



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Método para avaliação de risco ambiental de toxinas Bt sobre organismos não-alvo em  
laboratório: foco no predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae)**

**ANDRÉ RICARDO BELLINATI**

Brasília – DF

Agosto, 2013



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Método para avaliação de risco ambiental de toxinas Bt sobre organismos não-alvo em laboratório: foco no predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae)**

**ANDRÉ RICARDO BELLINATI**

Orientador: Prof. Dr. Edison Ryoiti Sujii

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Débora Pires Paula

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Brasília – DF

Agosto, 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

AGENTES FINANCIADORES

Universidade de Brasília - UnB

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FUNARBE - Fundação Arthur de Alencar

## Dissertação de Mestrado

Título:

“Método para avaliação de risco ambiental de toxinas Bt sobre organismos não-alvo em laboratório: foco no predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae)”.

**Banca Examinadora:**

*Prof. Dr. Edison Ryoiti Sujii*  
Presidente / Orientador  
Embrapa

*Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz*  
Membro Titular  
ZOO/UnB

*Profa. Dra. Cristina Schetino Bastos*  
Membro Titular  
FAV/UnB

*Prof. Dr. Paulo César Motta*  
Membro Suplente  
ZOO/UnB

Brasília, 11 de julho de 2013.

## **AGENTES FINANCIADORES**

Universidade de Brasília – UnB

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FUNARBE – Fundação Arthur Bernardes

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação à minha família.

Toda ela.

Italianos e japoneses.

Brasileiros.

De sangue ou não.

Amigos.

Felinos e caninos.

Das horas boas.

Também das difíceis.

Presentes ou na memória.

Todos!

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

UnB – Universidade de Brasília

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Aqui deixo meus sinceros agradecimentos...

aos estagiários do Laboratório de Ecologia e Biossegurança, Bruno Luiz, Bruno Rocha, Caroline Almeida, Flávio Lacerda, Juliany Reis, Lizzi Araújo, Pedrinho, Pedro Henrique, Stephanie Luar e Valéria Souza, que cada vez que aprendiam a realizar uma tarefa, lá ia eu mudar tudo para que pudéssemos fazer outro bioensaio, que durava vários dias consecutivos, incluindo os finais de semana, exigindo idas ao campo, à casa de vegetação...

ao pessoal das bancadas e laboratórios vizinhos, Albert Ramos, Antônio Souza, Diego Magalhães, Giselle Chagas, Gustavo Oliveira, Leonardo Pepino, Carol Bezerra, Karol Torezani, Lorena Bravo, Marcelo Paganella, Mayra Pimenta, Michely de Aquino, Paula Sicsú, Patrícia Pellegrini, Pedro Togni, Sabina Ferreira, Tiago Frizzo, Yuri Prestes, que tinham que me aguentar fazendo perguntas e mais perguntas sobre como deveria ser isso ou aquilo, sobre como interpretar esse e aquele resultado, onde estava tal material, como deveria proceder em determinado biensaio, se eu poderia pegar esse ou aquele material “emprestado”...

ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica, Renata Timbó, Luciana Ramalho e Diogo Claudino, que me receberam muito bem e me ajudaram na realização dos experimentos na área molecular...

aos assistentes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Alex Cortez, Isabella Grisi e Márcio Wandré, que me ajudaram em diversas tarefas, deram apoio sobre como funciona a empresa, sobre onde e como conseguir os materiais necessários...

aos analistas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Lucas Machado de Souza, pelo trabalho conjunto com a dieta artificial sólida, pela ajuda com a escrita de algumas partes dessa dissertação, pelo auxílio com a logística dos biensaios e pelo apoio necessário, e Ligia Sardinha Fortes, pela revisão e correção das referências bibliográficas...

aos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Carmen Pires, Débora Pires Paula, Edison Sujii, Joseane P. Silva e Rose Monnerat, que tanto deram ideias e opiniões, auxiliaram nas análises estatísticas dos resultados e colocaram a mão na massa para fazer com que esse trabalho desse certo...

aos professores da Universidade de Brasília, Cristina S. Bastos, José R. Pujol-Luz e Paulo C. Motta, por gentilmente aceitarem fazer parte da banca de avaliação dessa dissertação...

aos meus pais, Mário e Leila, meu irmão Sergio, minha cunhada Gislene, minha avózinha Lourdes, meus primos Christian e Yvis e família, aos amigos de perto e de longe, Lulu, Cláu, ThiGui, Hellô, Agino, Van, Quita, Paulinha, aos meus pets e à minha amada esposa, Simone, por terem me aguentado durante todo esse tempo de dedicação e ausência...

aqui fica o meu muito obrigado!!!

**CITAÇÃO**

*O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.*

Isaac Newton (1643-1727)



## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	13
<b>1.1. Cotonicultura</b> .....	14
<b>1.2. Toxinas Cry</b> .....	15
<b>1.3. Avaliação de risco ambiental</b> .....	15
<b>1.4. Coccinelídeos</b> .....	17
<b>1.5. Afídeos</b> .....	18
<b>1.6. Dietas artificiais</b> .....	20
<b>1.6.1. Dieta artificial sólida para criação de coccinelídeos</b> .....	21
<b>1.6.2. Dieta líquida e sistema artificial para criação de afídeos</b> .....	22
<b>2. Objetivos</b> .....	22
<b>2.1. Objetivos específicos</b> .....	23
<b>3. Hipóteses</b> .....	23
<b>4. Justificativa</b> .....	23
<b>5. Material e métodos</b> .....	24
<b>5.1. Criação dos insetos</b> .....	25
<b>5.1.1. Criação do coccinelídeo <i>C. sanguinea</i></b> .....	25
<b>5.1.2. Criação dos afídeos <i>A. gossypii</i> e <i>M. persicae</i></b> .....	25
<b>5.2. Dietas artificiais</b> .....	26
<b>5.2.1. Desempenho de <i>C. sanguinea</i> em dieta artificial sólida</b> .....	26
<b>5.2.2. Desempenho de <i>A. gossypii</i> e <i>M. persicae</i> em dieta artificial líquida</b> .....	29
<b>5.3. Testes de atividade biológica das toxinas Cry</b> .....	33
<b>5.3.1. Teste de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo <i>A. grandis</i></b> .....	33
<b>5.3.2. Teste de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo <i>A. gemmatalis</i></b> .....	36
<b>5.4. Ensaios de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F</b> .....	38
<b>5.4.1. Ensaio de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F sobre os pulgões via sistema bitrófico</b> .....	38
<b>5.4.2. Ensaio de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F sobre o predador via sistema tritrófico</b> .....	38

5.4.3. Detecção e quantificação das toxinas Cry1Ac e Cry1F nos diferentes níveis tróficos.....	39
<b>6. Resultados</b> .....	41
6.1. Dietas artificiais .....	41
6.1.1. Desempenho de <i>C. sanguinea</i> em dieta artificial sólida .....	41
6.1.2. Desempenho de <i>A. gossypii</i> e <i>M. persicae</i> em dieta artificial líquida e ensaio de toxicidade da toxina Cry1Ac sobre <i>M. persicae</i> .....	42
6.2. Testes de atividade biológica das toxinas Cry .....	45
6.2.1 Teste de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo <i>A. grandis</i> .....	45
6.2.2. Teste de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo <i>A. gemmatalis</i> .....	48
6.3. Ensaio de toxicidade e rotas de exposição das proteínas Cry1Ac e Cry1F .....	49
6.3.1. Ensaio de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F sobre <i>C. sanguinea</i> .....	49
6.3.2. Detecção e quantificação das proteínas Cry1Ac e Cry1F nos diferentes níveis tróficos.....	50
<b>7. Discussão</b> .....	52
<b>8. Conclusões</b> .....	62
<b>9. Referências bibliográficas</b> .....	63

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Criação de <i>C. sanguinea</i> : <b>a)</b> adultos em recipientes plásticos de 500 mL e <b>b)</b> larvas em recipientes plásticos de 50 mL.....	25
<b>Figura 2.</b> Colônia de pulgões: <b>a)</b> <i>A. gossypii</i> criado em recipientes plásticos de 3 L contendo folhas do algodoeiro e <b>b)</b> <i>M. persicae</i> criado em recipientes plásticos de 3 L contendo folhas de couve.....	26
<b>Figura 3.</b> Recipientes com dieta artificial para <i>C. sanguinea</i> : <b>a)</b> recipiente contendo a dieta recém-preparada, <b>b)</b> visão geral dos recipientes de criação contendo as larvas (um indivíduo por recipiente), <b>c)</b> larva de primeiro instar (em destaque) em recipientes de criação contendo dieta artificial e algodão umedecido.....	28
<b>Figura 4.</b> Colônia de <i>M. persicae</i> em dieta artificial líquida: <b>a)</b> bandeja de criação contendo recipientes com sachê de dieta artificial líquida; <b>b)</b> detalhe do recipiente. ....	31
<b>Figura 5.</b> Material utilizado para montagem da dieta artificial líquida para afídeos em sachês: <b>a)</b> pipeta, seringa, filtro e tubo Falcon®; <b>b)</b> bandeja com recipientes e <b>c)</b> bandeja com Parafilm® M.....	31
<b>Figura 6.</b> Procedimento de troca da dieta artificial líquida para afídeos: <b>a)</b> recipiente em uso (esquerda), tira de Parafilm® M e recipiente novo; <b>b)</b> recipientes unidos pela tira de Parafilm® M; <b>c)</b> drenagem da dieta antiga (recipiente inferior) em papel absorvente. ....	32
<b>Figura 7.</b> Placas de Petri contendo disco foliar em ágar a 1%: <b>a)</b> de algodoeiro ( <i>G. hirsutum</i> ); <b>b)</b> e de couve ( <i>B. oleracea</i> ), oferecidos à <i>A. gossypii</i> e <i>M. persicae</i> como dieta controle, respectivamente.....	32
<b>Figura 8.</b> Teste de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo <i>A. grandis</i> : <b>a)</b> visão geral das placas para cultura de tecidos NUNC® com seis poços; <b>b)</b> detalhe das larvas retiradas da dieta para verificação da mortalidade.....	34
<b>Figura 9.</b> Sistemas utilizados para os testes de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo <i>A. gemmatilis</i> : <b>a)</b> recipiente contendo dieta e toxina; <b>b)</b> recipiente contendo apenas dieta.....	37
<b>Figura 10.</b> Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) para o pulgão <i>A. gossypii</i> desenvolvendo-se folhas do algodoeiro ( <i>G. hirsutum</i> ) (linha contínua) e em dieta artificial líquida (linha tracejada) ao longo dos dias (RV = 12,69; GL = 1; valor-p < 0,001). ....	43
<b>Figura 11.</b> Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) para o pulgão <i>M. persicae</i> desenvolvendo-se folhas de couve ( <i>B. oleracea</i> ) (linha contínua), em dieta artificial líquida (linha tracejada) e em dieta artificial com 30 µg/mL de Cry1Ac (linha pontilhada) ao longo dos dias (RV = 11,08; GL = 2; valor-p = 0,004). ....	44
<b>Figura 12.</b> Resultado do 1º bioensaio realizado (Teste 1) para testar a atividade biológica do 1º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo <i>A. grandis</i> . ....	46
<b>Figura 13.</b> Resultado do 2º bioensaio realizado (Teste 2) para testar a atividade biológica do 2º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo <i>A. grandis</i> . ....	46
<b>Figura 14.</b> Resultado do 4º bioensaio realizado (Teste 4) para testar a atividade biológica do 3º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo <i>A. grandis</i> . ....	47

