, néctar floral e extrafloral, pólen e outros fluidos das plantas, derivados de processos naturais como gutação ou extravasados de tecidos danificados. Assim, os resultados obtidos no bioensaio de exposição direta à proteína Vip3Aa20 nos indicam que adultos de *T. galloi* não são suscetíveis à proteína quando a ingerem diretamente.

Na exposição indireta, quando *T. galloi* se desenvolveu em ovos de *D. saccharalis* cujas larvas ingeriram a proteína, também não se observaram efeitos sobre as características avaliadas. Apesar da falta de informação sobre os efeitos das proteínas Bt sobre os ovos de insetos que as ingeriram, seja alterando sua constituição

ou mesmo através da passagem da proteína para os ovos, os resultados obtidos neste bioensaio nos indicam que não há efeito sobre o desenvolvimento do parasitóide, considerando-se a relação trófica entre o alimento do herbívoro, o herbívoro e o parasitóide de ovos.

A ausência de efeitos da proteína Vip3Aa20 sobre o parasitóide de ovos *T. galloi* observada nos bioensaios realizados em condições de laboratório utilizando-se alta dosagem de proteína nos sugere que não há necessidade de prosseguir em avaliações de maior complexidade, tal como propõem as avaliações em camadas ou etapas propostas por POPPY & SUTHERLAND (2004) e GARCIA-ALONSO et al. (2006).

CONCLUSÃO

O parasitóide de ovos *T. galloi* não é afetado pela proteína Vip3Aa20 considerando tanto a exposição direta como a indireta, via hospedeiro.

REFERÊNCIAS

ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 142-199, 2008.

ANDOW, D. A.; LÖVEI, G. L.; ARPAIA, S. Ecological risk assessment for Bt crops. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 749-751, 2006.

ANDOW, D. A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, v. 54, n. 7, p. 637-649, 2004.

ARPAIA, S. Genetically modified plants and “non-target” organisms: analysing the functioning of the agro-ecosystem. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 5, p. 12-80, 2010.

BALDWIN, J.; HUANG, F.; LEONARD, B. R. **Corn borer pests in Louisiana corn**. LSU Baton Rouge, LA, USA, Louisiana State University AgCenter, AgCenter Research and Extension Publication 2947, 2006. 4p.

BCPC. The British Crop Protection Council. **The Pesticide Manual: A world compendium: fipronil**. 11th ed. Hampshire: TomLin, p.545-546, 1997.

BERNAL, J. S. Genetically modified crops and biological control with egg parasitoids. In: CÔNSOLI, F. L.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Dordrecht: Springer, p. 443-466, 2010. 479p.

BIRCH, A. N. E.; WHEATLEY, R.; ANYANGO, B.; ARPAIA, S.; D. CAPALBO, GETU DEGAGA, E.; FONTES, D. E.; KALAMA, P.; LELMEN, E.; LÖVEI, G.; MELO, I. S.; MUYEKHO, F.; NGI-SONG, A.; OCHIENO, D.; OGWANG, J.; PITELLI, R.; SCHULER, T.; SÉTAMOU, M.; SRINIVASAN, S.; SMITH, J.; VAN SON, N.; SONGA, J.; SUJII, E.; TAN, T. Q.; WAN, F. H.; HILBECK, A. Biodiversity and non-target impacts: a case study of Bt maize in Kenya. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A. (eds.) **Environmental risk assessment of transgenic organisms: A case study of Bt maize in Kenya**. Wallingford: CABI International, p. 117-185, 2004. 304p.

BLUM, M. S.; HILKER, M. Chemical protection of insect eggs. In: HILKER, M.; MEINERS, T. (eds) **Chemical ecology of insect eggs and egg deposition**. Berlin: Blackwell, p. 61-90, 2002. 390p.

BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; CHAGAS NETO, J. F.; OLIVEIRA, C. P. B. Associação do Parasitóide de Ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do Parasitóide Larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no Controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em Cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.

BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; MAGRINI, E. A.; HADDAD, M. L.; RESENDE, L. C. L. Efeito do número de liberações de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Scientia Agricola**, v. 52, n. 1, p. 65-69, 1995.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; PEREIRA-BARROS, J. L.; SANTOS, A. J. N.;

CARVALHO, L. W. T.; CARVALHO, L. H. T.; OLIVEIRA, C. J. T. Efeito do número de adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) liberados em semanas sucessivas, para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2007.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: income and production effects, 1996-2007. **AgBioForum**, v. 12, n. 2, p. 184-208, 2009.

CASTRO, B. A.; RILEY, T. J.; LEONARD, B. R.; BALDWIN, J. Borers galore: emerging pest in Louisiana corn, grain sorghum and rice. **Louisiana Agriculture** v. 47, p. 4-6, 2004.