**Figura 15.** Resultado do 5º bioensaio realizado (Teste 5) para testar a atividade biológica do 4º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo *A. grandis*. ..... 47

**Figura 16.** Resultado do 3º bioensaio realizado (Teste 3) para testar a atividade biológica do 2º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo *A. grandis*. ..... 48

## TABELAS

**Tabela 1.** Composição das dietas artificiais testadas preliminarmente para a criação de larvas e adultos de *C. sanguinea*, modificadas a partir de Bernardes et al. (2008) e Silva et al. (2010). ..... 27

**Tabela 2.** Composição de diferentes dietas artificiais, medidas em gramas, para a criação de larvas e adultos de *C. sanguinea*. ..... 28

**Tabela 3.** Componentes usados para preparo de 100 mL de dieta artificial líquida para *M. persicae* contendo 15 g de sacarose (DOUGLAS; EMDEN, 2007). ..... 30

**Tabela 4.** Estrutura dos testes de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo *A. grandis*. ..... 34

**Tabela 5:** Ingredientes para composição de 500 mL de dieta artificial para *A. grandis* (MONNERAT et al., 2000). ..... 35

**Tabela 6.** Concentrações de toxina ( $\mu\text{g/mL}$ ) Cry8Ka5 utilizados na dieta em cada teste de avaliação de atividade biológica sobre o inseto-alvo *A. grandis*. ..... 35

**Tabela 7.** Composição da dieta artificial (780 mL) para *A. gemmatalis*. Todos os ingredientes foram autoclavados a 120°C por 15 min. ..... 37

**Tabela 8.** Tempo (média  $\pm$  desvio padrão) de desenvolvimento larval, pupal e total (ovo a adulto), proporção de indivíduos que chegaram ao estágio de pupa e adulto e longevidade dos adultos de *C. sanguinea*. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson. .... 42

**Tabela 9.** Bionomia (média  $\pm$  desvio-padrão) do pulgão *A. gossypii* criado em dieta artificial líquida e em folhas do algodoeiro. Médias seguidas por letras diferentes em cada linha diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson. .... 43

**Tabela 10.** Bionomia (média  $\pm$  desvio-padrão) do pulgão *M. persicae* desenvolvendo-se em folha de couve, em dieta artificial líquida sem adição de toxinas e em dieta artificial líquida adição de 30  $\mu\text{g/mL}$  de Cry1Ac. Médias seguidas por letras diferentes em cada linha diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson. .... 45

**Tabela 11.** Teste de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo *A. gemmatalis*. ..... 49

**Tabela 12.** Tempo médio para que as larvas de *C. sanguinea* atinssem o estágio de pré-pupa sendo alimentadas com pulgões *M. persicae* provenientes de diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson. .... 49

<b>Tabela 13.</b> Consumo médio das larvas de <i>C. sanguinea</i> alimentadas com pulgões <i>M. persicae</i> provenientes de diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson. ....	50
<b>Tabela 14.</b> Massa média (mg) das pré-pupas de <i>C. sanguinea</i> alimentadas com pulgões <i>M. persicae</i> provenientes de diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson. ....	50
<b>Tabela 15.</b> Quantidade de Cry1Ac (em ng/mg de peso fresco) calculada para cada nível trófico dos bioensaios de exposição dessa toxina isoladamente ao predador <i>C. sanguinea</i> através do pulgão <i>M. persicae</i> . ....	51
<b>Tabela 16.</b> Quantidade de Cry1F (em ng/mg de peso fresco) calculada para cada nível trófico dos bioensaios de exposição dessa toxina combinada com Cry1Ac ao predador <i>C. sanguinea</i> através do pulgão <i>M. persicae</i> . ....	51

## RESUMO

O plantio extensivo de monoculturas e o uso de práticas agronômicas intensivas tornam a agricultura, e a produção em massa de alimentos, um dos principais fatores de risco à conservação da biodiversidade. Avanços no campo da engenharia genética propõem-se a diminuir tais impactos, promovendo aumento de produtividade e redução no uso de agrotóxicos, principalmente através da transferência de genes interespecies. Um exemplo desse tipo de manipulação genética é a inserção de genes de *Bacillus thuringiensis* em plantas cultivadas, para expressão de proteínas Cry, tóxicas a insetos-praga. Essa prática resulta em plantas com características que não existiam anteriormente na natureza, o que suscita o temor de novos riscos à biodiversidade, resultando em uma regulamentação de análises de risco para liberação de tais plantas modificadas no ambiente. O desenvolvimento de cadeias tróficas artificiais que simulem rotas de exposição a proteínas Bt tem permitido seu rastreamento ao longo dos níveis tróficos, de forma a possibilitar a detecção de prejuízos ambientais antes mesmo do estabelecimento de novos eventos ou da transformação da planta. Este trabalho se propôs a desenvolver um método de exposição de endotoxinas expressas em plantas geneticamente modificadas a predadores não-alvo por meio de dietas artificiais, permitindo a avaliação em laboratório do impacto de tais compostos sobre a bionomia de organismos presentes no ambiente. Para tal, foram realizados aprimoramentos da criação em laboratório de *Cycloneda sanguinea*, predador não-alvo, e *Aphis gossypii* e *Myzus persicae*, insetos fitófagos não-alvo predados por *C. sanguinea*. Diferentes composições de dietas artificiais foram testadas, assim como seu uso para a exposição das endotoxinas Cry8Ka5, Cry1Ac e Cry1F às três espécies de insetos não-alvo. Não foi detectada atividade biológica de Cry8Ka5 testados sobre o inseto-alvo, *Anthonomus grandis*, o que impossibilitou testes sobre organismos não-alvo. Foram obtidas composições de dietas sólidas artificiais à base de *A. gossypii* para a criação de larvas de *C. sanguinea* até o estágio adulto, no entanto, sem a obtenção de reprodução dos indivíduos. Assim, não foi possível estabelecer uma rota de exposição bitrófica de toxinas Cry para o predador não-alvo *C. sanguinea* através de dieta artificial. Um sistema eficaz de criação de *M. persicae* com dieta líquida foi estabelecido, possibilitando o desenvolvimento de uma via segura de exposição das toxinas Cry a *C. sanguinea*. Tal sistema não se mostrou apropriado para *A. gossypii*, espécie para a qual novos estudos nutricionais deverão ser realizados. As toxinas Cry1Ac e Cry1F, detectadas em todos os níveis tróficos, não apresentaram efeito letal ou subletal sobre o inseto não-alvo *C. sanguinea*.

Palavras-chave: impacto ecológico, predação, transgenia, dieta artificial, controle biológico.

## ABSTRACT

The adoption of an extensive model with monoculture and agronomical intensive practices, in response to the global demand for food, has been considered one of the main risk factor to biodiversity conservation. Advances in genetic engineering propose to diminish such impacts by promoting increased productivity and reduced pesticides adoption, mainly through gene transfer among species. Transformation of cultivated plants by inserting *Bacillus thuringiensis* genes is an example of such genetic manipulation techniques, aiming the expression of Cry proteins, which present toxic activity on pest insects. This practice result in plants with new features never experienced before in nature, raising concern about new risks to biodiversity, which resulted in a specific regulatory framework of risk assessment for the release of such transformed plants in the environment. The development artificial trophic chains that simulates the exposure of Bt toxins has allowed its tracking throughout the trophic levels, enabling the detection of environment damages prior to the establishment of new events or, even, the plant transformation. This work proposes to develop a new method of exposure of non-target predators to Bt toxins, expressed in genetically modified plants, through artificial diet, allowing the evaluation of such compound impacts on the organisms bionomics in laboratory. Therefore, improvements were promoted on the rearing of *Cycloneda sanguinea*, a non-target predator, and *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*, non-target phytophagous insects preyed by *C. sanguinea*. Different compositions of artificial diet were tested, such as their use for endotoxins Cry8Ka5, Cry1Ac and Cry1F exposure to the three non-target species. Cry8Ka5 presented no biological activity on its target, *Anthonomus grandis*, thwarting non-target tests. Solid artificial diet compositions *A. gossypii* based were obtained for *C. sanguinea* rearing from its larval until its adult stage. However, with no reproductive success observed. Thus, it was not possible to establish a bitrophic exposure to Cry toxins for the non-target predator *C. sanguinea* using artificial diet. An effective *M. persicae* rearing system was established, adopting liquid artificial diet, and allowing a secure exposure of *C. sanguinea* to Cry toxins. This rearing system was not appropriate for *A. gossypii*, and new nutritional studies shall be developed for this species. Cry1Ac and Cry1F toxins were detected in all trophic stages and did not present lethal or sublethal effects on non-target insect *C. sanguinea*.

Keywords: ecological impact, predation, transgeny, artificial diet, biological control.

## 1. Introdução

A agricultura é considerada um dos principais fatores de risco à conservação da biodiversidade. Isso ocorre devido à destruição e fragmentação da vegetação nativa através do plantio extensivo de monoculturas, além de práticas agrônômicas intensivas como a mecanização do preparo de solo, uso de materiais genéticos (variedades) homogêneos e o uso de agrotóxicos (FISZON et al., 2003). Nesse contexto, os avanços da engenharia genética podem minimizar o impacto da agricultura sobre a biodiversidade através do aumento da produtividade e redução do uso de agrotóxicos nas áreas já exploradas.

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a transferência de genes entre espécies reprodutivamente isoladas (transgenia) conferindo às plantas cultivadas características que anteriormente não poderiam ser obtidas por melhoramento genético convencional. Assim, foi possível obter variedades vegetais com resistência a pragas pela inserção de genes de uma bactéria, *Bacillus thuringiensis*, para expressão de proteínas Cry, tóxicas a alguns grupos de insetos. Essa estratégia pode permitir a redução nas aplicações de defensivos químicos e seus consequentes danos ao ambiente (ROMEIS et al., 2006).

Entretanto, a combinação gênica resultante da transgenia pode resultar em organismos expressando características inexistentes no ambiente, fato comparável à introdução de uma espécie exótica. Sob essa ótica, organismos geneticamente modificados (OGM), ou transgênicos, são considerados como promotores de riscos potenciais aos organismos não-alvo e à biodiversidade e, portanto, devem passar por uma análise de risco antes de sua liberação no ambiente (BRASIL, 2005).

A fim de avaliar o impacto de proteínas Bt com atividade contra insetos-praga sobre organismos não-alvo da transgenia, é necessário o desenvolvimento de métodos de bioensaio que simulem as rotas de exposição em laboratório dos organismos benéficos aos transgenes, além de permitirem o rastreamento das toxinas ao longo dos níveis tróficos. Esse tipo de método, em análises de risco ambiental de plantas geneticamente modificadas (GM), é importante tanto para testes anteriores ou posteriores à transformação da planta quanto para o estabelecimento de novos eventos por estaqueamento.



## 1.1. Cotonicultura

O algodoeiro (*Gossypium* spp. L.) (Malvaceae) está entre as culturas de fibras mais importantes no mundo, ocupando cerca de 35 milhões de hectares (ha) (ASSOCIAÇÃO, 2012). O Brasil ocupa posição de destaque no mercado da fibra, sendo o quinto maior produtor, com mais de 1,8 milhão de toneladas colhidas na safra recorde de 2011/12, o terceiro maior exportador e o quinto maior consumidor, com quase um milhão toneladas/ano. A área plantada na safra 2011/12 foi de quase 1.400 ha (BRASIL, 2012).

Há diversas pragas associadas a essa cultura, causadoras de danos em diferentes estágios da produção, gerando perdas e gastos significativos no custo da produção (RICHETTI, 2007). A composição das pragas pode variar conforme a região, apresentando artrópodes, doenças causadas por vírus e fungos e por problemas derivados da competição com ervas daninhas.

Entre os artrópodes, as espécies mais importantes são: o pulgão *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae), a lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), o curuquerê-do-algodoeiro *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) na fase vegetativa; o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), a lagarta-das-maçãs *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta-rosada *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) durante a fase reprodutiva (FONTES et al., 2006; FERREIRA et al., 2008).

O controle dessas pragas é costumeiramente realizado através de diversas aplicações de inseticidas sintéticos, um processo de alto custo ao produtor e ao ambiente (RAMALHO; DIAS, 2003). Porém, o uso de algodão GM resistente a insetos em países como México, China e Índia resultou em menor aplicação de agrotóxicos (QAIM; ZILBERMAN, 2003; TOENNIESSEN et al., 2003), enquanto nos Estados Unidos observou-se maior abundância de predadores (SISTERSON, et al., 2007) nos cultivos de algodão Bt quando comparados ao algodoeiro não-Bt.

O bicudo, praga-chave do algodoeiro no Brasil, é um dos principais responsáveis pelas 12 a 20 aplicações de inseticidas realizadas por safra (FONTES et al., 2006). Dessa forma, o desenvolvimento de uma variedade resistente a este inseto tem importância estratégica para o manejo de pragas da cultura, para a redução do impacto pelo uso de pesticidas e a manutenção da competitividade do país como produtor e exportador de algodão no cenário internacional.

Nesse contexto, a Embrapa, visando buscar genes e moléculas ativas contra *A. grandis*, obteve a proteína recombinante Cry8Ka5, expressa em *Escherichia coli*, com atividade contra larvas dessa praga, demonstrando seu potencial no controle desse inseto (OLIVEIRA et al., 2011).

## 1.2. Toxinas Cry

As proteínas Cry, ou  $\delta$ -endotoxinas, são cristais parasporais com efeitos inseticidas produzidos por *B. thuringiensis* (Bt) durante sua esporulação. Essas proteínas fazem parte de um grupo com atividade contra diferentes ordens de insetos, tais como Lepidoptera, Coleoptera, Himenoptera e Diptera, além de nematoides (SCHNEPF et al., 1998), apresentando elevada especificidade no controle de organismos-alvo (NARANJO, 2011).

Para que haja ação tóxica, as toxinas Cry devem interagir com receptores específicos localizados nas proteínas periféricas das membranas das microvilosidades das células do epitélio do intestino médio do inseto (*brush border membrane vesicles*, BBMV), formando poros que promovem a lise da célula e ruptura do epitélio intestinal (BRAVO et al., 2007) ou apoptose da célula-alvo (ZHANG et al., 2006), causando a morte do organismo-alvo.

A fim de reduzir a probabilidade de evolução de resistência, dois ou mais genes para proteínas inseticidas são introduzidos em uma mesma linhagem (TARVER et al., 2007), como o algodão Bollgard II® da Monsanto, que expressa Cry1Ac e Cry2Ab2 e o algodão Widestrike®, desenvolvido pela Dow Agrosiences, que expressa Cry1F e Cry1Ac (GATEHOUSE et al., 2011), sendo o último aprovado para comercialização no Brasil pela CTNBio em 2009.

O transporte de proteínas Bt do corpo da presa/hospedeiro aos predadores e parasitoides tem sido investigado como rota potencial de exposição e causadora de impacto em insetos não-alvos das plantas Bt (HEAD et al. 2001; BERNAL et al. 2002; DUTTON et al. 2003; TORRES et al. 2006; TORRES; RUBERSON, 2008).

## 1.3. Avaliação de risco ambiental

A preocupação com os potenciais riscos ecológicos da liberação no ambiente de plantas GM sobre a biodiversidade foi apresentada formalmente através de um documento preparado pela Sociedade Ecológica Americana (ESA) em 1989 (MOONEY; RISSER, 1989; TIEDJE et al., 1989).

Onze anos depois, um grupo de 64 países ratificou, por intermédio da Conferência das Partes para a Convenção sobre a Diversidade Biológica, o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, que dispõe sobre a avaliação do risco ambiental da liberação de Organismos Vivos Geneticamente Modificados visando à proteção da diversidade biológica dos países e regiões. Segundo esse protocolo, os benefícios provenientes da biotecnologia serão maximizados quando os riscos potenciais de danos diretos e indiretos sobre a diversidade local de espécies forem devidamente avaliados. Para tanto, as avaliações deverão considerar as: i) características expressas pelo gene inserido; ii) o organismo transformado e iii) o ambiente onde o mesmo será liberado (CBD, 2000). Nosso país também é signatário e ratificou o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, dentro do escopo da Convenção da Diversidade Biológica.

No Brasil, a Lei de Biossegurança N° 11.105/2005 determina que o uso de organismos geneticamente modificados (OGM) deve ser autorizado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). A Resolução Normativa n° 05 da CTNBio, de 12 de março de 2008, dispõe sobre normas para liberação comercial de OGM, os quais devem ser submetidos à avaliação de risco a fim de identificar e avaliar os efeitos adversos potenciais do OGM e seus derivados na saúde humana e animal, no ambiente e nos vegetais, mantendo a transparência, o método científico e o princípio da precaução. Por risco entende-se como a probabilidade de ocorrência de qualquer efeito adverso (BRASIL, 2005).

A análise de risco ambiental de culturas resistentes a insetos-praga apresentados nas solicitações para liberação comercial desses eventos tem mudado gradualmente da avaliação de um conjunto específico de espécies "indicadoras" de potenciais efeitos ambientais adversos para um direcionamento da avaliação de danos potenciais (terminais de risco) (SNOW et al., 2005;. ANDOW; ZWAHLEN, 2005).

O objetivo dessa mudança é permitir uma avaliação mais direta dos possíveis danos a organismos não-alvo e à diversidade biológica causada por uma cultura GM, visto que o modo com que as plantas GM podem afetar os organismos não-alvo varia consideravelmente entre eventos de transformação.

A exposição às toxinas pode ocorrer através de resíduos liberados da planta acima ou abaixo do solo (ZWAHLEN et al., 2003), das folhas e exsudados das raízes (SAXENA; STOTZKY, 2000), do pólen (LOSEY et al., 1999) e outras partes que expressam a toxina Bt, como as flores e nectários extra-florais, sementes e floema (ANDOW; HILBECK, 2004, BURGIO et al., 2007).

Uma vez que a análise de risco ambiental baseada na avaliação de todas as espécies não-alvo de uma planta GM é impraticável, dada a grande diversidade de espécies associadas à cultura, a avaliação de risco pode ser conduzida através da escolha de espécies representativas de categorias funcionais e processos do ecossistema. Além disso, deve ser identificada a forma de exposição e os possíveis efeitos adversos, para que sejam geradas hipóteses cientificamente testáveis sobre como o risco pode ocorrer e desenvolvendo experimentos que testem tais hipóteses (ANDOW et al., 2006).

Seguindo essa abordagem, entre as mais de 90 espécies associadas à cultura do algodoeiro no Brasil, foram priorizados grupos funcionais que executassem importantes serviços ecológicos para a avaliação de risco ecológico da introdução de variedades de algodoeiro GM resistentes a insetos nos agroecossistemas por meio de matrizes de seleção, baseada no grau de exposição da espécie à toxina e significância de sua função ecológica (HILBECK et al., 2006).

As espécies priorizadas são: *A. gossypii*, *S. frugiperda*, *A. grandis* e *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) entre os herbívoros (SUJII et al., 2006); *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae) entre os polinizadores (ARPAIA et al., 2006); crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) e coccinelídeos (Coleoptera: Coccinellidae) entre os predadores (FARIA et al., 2006); *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Catolaccus grandis* (Hymenoptera: Pteromalidae) entre os parasitoides (PALLINI et al., 2006) e minhocas (Haplotaxida: Lumbricidae) no solo (MENDONÇA-HAGLER et al., 2006).

No presente estudo, o grupo funcional escolhido para estabelecimento de um bioensaio laboratorial de avaliação de risco ambiental de algodoeiro resistente a lepidópteros e ao bicudo, foi o de predadores. O controle biológico natural de pragas por predadores foi considerado um serviço do ecossistema relevante tanto no aspecto de conservação da diversidade local de espécies como no controle biológico natural de pragas (ANDOW, 2011).