CONNER, A. J.; GLARE, T. R.; NAP, J. P. The release of genetically modified crops into the environment Part II. Overview of ecological risk assessment. **The Plant Journal**, v. 33, p. 19-46, 2003.

CRUZ, I. **A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa (Circular Técnica), n. 90, 2007. 12p.

CTNBio. 2009. **Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos, milho MIR 162**. Parecer Técnico nº 2042/2009. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14056.html> (acesso em 10 janeiro de 2011).

DUKE, S. O.; CERDEIRA, A. L. Potential environmental impacts of herbicide-resistant crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 2, p. 66-143, 2005.

EISNER, T.; ROSSINI, C.; GONZALEZ, A.; IYENGAR, V. K.; SIEGLER, M. V. S.; SMEDLEY, S. C. Paternal investment in egg defense. In: HILKER, M.; MEINERS, T. (eds) **Chemical ecology of insect eggs and egg deposition**. Berlin: Blackwell, p. 91-116, 2002. 390p.

FERNANDES, O. A.; FARIA, M.; MARTINELLI, S.; SCHMIDT, F.; CARVALHO, V. F.; MORO, G. Short-term assessment of bt maize on non-target arthropods in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 3, p. 249-255, 2007.

GARCIA-ALONSO, M.; JACOBS, E.; RAYBOULD, A.; NICKSON, T. E.; SOWIG, P.; WILLEKENS, H.; VAN DER KOUWE, P.; LAYTON, R.; AMIJEE, F.; FUENTES, A. M.; TENCALA, F. A tiered system for assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. **Environmental Biosafety Research**, v. 5, p. 57-65, 2006.

HUGUES, P. R.; WOOD, H. A. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 154-159, 1981.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009**. Ithaca, NY: ISAAA, n. 41, 2009.

KING, E. G.; HARTLEY, G. C. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R. F. (eds.) **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, p. 265-270, 1985. 514p.

LI, L. Y. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey. In: Wajnberg, E.; Hassan, S. A. (eds.) **Biological control with egg parasitoids**. Oxon: C.A.B. International, p. 37-54, 1994. 300p.

MANACHINI, B.; LOZZIA, G. C. Studies on the effects of Bt corn expressing Cry1Ab on two parasitoids of *Ostrinia nubilalis* Hb. (Lepidoptera: Crambidae). **IOBC wprs Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 109-116, 2004.

McNEELY, J. A. The problems with invasive alien species and implications for GMOs. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 2, p. 10-35, 2005.

MINITAB. **Statistical Software**. Minitab 15. State College, Pa, USA, 2007.

MORÉ, M.; TRUMPER, E. V.; PROLA, M. J. Influence of corn, *Zea mays*, phenological stages in *Diatraea saccharalis* F. (Lep. Crambidae) oviposition. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 512-515, 2003.

NIELSEN, K. M. An assessment of factors affecting the likelihood of horizontal transfer of recombinant plant DNA to bacterial recipients in the soil and phytosphere. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 1, p. 98-151, 2003.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T. R.; BURGESS, E. P. J.; MALONE, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 271-292, 2005.

PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. *Trichogramma* in Brazil: Feasibility of Use after Twenty Years of Research. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 271-281, 2004.

PEREIRA-BARROS, J. L.; BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; SANTOS, A. J. N.; CARVALHO, L. W. T.; CARVALHO, L. H. T.; OLIVEIRA, C. J. T. Aspectos biológicos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) criados em ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 4, p. 714-718, 2005.

PINTO, A. S.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N.; ARRIGONI, E. D. B. Comparação de técnicas de liberação de *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 311-318, 2003.

POPPY, G. M.; SUTHERLAND, J. P. Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. **Physiological Entomology**, v. 29, p. 257-268, 2004.

PRATISSOLI, D.; OLIVEIRA, H. N.; VIEIRA, S. M. J.; OLIVEIRA, R. C.; ZAGO, H. B. Efeito da disponibilidade de hospedeiro e de alimento nas características biológicas de *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 1, p. 101-104, 2004.

SMITH, S. M. Biological control with *Trichogramma*: Advances, successes and potential of their use. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 375-406, 1996.

WHITEHOUSE, M. E. A.; WILSON, L. J.; CONSTABLE, G. A. Target and non-target effects on the invertebrate community of Vip cotton, a new insecticidal transgenic. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 58, p. 273-285, 2007.

WILKINSON, M. J.; FORD, C. S. Estimating the potential for ecological harm from gene

flow to crop wild relatives. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 3, p. 42-63, 2007.