#### **1.4. Coccinelídeos**

Aproximadamente 490 gêneros e 4.200 espécies de coccinelídeos (joaninhas) têm sido descritos e, entre estas espécies, 90% são consideradas benéficas, principalmente por sua ação predadora contra pulgões, cochonilhas, moscas-brancas e ácaros (IPERTI, 1999). As joaninhas estão entre os agentes de controle biológico mais

especializados no consumo do pulgão *A. gossypii*, podendo representar mais de 50% dos predadores presentes no algodoeiro (SILVA-SANTOS et al., 2005).

As joaninhas podem ser expostas diretamente às toxinas expressas nas plantas GM ao se alimentarem de pólen das plantas modificadas ou indiretamente ao realizarem o controle biológico natural dos pulgões, uma vez que esses insetos fitófagos ingerem as toxinas quando se alimentam da seiva (FARIA et al., 2006).

Tal exposição às toxinas pode causar alterações em sua bionomia (como redução da sobrevivência, fecundidade e longevidade ou aumento do período de desenvolvimento larval), podendo ter um impacto negativo sobre esse importante serviço do ecossistema (ZHANG et al., 2006). Isso possibilitaria a ressurgência de pragas primárias e o crescimento de populações de pragas secundárias (HODEK; HONEK, 1996), elevando-as ao status de pragas primárias, causando danos à cultura e exigindo maior uso de agrotóxicos.

A joaninha *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) é uma das espécies afidófagas mais abundantes entre os coccinelídeos nos agroecossistemas brasileiros e, portanto, um importante agente de controle biológico natural de pulgões em algodoeiros, um fitófago-praga dessa cultura (SOUZA, 2004, FARIA et al., 2006).

Işikber e Copland (2002) mostraram que *C. sanguinea* se desenvolve bem quando alimentada com *A. gossypii*, *Aphis fabae* (Hemiptera: Aphididae) ou *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). Aparentemente, esses pulgões satisfazem todos os requisitos nutricionais de *C. sanguinea* para o desenvolvimento larval e conclusão do ciclo, constituído de ovo, larva que passa por quatro estádios, pupa e adulto (HODEK, 1973). O consumo dos pulgões é realizado tanto pelo estágio larval quanto pelo adulto de *C. sanguinea* (IŞIKBER; COPLAND, 2002).

A escolha da espécie *C. sanguinea*, realizada através da matriz de seleção, se mostra adequada para a avaliação do controle biológico natural de pragas como serviço do ecossistema, já que se trata de uma espécie indicadora dos serviços de controle biológico de pragas exercido por predadores generalistas.

## **1.5. Afídeos**

Os afídeos são insetos herbívoros sugadores de seiva bastante diversificados, possuindo cerca de 4.700 espécies distribuídas ao redor do mundo, sendo aproximadamente 450 delas encontradas em plantas cultivadas. Porém, apenas 100

dessas espécies exploram de forma eficaz o ambiente agrícola a ponto de causar danos econômicos (EMDEN; HARRINGTON, 2007).

O grupo de afídeos mais importante para a agricultura se encontra na subfamília Aphidinae que, além de ser a maior subfamília, contém grande quantidade de espécies que se alimentam de plantas herbáceas, como aquelas dos gêneros *Aphis* e *Myzus*, especialmente (BLACKMAN; EASTOP, 2006).

O gênero *Aphis* contém aproximadamente 400 espécies, sendo 11% delas pragas de diferentes culturas (WILLIAMS; DIXON, 2007), incluindo a espécie *A. gossypii*, conhecido como pulgão do algodoeiro ou pulgão do melão. Os indivíduos dessa espécie são pequenos, com coloração variando desde o amarelo pálido até o preto e sua reprodução podendo ocorrer continuamente por partenogênese telítica. Atacam culturas de algodão, pepino, citros, café, cacau, berinjela, pimenta, batata, quiabo e muitas plantas ornamentais, como crisântemo e hibisco, podendo transmitir-lhes mais de 50 vírus (BLACKMAN; EASTOP, 2006).

O gênero *Myzus* tem menos espécies, algo em torno de 55, mas com uma proporção maior de pragas, aproximadamente 24% delas (WILLIAMS; DIXON, 2007), incluindo a espécie *M. persicae*. Essa espécie é cosmopolita, polífaga, eficiente vetor viral e possui grande variedade de cor, ciclo de vida, interação com a planta hospedeira e métodos para resistir aos inseticidas empregados em seu controle. A população de adultos ápteros é basicamente composta de fêmeas partenogênicas. Tem grande importância econômica por ser eficaz vetor capaz de transmitir mais de 100 vírus para plantas (BLACKMAN; EASTOP, 2006).

Alguns estudos de campo que avaliaram os efeitos do algodoeiro Bt sobre a abundância de pulgões e outros hemípteros não mostraram diferenças na abundância de afídeos entre culturas modificadas e não modificadas (SISTERSON et al., 2004, WHITEHOUSE et al., 2005), enquanto outros demonstraram maior abundância de pulgões em parcelas de algodoeiro Bt (DAYUAN, 2002; DENG et al., 2003). Embora afídeos geralmente não sejam o principal alvo das aplicações de inseticidas na cultura do algodoeiro, o advento de variedades de algodoeiro Bt para resistência lagartas-praga pode aumentar sua importância no futuro (DEWAR, 2007).

Liu et al. (2005), em laboratório, mostraram que pulgões alimentados com algodoeiro Bt apresentaram maior capacidade reprodutiva e maiores taxas de sobrevivência em comparação aos indivíduos alimentados com algodoeiro não-Bt, com possível impacto sobre a dinâmica populacional da espécie.

Os pulgões utilizados nessa dissertação, *A. gossypii* e *M. persicae*, são afídeos com amplo espectro de plantas hospedeiras, mas comumente associados à cotonicultura (BLACKMAN; EASTOP, 2006), justificando seu uso como rota de exposição das toxinas Cry selecionadas.

### **1.6. Dietas artificiais**

Em trabalhos de Biossegurança Ambiental, é relevante analisar os riscos potenciais de proteínas tóxicas antes da liberação comercial ou mesmo da existência do evento elite (ANDOW et al., 2006). Baseado nisso, são necessárias criações de insetos em dietas artificiais bem estabelecidas em laboratório, a fim de simular uma via de exposição em bioensaios bitróficos e tritróficos de toxicidade, em que esteja assegurada a presença das toxinas em dietas oferecidas direta ou indiretamente às joaninhas, de forma a garantir que sejam consumidas pelo predador.

Para tanto, é importante o desenvolvimento de formas que se aproximem das rotas naturais de exposição das toxinas e que quantidades conhecidas de proteína purificada possam ser introduzidas em uma dieta artificial e medidas ao longo da rota de exposição até o consumidor final.

O conhecimento dos ingredientes de uma dieta artificial adequada tanto para a fase larval quanto para a fase adulta de um inseto é fundamental para a manutenção do nível populacional constante de espécies de interesse em laboratório (PARRA, 1998). Muitos estudos têm sido realizados no estabelecimento dos padrões ecológicos e das necessidades nutricionais para aumentar a eficiência de insetos entomófagos (MOHAGHEGH; AMIR-MAAFI, 2007), visando desde a criação em pequena escala para pesquisas básicas até a criação massal a nível comercial (PARRA, 2009).

Além da utilização em programas de controle biológico, dietas artificiais para inimigos naturais podem ser utilizadas em bioensaios para análise de risco ambiental em situações em que inexistente a planta geneticamente modificada, mas a proteína expressa pelo transgene já esteja disponível para testes de biossegurança. Nessas situações, é essencial que haja uma criação em laboratório de insetos predadores em dietas artificiais em quantidade e qualidade suficientes para a realização de bioensaios onde seja possível simular as rotas de exposição dos insetos a moléculas exógenas através da alimentação. Dessa forma, toxinas podem ser testadas adicionando-se na dieta doses conhecidas tornando os bioensaios confiáveis à avaliação dos possíveis efeitos letais e subletais sobre os insetos não-alvo da transgenia (FARIA et al., 2006).

### 1.6.1. Dieta artificial sólida para criação de coccinelídeos

Apesar dos conhecimentos biológicos e das técnicas de criação permitirem a melhoria na qualidade dos insetos predadores, a disponibilidade de dietas artificiais adequadas representa um fator limitante na criação massal de insetos afidófagos da família Coccinellidae (SOARES et al., 2004; De CLERCQ et al., 2005).

Segundo Hodek et al. (1978), o maior sucesso de dieta artificial para joaninhas foi registrado para a espécie polífaga *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae), entretanto, essa dieta não foi adequada quando testada em *C. sanguinea* (SZUMKOWSKI, 1961), possivelmente devido à carência de conhecimento sobre elaboração de uma dieta artificial para essa espécie e também devido à baixa plasticidade nutricional de *C. sanguinea* a diferentes fontes alimentares.

A espécie *C. maculata* foi o primeiro predador criado *in vitro* com dietas à base de fígado de porco gerando descendência fértil (ATTALLAH; NEWSON, 1966). Recentemente, Silva et al. (2010) mostraram que uma dieta à base de mel, levedo de cerveja, ácido ascórbico, ácido propiônico, ácido sórbico, Nipagin® e adicionada de água com ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) como presa alternativa para criação da joaninha *C. maculata* em laboratório permitiu que o inseto alcançasse o estágio adulto, porém a longevidade e reprodução dos adultos não foram avaliadas.

Smirnoff (1958) encontrou resultados satisfatórios na criação de larvas e adultos de joaninhas afidófagas, coccidófagas, acarófagas e micófagas quando alimentadas com uma dieta à base de geleia real, ágar, cana de açúcar, mel, trigo e água com adição de uma pequena quantidade de suas presas naturais. Resultados semelhantes foram encontrados por Chumakova (1962) na criação de *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) na mistura de presas naturais com uma variedade de substâncias.

Grenier et al. (1994) relataram quatro espécies de joaninha criadas em dieta artificial favorecendo sua disponibilidade comercial como agentes de controle biológico: *C. montrouzieri*, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) e *C. maculata*. Até o momento, o maior sucesso de dieta artificial foi desenvolvido por Hodek et al. (1978) para a espécie polífaga *C. maculata*, porém a mesma dieta não foi adequada quando testada para *C. sanguinea* (SZUMKOWSKI, 1961), possivelmente devido à carência de conhecimento sobre elaboração de uma dieta artificial para essa espécie e também devido à já



mencionada baixa plasticidade nutricional a diferentes fontes alimentares.

O efeito de diferentes dietas artificiais no ciclo de vida de *C. sanguinea* foi avaliado a fim de que fossem utilizadas como via de exposição tritrófica em bioensaios de toxicidade e potenciais impactos de toxinas sobre esse predador.

### **1.6.2. Dieta líquida e sistema artificial para criação de afídeos**

A possibilidade de criação de pulgões em um substrato nutritivo uniforme tem sido explorada desde 1930 por Hamilton, que os alimentaram com fluidos através de uma membrana natural (epiderme cebola). A possibilidade começou a tornar-se realidade somente depois de três décadas, quando Mittler e Dadd (1962) e Auclair e Cartier (1963) publicaram dietas totalmente artificiais para *M. persicae* e *A. pisum*, respectivamente. Ambos utilizaram Parafilm® M esticado como membrana.

Em 1965, Dadd e Mittler apresentaram uma dieta melhor adaptada e amplamente utilizada para várias espécies de pulgões. Ainda assim, por muitos anos a dieta não conseguiu sustentar qualquer espécie de forma permanente. Em 1976, uma colônia de *M. persicae* foi iniciada em dieta totalmente artificial na Universidade de Reading, Inglaterra, que persiste viável apesar de não ter tido contato com plantas por mais de 30 anos (DOUGLAS; EMDEN, 2007).

Para aprimorar o método de avaliação de toxicidade e potenciais impactos de proteínas Bt ao predador *C. sanguinea*, foi avaliada a viabilidade do uso de uma dieta artificial líquida para pulgões (DOUGLAS; EMDEN, 2007) como via de exposição tritrófica sobre larvas e adultos desse coleóptero, por simular uma rota de exposição ecológica para o predador não-alvo em estudo e por complementar os estudos de Nakasu et al. (2013) e Ferreira et al. (2008).

## **2. Objetivos**

Desenvolver um método que, além de simular as condições naturais de exposição de endotoxinas expressas por plantas GM, em uso e com potencial uso, a predadores não-alvo por meio de dietas artificiais, permita o rastreamento dessas proteínas ao longo da cadeia trófica, a fim de comprovar sua transmissão e permitir uma avaliação em laboratório de seu impacto sobre a bionomia desses organismos e possíveis consequências sobre a sua função ecológica.

## 2.1. Objetivos específicos

- Adaptar e aperfeiçoar métodos de criação em laboratório do coleóptero predador *C. sanguinea* em dieta artificial sólida.
- Adaptar e aperfeiçoar métodos de criação em laboratório dos pulgões *A. gossypii* e *M. persicae* em dieta artificial líquida.
- Estabelecer uma rota de exposição de endotoxinas expressas por OGM, em uso e com potencial de uso, através de bioensaios bitróficos ou tritróficos artificiais para o organismo não-alvo *C. sanguinea*.
- Avaliar os efeitos letais ou sub letais e potenciais impactos das toxinas Cry8Ka5, Cry1Ac e Cry1F sobre o organismo não-alvo *C. sanguinea*.

## 3. Hipóteses

- 1 - Um sistema bitrófico ou tritrófico artificial para exposição de toxinas Bt para predadores não-alvo pode viabilizar a análise de risco sobre insetos predadores não-alvo em laboratório, mesmo antes da obtenção da planta transformada.
- 2 - As endotoxinas expressas por plantas GM, em uso e com potencial de uso, são passíveis de serem transmitidas ao longo dos níveis tróficos a partir de dietas artificiais para coccinelídeos ou para afídeos.
- 3 - As proteínas Cry8Ka5, Cry1Ac e Cry1F não afetam de forma letal ou subletal o inseto não-alvo *C. sanguinea*, isolada ou combinadamente.

## 4. Justificativa

Atualmente, a necessidade de identificação e priorização de espécies e processos ecossistêmicos para a avaliação de risco, ao invés do uso de espécies indicadoras padrão, se deu pelo fato dessas últimas nem sempre representarem aquelas que de fato estão associadas à cultura GM para resistência a pragas no ambiente receptor.

Entretanto, ainda não foi estabelecido um procedimento de análise do risco de plantas GM resistentes a insetos sobre espécies não-alvo em laboratório por meio de sistemas artificiais, seja para casos em que o OGM inexistente ou quando se deseja avaliar os efeitos de sinérgicos de endotoxinas estaqueadas.

Dessa forma, o presente trabalho buscou testar sistemas bitrófico e tritrófico artificiais para análise de risco de toxinas Bt sobre insetos não-alvo em laboratório. A toxina Cry8Ka5 foi utilizada por se tratar de um caso em que a planta modificada inexistente, permitindo avaliação *a priori* em laboratório. As toxinas Cry1Ac e Cry1F

foram selecionadas por representarem toxinas expressas em eventos de algodoeiro liberados para plantio comercial no Brasil, cujos efeitos, isolada ou combinadamente, ainda não possuem método de avaliação tritrófica para uso em bioensaios de laboratório.

## 5. Material e métodos

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecologia e Biossegurança da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, a menos que especificamente indicado no texto.

Todos os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada, regulada para  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, umidade relativa (UR) de  $60 \pm 10\%$  e 12 h de fotofase.

Os diferentes estágios de desenvolvimento dos pulgões *A. gossypii* e *M. persicae*, bem como larvas neonatas do predador *C. sanguinea* foram provenientes de colônias mantidas em sala de criação climatizada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR de  $60 \pm 10\%$  e 12 h de fotofase no Laboratório de Ecologia e Biossegurança.

Os diferentes estágios de desenvolvimento de *A. grandis* e *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) foram todos provenientes de colônias alimentadas com dieta artificial e mantidas em sala de criação climatizada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR de  $60 \pm 10\%$  e 12 h de fotofase no Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

As pesagens foram realizadas em balança semianalítica Toledo® Mettler AT200, com precisão de 0,1 miligrama, pertencente ao Laboratório de Semioquímicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

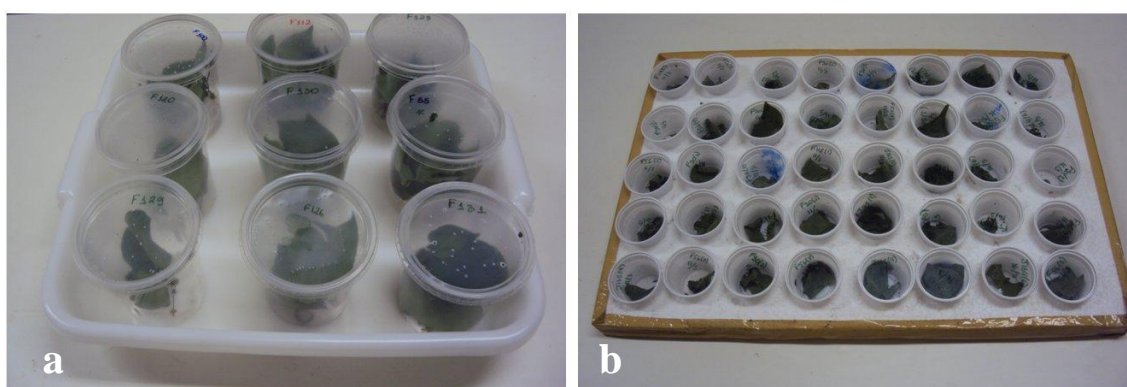
As variáveis observadas nos bioensaios utilizando as dietas artificiais sobre as joaninhas e os pulgões são aquelas que podem indicar o desempenho adequado da dieta aplicada em comparação à dieta natural de cada espécie, tais como o tempo de desenvolvimento do estágio imaturo, a probabilidade de sobrevivência em cada intervalo de idade, a taxa de fecundidade e a capacidade de predação.

As variáveis observadas nos testes de exposição do predador à toxina são aquelas que podem afetar a dinâmica das populações de *C. sanguinea*, como duração e mortalidade na fase larval, além da longevidade e fecundidade das fêmeas.

## 5.1. Criação dos insetos

### 5.1.1. Criação do coccinelídeo *C. sanguinea*

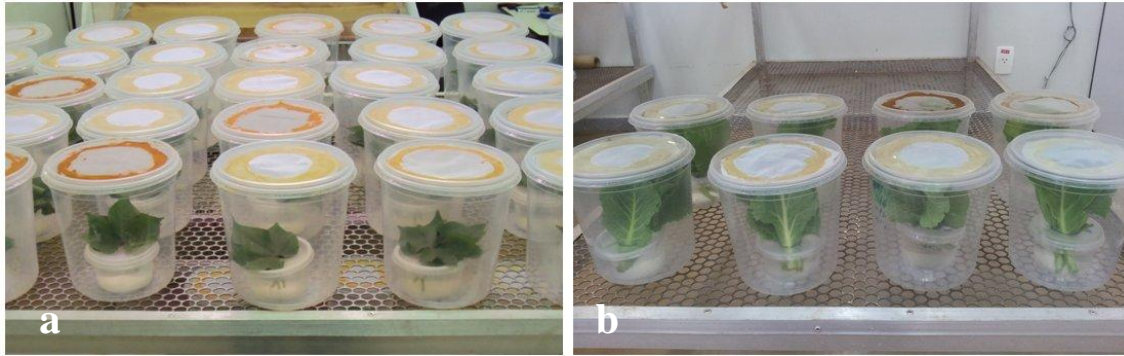
As joaninhas *C. sanguinea* foram criadas em casais acondicionados em recipientes plásticos de 500 mL (Figura 1a), recebendo manutenção a cada dois dias com uma dieta variada contendo os pulgões *A. gossypii* e *M. persicae* provenientes das colônias mantidas no Laboratório de Ecologia e Biossegurança, com adição esporádica de pulgões provenientes do campo, como *Uroleucon*, *Brevicoryne*, *Hyperomyzus* e *Lipaphis*, pólen de *Bidens pilosa* proveniente da área experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e solução de mel a 10%. As larvas foram individualizadas em recipientes de 50 mL (copo plástico) (Figura 1b) e alimentadas exclusivamente com os mesmos pulgões oferecidos *ad libitum*.



**Figura 1.** Criação de *C. sanguinea*: **a)** adultos em recipientes plásticos de 500 mL e **b)** larvas em recipientes plásticos de 50 mL.