ZUCCHI, R. A.; PARRA, J. R. P.; SILVEIRA NETO, S. *Trichogramma* species associated with some lepidopterous in Brazil. **Colloques-de-L`INRA**, n. 56, p. 131-134, 1991.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos presentemente indicam que a broca-do-colmo *Diatraea saccharalis* é suscetível à proteína inseticida Vip3Aa20, que é biotecnologicamente expressa em cultivares de milho para o controle de lepidópteros-pragas. Desta forma, o plantio de variedades de milho expressando esta proteína torna-se mais uma ferramenta à disposição dos produtores para o manejo das populações no campo. Por outro lado, faz-se necessário avaliar os possíveis efeitos dessa tecnologia sobre os demais organismos presentes nos agroecossistemas.

Por isto, realizamos através deste trabalho a avaliação do efeito da proteína sobre dois parasitóides de *D. saccharalis*, que exercem importante papel no manejo das populações da broca. O primeiro deles é o parasitóide larval *Cotesia flavipes*, amplamente utilizado no controle biológico aplicado na cultura da cana-de-açúcar. A ingestão da proteína não resultou em efeitos sobre o parasitóide adulto. Entretanto, observaram-se alguns efeitos negativos da proteína que podem ser atribuídos ao efeito mediado pelo hospedeiro, uma vez que as larvas da broca são suscetíveis e sofrem a ação da proteína. Desse modo, as larvas de *D. saccharalis* têm seu desenvolvimento afetado e passam a figurar como recurso alimentar com qualidade inferior e, conseqüentemente, afetam o desempenho do parasitóide.

Embora se tenha observado efeitos mediados pelo hospedeiro, é necessário comparar os efeitos em nível de campo, entre a proteína transgênica e o uso de produtos fitossanitários convencionais, sendo que geralmente a segunda opção apresenta efeitos negativos muito mais expressivos sobre os organismos presentes no sistema agrícola e até fora dele.

O segundo parasitóide avaliado foi *Trichogramma galloi* que ocorre naturalmente no Brasil e é um parasitóide de ovos. Para estes, praticamente inexistem trabalhos na literatura sobre a interação com proteínas expressas em plantas transgênicas, embora

a exposição às proteínas possa ocorrer por diversas vias. Os resultados obtidos nas avaliações com *T. galloi* indicam que não há efeito da proteína sobre suas características biológicas, tanto na exposição direta como indireta.

O conjunto de informações geradas através deste trabalho nos permite concluir que a proteína Vip3Aa20 não afeta diretamente os parasitóides avaliados, e apenas indiretamente no caso de *C. flavipes*, embora este efeito deva ser ponderado, analisando-se o efeito de outros métodos de controle das populações no campo, principalmente os produtos fitossanitários convencionais.

Considerando o sistema de avaliação de riscos em camadas (*tiers*) pode-se inferir pela não necessidade de continuação dos estudos, ou seja, não é necessário avançar para situações de maior complexidade, uma vez que os resultados não demonstraram efeitos negativos da proteína sobre os parasitóides.

Este trabalho também contribui para o avanço do conhecimento acerca das interações entre proteínas expressas em plantas transgênicas e os diversos organismos que são considerados não alvo dos produtos biotecnológicos, como a expressão de proteínas inseticidas oriundas da bactéria *Bacillus thuringiensis* em plantas, demonstrando a biossegurança na relação entre a proteína Vip3Aa20 e os parasitóides de *D. saccharalis* avaliados.

Durante o desenvolvimento do trabalho surgiram vários desafios, principalmente associados com os aspectos metodológicos, e ao mesmo tempo, várias ideias igualmente foram desenvolvidas. Considerando o aprendizado obtido e a continuação dos trabalhos nessa linha de pesquisa são sugeridas a seguir algumas ideias para se trabalhar.

O desenvolvimento de uma linhagem do hospedeiro resistente à proteína Vip3Aa20, que dessa forma ingerisse continuamente a proteína, poderia se constituir numa abordagem mais realística para avaliar o efeito da proteína sobre os parasitóides, considerando o desenvolvimento dos mesmos nos hospedeiros. Outra possibilidade metodológica aventada é a avaliação de parasitóides criados *in vitro*, onde se adicionaria a proteína na dieta artificial do inseto e assim poder-se-ia avaliar o efeito da proteína no desenvolvimento larval do parasitóide dispensando a utilização do

hospedeiro.

Como o efeito, quando ocorre efeito negativo, representa muitas vezes valores não drásticos, ou seja, há apenas uma alteração em pequena magnitude, a avaliação de várias gerações do parasitóide expostas à proteína pode ter resultados interessantes e deve ser cogitada em trabalhos futuros.