### 5.1.2. Criação dos afídeos *A. gossypii* e *M. persicae*

Os pulgões *A. gossypii* e *M. persicae* foram criados em recipientes plásticos de 3 L, vedados com tela antiafídeo, contendo em seu interior um recipiente plástico de 250 mL com água em cujo orifício da tampa foram colocadas de três a cinco folhas jovens de algodoeiro (*G. hirsutum*) e de couve (*Brassica oleracea*) com seus pecíolos imersos em água (Figuras 2a e 2b, respectivamente). As folhas de ambas as espécies foram coletadas no campo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Duas a três folhas foram retiradas, a cada dois dias, para alimentação do predador, sendo imediatamente substituídas por novas folhas. Os pulgões também foram criados em sistema com dieta artificial líquida, descrita mais adiante.



**Figura 2.** Colônia de pulgões: **a)** *A. gossypii* criado em recipientes plásticos de 3 L contendo folhas do algodoeiro e **b)** *M. persicae* criado em recipientes plásticos de 3 L contendo folhas de couve.

## 5.2. Dietas artificiais

### 5.2.1. Desempenho de *C. sanguinea* em dieta artificial sólida

As dietas avaliadas foram elaboradas a partir de modificações feitas das dietas artificiais desenvolvidas por Bernardes et al. (2008) e Silva et al. (2010) para os coleópteros predadores *C. sanguinea* e *C. maculata*, respectivamente.

As dietas foram avaliadas em duas etapas. Primeiramente, cinco dietas de consistência pastosa foram testadas com alterações qualitativas e quantitativas dos ingredientes (Tabela 1); a Dieta 1, composta de mel, ágar, metilparabeno (Nipagin®), ácido sórbico e água, serviu como ponto de partida e foi modificada sequencialmente para a composição das demais dietas.

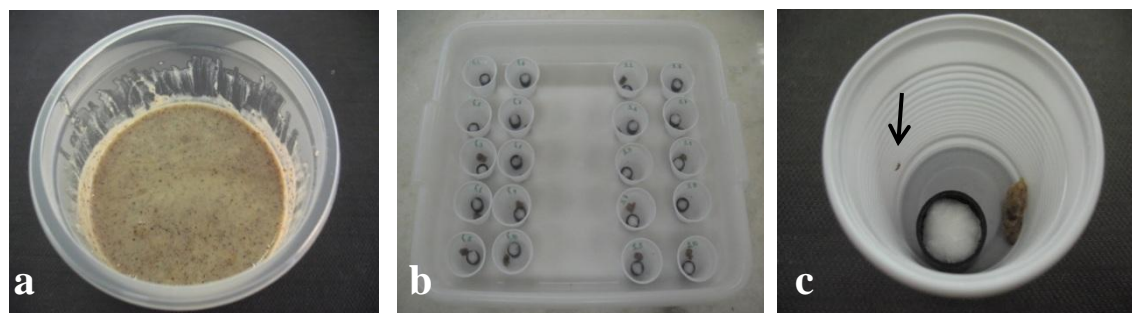
**Tabela 1.** Composição das dietas artificiais testadas preliminarmente para a criação de larvas e adultos de *C. sanguinea*, modificadas a partir de Bernardes et al. (2008) e Silva et al. (2010).

Componentes (massa / %)	Dietas artificiais									
	Dieta 1		Dieta 2		Dieta 3		Dieta 4		Dieta 5	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
Levedo de cerveja	-	-	-	-	-	-	3,8	11,9	3,8	11,5
Gérmen de trigo	-	-	-	-	-	-	6,3	19,8	6,3	19,2
Ovo desidratado	-	-	50,0	27,3	20,0	15,6	3,1	9,9	3,1	9,6
Mel	50,0	37,5	25,0	13,6	25,0	19,5	3,8	11,9	3,8	11,5
Leite condensado	-	-	-	-	-	-	1,9	5,9	1,9	5,7
Frutose	-	-	25,0	13,6	-	-	2,5	7,9	2,5	7,7
Ágar	3,0	2,3	3,0	1,6	3,0	2,3	1,0	3,2	1,0	3,1
<i>A. gossypii</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	3,1
Ácido ascórbico	-	-	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-
Ácido sórbico	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-
Nipagin®	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-
Água	80,0	60,0	80,0	43,6	80,0	62,3	9,4	29,6	9,4	28,7
Total	133,3	100,0	183,3	100,0	128,5	100,0	31,6	100,0	32,6	100,0

\*Proporção de pulgão *A. gossypii* na composição da dieta artificial.

A Dieta 2 foi produzida pela adição de ovo desidratado e frutose com redução na quantidade de mel. A Dieta 3 sofreu redução na quantidade de ovo desidratado, remoção da frutose e adição de ácido ascórbico. Para a composição da Dieta 4, levedo de cerveja, gérmen de trigo, leite condensado e frutose foram incorporados; ácido ascórbico, ácido sórbico e metilparabeno foram retirados; as proporções de ovo desidratado, mel e água foram reduzidas. A Dieta 5 sofreu adição de pulgões macerados da espécie *A. gossypii* criados em folhas de algodoeiro, *G. hirsutum*, mantidos congelados. Essas alterações foram realizadas a fim de diversificar os componentes e variar as concentrações de carboidratos, aminoácidos, vitaminas e anticontaminantes para aperfeiçoamento da dieta.

A dieta de consistência pastosa (Figura 3a) foi oferecida aos adultos e larvas *ad libitum* juntamente com um chumaço de algodão umedecido com água mineral disposto no fundo do recipiente. As larvas e adultos foram mantidos individualmente em recipientes (recipientes plásticos de 50 mL) com tampa acrílica transparente (Figura 3b). Tanto a dieta quanto o algodão umedecido foram trocados diariamente (Figura 3c).



**Figura 3.** Recipientes com dieta artificial para *C. sanguinea*: **a)** recipiente contendo a dieta recém-preparada, **b)** visão geral dos recipientes de criação contendo as larvas (um indivíduo por recipiente), **c)** larva de primeiro instar (em destaque) em recipientes de criação contendo dieta artificial e algodão umedecido.

A segunda etapa dos testes foi realizada com a preparação de mais quatro dietas artificiais, que diferiram em relação à primeira etapa na redução da proporção de leite condensado, gérmen de trigo e levedo de cerveja a fim de alterar a consistência da dieta e reduzir os níveis de carboidratos oferecidos. Além disso, houve adição do pulgão *A. gossypii* em diferentes proporções (0; 1,4; 2,8 e 10,2% de pulgão congelado) nas dietas testadas e no controle utilizado (pulgões frescos oferecidos *ad libitum* mantidos em folha de algodoeiro) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Composição de diferentes dietas artificiais, medidas em gramas, para a criação de larvas e adultos de *C. sanguinea*.

Componentes (massa / %)	Dietas artificiais									
	Controle	Dieta 6		Dieta 7		Dieta 8		Dieta 9		
			g	%	g	%	g	%	g	%
Levedo de cerveja	-	3,8	5,3	3,8	5,3	3,8	5,2	3,8	4,8	
Gérmen de trigo	-	6,3	8,9	6,3	8,8	6,3	8,6	6,3	8,0	
Ovo desidratado	-	3,1	4,4	3,1	4,4	3,1	4,3	3,1	4,0	
Mel	-	3,8	5,3	3,8	5,3	3,8	5,2	3,8	4,8	
Leite condensado	-	1,9	2,7	1,9	2,6	1,9	2,6	1,9	2,4	
Ágar	-	1,5	2,1	1,5	2,1	1,5	2,1	1,5	1,9	
<i>A. gossypii</i> <sup>1</sup>	<i>ad libitum</i> <sup>2</sup>	0,0	0,0	1,0	1,4	2,0	2,8	8,0	10,2	
Nipagin®	-	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	
Água	-	50,0	71,0	50,0	70,0	50,0	69,1	50,0	63,8	
Total	-	70,4	100,0	71,4	100,0	72,4	100,0	78,4	100,0	

<sup>1</sup>Proporção de pulgão congelado na composição da dieta artificial.

<sup>2</sup>Pulgão fresco oferecido à vontade.

Os pulgões congelados utilizados em todos os tratamentos foram conservados à temperatura de -20 °C por um período de no máximo trinta dias. O pulgão *A. gossypii*

foi o escolhido por ser considerado um alimento essencial ao desenvolvimento da espécie *C. sanguinea* (HODEK; EVANS, 2012).

Cada unidade experimental continha uma larva de primeiro instar, que foi transferida com auxílio de pincel número zero para cada um dos 10 tratamentos (nove dietas mais grupo controle) 12 h após a eclosão do ovo. Foram realizadas 40 repetições por tratamento. Os indivíduos foram designados a cada dieta de forma totalmente casualizada.

Após a emergência, os adultos foram sexados, casais foram formados e alimentados de acordo com o tratamento e mantidos no mesmo tipo de recipientes usados na fase larval. Foram mensuradas as seguintes variáveis: tempo de desenvolvimento larval (dias), duração da fase de pupa (dias), taxa de emergência, longevidade (dias), fecundidade dos adultos e viabilidade dos ovos.

A comparação entre a média global dos tratamentos foi feita por análise de variância (ANODEV) com modelos lineares generalizados (MLG) com distribuição de Poisson, por se tratar de dados de contagem. Devido à alta variabilidade presente nos dados, foi necessária uma correção no modelo de Poisson através do método de quasiverossimilhança, o que leva a denominação modelo quasipoisson, ajustado com a análise de resíduo, segundo diagnóstico do MLG realizado pelos envelopes de Paula (2004). Quando a ANODEV apontou diferença significativa entre os tratamentos, foram aplicadas comparações múltiplas por contraste (CRAWLEY, 2007) empregando o pacote ComS.R, o qual considera a estatística do qui-quadrado no contexto dos MLG. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2012).

### **5.2.2. Desempenho de *A. gossypii* e *M. persicae* em dieta artificial líquida**

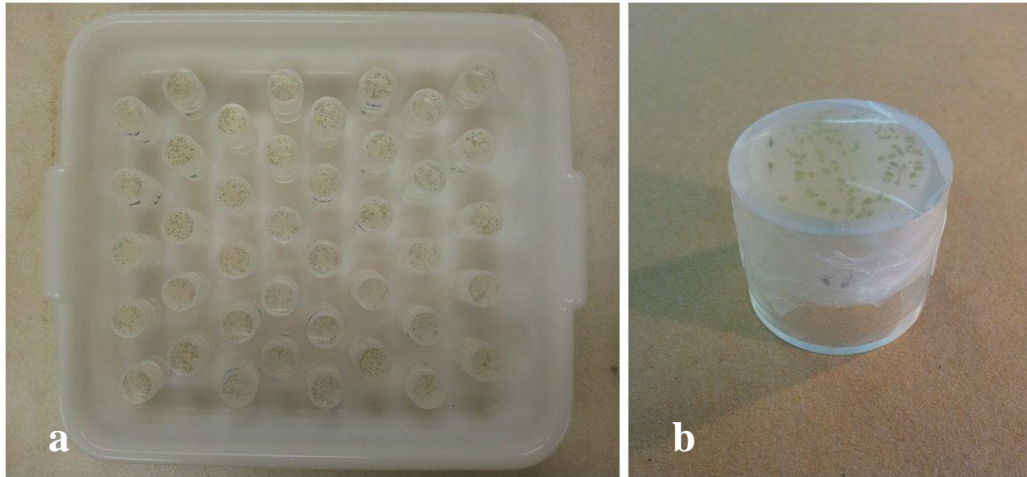
A composição e o modo de preparo da dieta líquida utilizada nos testes de criação de afídeos em sistema artificial foram baseados na descrição feita por Douglas e Emden (2007). A dieta é composta de 15% de sacarose (15 g), 2,4% de aminoácidos e 1,1% de outras substâncias, como vitaminas e sais, dissolvidos em água deionizada em quantidade suficiente para preparo de uma solução cujo volume final foi de 100 mL (Tabela 3). Cada partida produzida foi dividida em alíquotas de 50 mL, acondicionadas em tubos Falcon® e mantidas a -20°C por no máximo três meses antes de sua utilização.



**Tabela 3.** Componentes usados para preparo de 100 mL de dieta artificial líquida para *M. persicae* contendo 15 g de sacarose (DOUGLAS; EMDEN, 2007).

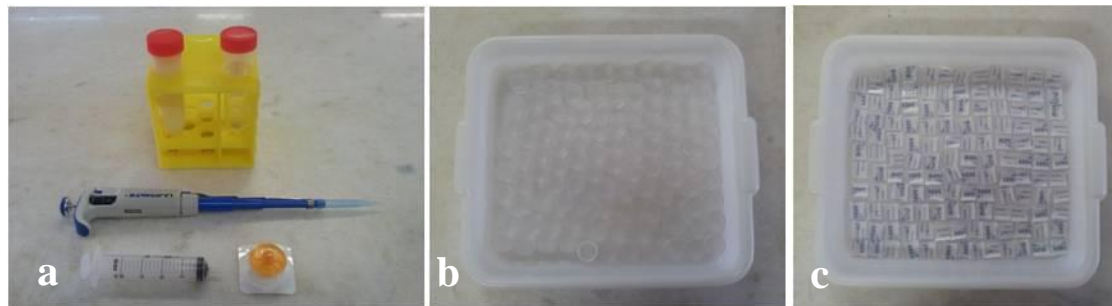
Componente Nutricional	Quantidade (mg)	Componente Nutricional	Quantidade (mg)
Hidrogeno-ortofosfato dipotássico	750,0	L-prolina	80,0
Sulfato de magnésio	123,0	L-serina	80,0
L-tirosina	400,0	L-treonina	140,0
L-hidrato de asparagina	550,0	L-valina	80,0
L-ácido aspártico	140,0	Ácido ascórbico	100,0
L-triptofano	80,0	Hidroclorato de aneurina	2,5
L-alanina	100,0	Riboflavina	0,5
L-monohidroclorato de arginina	270,0	Ácido nicotínico	10,0
L-hidroclorato de cisteína	40,0	Ácido fólico	0,5
L-ácido glutâmico	140,0	Ácido pantotênico	5,0
L-glutamina	150,0	Inositol (meso) ativo	50,0
L-glicina	80,0	Cloreto de colina	50,0
L-histidina	80,0	Edta de Fe(III)-Na quelado puro	1,5
L-isoleucina (allo free)	80,0	Edta de Zn-Na <sub>2</sub> quelado puro	0,8
L-leucina	80,0	Edta de Mn-Na <sub>2</sub> quelado puro	0,8
L-monohidroclorato de lisina	120,0	Edta de Cu-Na <sub>2</sub> quelado puro	0,4
L-metionina	40,0	Hidroclorato de pirridoxina	2,5
L-fenilalanina	40,0	Biotina-D cristalina	0,1

Os bioensaios foram realizados oferecendo 500 µL da dieta aos afídeos (*A. gossypii* e *M. persicae*) em sachês formados por duas lâminas de Parafilm® M fixadas a uma das extremidades de recipientes acrílicos transparentes de dimensões 30 x 25 x 3 mm (altura, diâmetro, espessura), com abertura em ambas as extremidades (Figura 4).



**Figura 4.** Colônia de *M. persicae* em dieta artificial líquida: **a)** bandeja de criação contendo recipientes com sachê de dieta artificial líquida; **b)** detalhe do recipiente.

Lâminas de Parafilm® M medindo 25 x 25 mm foram esterilizadas, juntamente com os respectivos recipientes, por radiação UV por 30 a 40 min em câmara de fluxo laminar. Alíquotas da dieta líquida recém-descongeladas foram transferidas, através de filtro antibacteriano de 0,45  $\mu\text{m}$ , para novos tubos Falcon® com auxílio de uma seringa de 20 mL (Figura 5).



**Figura 5.** Material utilizado para montagem da dieta artificial líquida para afídeos em sachês: **a)** pipeta, seringa, filtro e tubo Falcon®; **b)** bandeja com recipientes e **c)** bandeja com Parafilm® M.

A dieta foi depositada sobre a face esterilizada da primeira lâmina de Parafilm® M estendida sobre em uma das extremidades do recipiente acrílico com o auxílio de uma micropipeta P1000. Em seguida, a dieta foi aprisionada sob a face esterilizada de uma segunda lâmina de Parafilm® M, formando um sachê de dieta. Os recipientes acrílicos contendo os sachês de dieta foram mantidos novamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

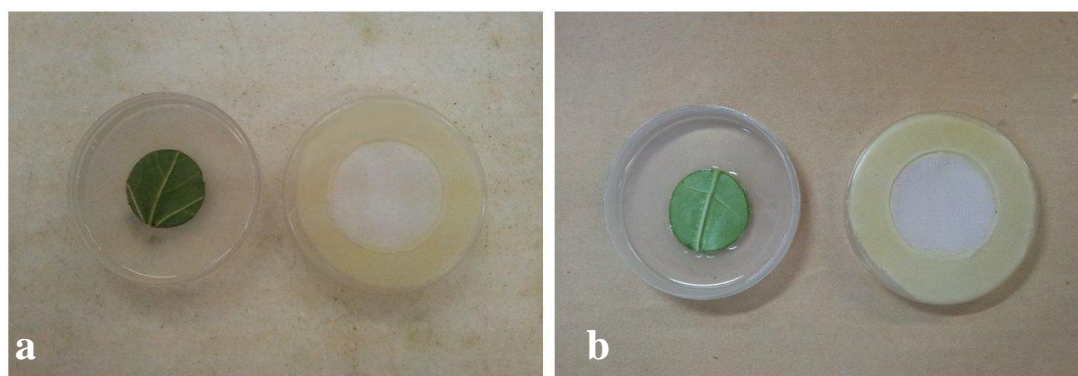
Como a dieta não continha conservantes, os recipientes acrílicos com sachê de dieta foram substituídos a cada 48 h através da fixação da extremidade aberta do recipiente de alimentação na extremidade aberta do recipiente recém-descongelado,

empregando uma tira de Parafilm® M medindo 25 x 10 mm. Para drenar a dieta mais antiga, a membrana superior do sachê do recipiente com os pulgões foi suavemente rompida com a ponta de uma agulha e o recipiente apoiado sobre papel absorvente. Os pulgões moviam-se naturalmente para o novo recipiente e o antigo era então removido (Figura 6).



**Figura 6.** Procedimento de troca da dieta artificial líquida para afídeos: **a)** recipiente em uso (esquerda), tira de Parafilm® M e recipiente novo; **b)** recipientes unidos pela tira de Parafilm® M; **c)** drenagem da dieta antiga (recipiente inferior) em papel absorvente.

Como dieta controle, empregada para avaliar e comparar o desempenho dos pulgões, foi utilizado um disco foliar de três centímetros (diâmetro) de algodoeiro (*G. hirsutum*) e de couve (*B. oleracea*), disposto sobre 15 mL de solução de ágar a 1% em placas de Petri de 6 cm de diâmetro, oferecido aos pulgões *A. gossypii* e *M. persicae*, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7.** Placas de Petri contendo disco foliar em ágar a 1%: **a)** de algodoeiro (*G. hirsutum*); **b)** e de couve (*B. oleracea*), oferecidos à *A. gossypii* e *M. persicae* como dieta controle, respectivamente.

Tanto para os pulgões *A. gossypii* quanto para *M. persicae*, realizou-se 30 repetições por tratamento, dispondo uma ninfa neonata (com menos de 24 h de vida), com auxílio de pincel número zero em cada recipiente acrílico, obtida de adultos ápteros mantidos em sala de criação. As ninfas foram observadas diariamente a fim de se

determinar os períodos pré-reprodutivo e reprodutivo, a fecundidade média e acumulada de cada indivíduo, sua longevidade e sua sobrevivência.

A comparação entre a média global dos tratamentos foi feita por análise de deviance (ANODEV) com modelos lineares generalizados (MLG) com distribuição de Poisson, por ser tratar de dados de contagem. Devido à alta variabilidade presente nos dados foi necessária uma correção no modelo de Poisson através do método de quasiverossimilhança, o que leva a denominação modelo quasipoisson, ajustado com a análise de resíduo, segundo diagnóstico de MLG realizado pelos envelopes de Paula (2004). Quando a ANODEV apontava diferença significativa entre os tratamentos, foram aplicadas comparações múltiplas por contraste (CRAWLEY, 2007) através do pacote Coms.R, o qual considera a estatística do qui-quadrado no contexto dos MLG. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2012). O mesmo programa foi utilizado para fazer as análises de sobrevivência, realizadas por análise de deviance para o modelo de Cox.

### **5.3. Testes de atividade biológica das toxinas Cry**

Visando garantir que os resultados dos testes de toxicidade fossem confiáveis, foram realizados bioensaios, utilizando insetos alvo, para avaliação da atividade biológica das toxinas Cry utilizadas.

#### **5.3.1. Teste de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo *A. grandis***

A atividade biológica da toxina Cry8Ka5, produzida via expressão heteróloga em *Escherichia coli*, já ativada (sem necessidade de posterior tripsinização) e semipurificada pela equipe do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia conforme descrito por Oliveira et al. (2011), foi avaliada em bioensaios contra o inseto-praga alvo bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*), empregando quatro diferentes lotes.

A concentração da toxina Cry8Ka5 dos diferentes lotes foi estimada pelo método de Bradford (1976). Para tanto, foram utilizados 2,5 µL de amostra, diluída 1:2, e 17,5 µL de tampão de ressolubilização para 1 mL de reagente de Bradford (1% (m/v) *Coomassie Brilliant Blue G-250*; 5% (v/v) etanol 95%; 10% (v/v) ácido fosfórico). A absorbância de cada amostra foi lida a 595 nm. O branco (controle) para as amostras foi feito com 20 µL do mesmo tampão de ressolubilização da amostra. Para a montagem da curva de calibração, 20 µL de cada padrão de albumina de soro bovino (BSA) nas

concentrações de 2,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL foram pipetados em microtubos separados. Para o preparo do branco da curva de calibração utilizou-se 20 µL de solução 0,9% de cloreto de sódio e 1 mM de azida sódica. Após a adição do reagente de Bradford, os microtubos foram agitados vigorosamente no vortex e incubados a temperatura ambiente por 5 min e a leitura feita imediatamente a 595 nm em espectrofotômetro SamrtSpec® Plus (Bio-Rad®).

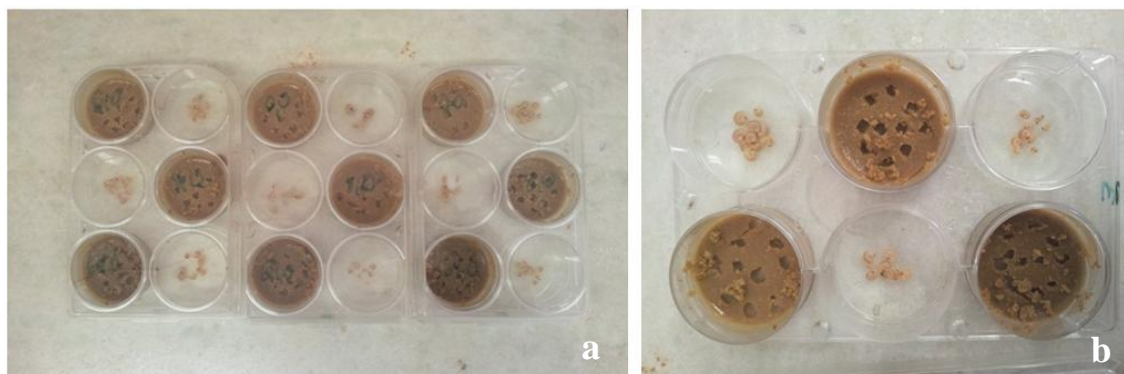
A concentração aferida da toxina nos diferentes lotes, o número de repetições e de indivíduos por repetição, o estágio de vida do bicudo utilizado (larvas recém-eclodidas ou ovos pré-eclosão), a temperatura da dieta na pré-inoculação da toxina e suas diferentes concentrações na dieta estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Estrutura dos testes de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo *A. grandis*.

Teste	Lote	Concentração (µg/mL)	Número de repetições*	Indivíduos/ repetição*	Estágio utilizado	Temperatura da dieta (°C)
1	1°	160	6	05	Larva	60
2	2°	160	2	10	Larva	60
3	2°	160	3	10	Larva	60
4	3°	239	3	10	Larva	50
5	4°	687	3	10	Ovo	50

\*Adequado em função da disponibilidade de insetos.

Os bioensaios foram realizados em placas de cultura de tecidos (NUNC®) contendo seis poços cada (Figura 8a), que foram preenchidos com 4 mL da dieta artificial de *A. grandis* (Tabela 5) acrescida de 1 mL de água destilada (tratamento controle) ou de solução da endotoxina Cry8Ka5 (tratamento teste).



**Figura 8.** Teste de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo *A. grandis*: **a)** visão geral das placas para cultura de tecidos NUNC® com seis poços; **b)** detalhe das larvas retiradas da dieta para verificação da mortalidade.

**Tabela 5:** Ingredientes para composição de 500 mL de dieta artificial para *A. grandis* (MONNERAT et al., 2000).

Componente	Quantidade (g)
Ágar	9,044
Levedo de cerveja	13,600
Proteína de soja	22,440
Gérmen de trigo	13,600
Ácido sórbico	0,544
Ácido ascórbico	4,522
Glicose	13,600
Nipagin®	0,442
Sais Minerais	0,264
Solução vitamínica	2,266

Obs.: Todos os ingredientes, exceto a solução vitamínica, foram autoclavados a 120°C por 15 min.

As concentrações de Cry8Ka5 na dieta utilizada para os testes de atividade biológica tiveram como ponto de partida a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) de 2,83 µg/mL obtida por Oliveira et al. (2011). Após a inoculação da toxina na dieta, seu resfriamento e solidificação, pequenos orifícios foram feitos com auxílio de uma agulha, cada um recebendo um indivíduo de bicudo (Teste 1) proveniente da colônia mantida em laboratório em dieta artificial, conforme método de Dias et al. (2002).

O tratamento foi comparado a dois grupos controle, em que o primeiro recebeu dieta artificial adicionada de água destilada e o segundo recebeu dieta artificial adicionada de extrato de proteínas constitucionais de *E. coli* obtidas no cultivo bacteriano sem indução da produção da toxina. A comparação com o segundo grupo foi realizada a fim de identificar possível efeito de proteínas e/ou compostos derivados do sistema de produção heterólogo (Tabela 6).

**Tabela 6.** Concentrações de toxina (µg/mL) Cry8Ka5 utilizados na dieta em cada teste de avaliação de atividade biológica sobre o inseto-alvo *A. grandis*.

Teste	Tratamentos					
1	controle	controle ( <i>E. coli</i> )*	2,5			
2	controle	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0
3	controle	1,25	2,5	5,0	20,0	
4	controle	2,0	4,0	8,0	16,0	
5	controle	8,0	64,0			

\*Dieta artificial para *A. grandis* adicionada de extrato de proteínas constitucionais de *E. coli*.

Os testes subsequentes foram realizados com algumas alterações, apresentadas a seguir. O Teste 2 foi realizado com o segundo lote recebido, diferindo do anterior no número de indivíduos (Tabela 4) e no número de pontos na curva de concentração (Tabela 6) aumentados a fim de que fossem testadas maiores concentrações da toxina. O Teste 3 representou um aperfeiçoamento do método aplicado no Teste 2, também realizado sobre o segundo lote, sofrendo aumento do número de repetições (Tabela 4) e modificação nos pontos da curva (Tabela 6) para verificar possíveis alterações nos resultados.

Sobre o terceiro lote repassado foi realizado o Teste 4, que sofreu alteração na temperatura da dieta (Tabela 4) pré-inoculação para evitar possível degradação da toxina. Por fim, o Teste 5 foi realizado sobre o quarto lote repassado, tendo sido alterado o estágio de vida do bicudo utilizado (Tabela 4), passando de larvas recém-eclodidas para ovos prestes a eclodir na tentativa de reduzir a mortalidade observada nos tratamentos controle.

Após sete dias, conforme Dias et al. (2002), foi realizada a contagem das larvas sobreviventes. As médias de mortalidade entre tratamentos foram comparadas por análise de variância (ANOVA), ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando o programa SigmaPlot versão 12.0.

### **5.3.2. Teste de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo *A. gemmatalis***

As toxinas Cry1Ac e Cry1F utilizadas nos bioensaios foram adquiridas purificadas (96%) e ativadas da Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, EUA (PUSZTAI-CAREY et al., 1994) na forma liofilizada (em pó).

Lagartas de segundo instar de *A. gemmatalis* (n = 30) mantidas em dieta artificial sólida (Tabela 7) foram utilizadas nos bioensaios de verificação de atividade das toxinas Cry1Ac e Cry1F isoladamente, sendo submetidas a três tratamentos em triplicata: (i) dieta artificial (controle); (ii) dieta artificial mais aplicação superficial de 200 µL de solução de Cry1Ac a 30 µg/mL; (iii) dieta artificial mais aplicação superficial de 200 µL de solução de Cry1F a 30 µg/mL.

**Tabela 7.** Composição da dieta artificial (780 mL) para *A. gemmatalis*. Todos os ingredientes foram autoclavados a 120°C por 15 min.

Componente	Quantidade (g)
Ágar	17,30
Levedo de cerveja	27,04
Proteína de soja	43,30
Gérmen de trigo	43,30
Feijão triturado	54,08
Leite em pó	64,50

A dieta, ainda quente e pastosa, foi vertida em cada recipiente (copos plásticos de 50 mL) até que cobrisse totalmente o fundo, em volume total equivalente entre os tratamentos. Após seu resfriamento e solidificação, houve a aplicação da solução contendo as toxinas sobre sua superfície (Figura 9a).



**Figura 9.** Sistemas utilizados para os testes de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo *A. gemmatalis*: **a)** recipiente contendo dieta e toxina; **b)** recipiente contendo apenas dieta.

As lagartas foram transferidas para os sistemas recém-preparados com as toxinas e, após 48 h, as sobreviventes de cada tratamento foram contadas e transferidas para recipientes contendo 1 cm<sup>3</sup> de dieta artificial solidificada livre de toxinas para que pudessem se alimentar por mais 48 h (Figura 9b), quando foi novamente verificada sua sobrevivência (SILVA-WERNECK; MONNERAT, 2001).

Não houve necessidade de fazer a comparação das médias de mortalidades para avaliar a atividade da toxina sobre o organismo-alvo testado, pois, além de se tratar de um teste qualitativo, todas as larvas estavam mortas na observação final.



#### **5.4. Ensaios de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F**

A concentração utilizada nos bioensaios com Cry1Ac teve como base o valor da expressão média da toxina em folhas do algodoeiro Bollgard®, de aproximadamente 3 µg/g de tecido foliar fresco (BRASIL, 2005). Esse valor foi aumentado em 10 vezes e, dessa forma, a concentração da toxina na dieta foi de 30 µg/mL.

Para a combinação de Cry1Ac e Cry1F, a concentração utilizada no bioensaio de exposição foi baseada na expressão média encontrada no algodoeiro WideStrike®, de aproximadamente 2 e 7 µg/g de tecido foliar fresco, respectivamente (SIEBERT et al., 2009), as quais novamente foram aumentadas em 10 vezes. Dessa forma, a concentração das toxinas na dieta foi de 20 µg/mL e 70 µg/mL para Cry1Ac e para Cry1F, respectivamente.

##### **5.4.1 Ensaio de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F sobre os pulgões via sistema bitrófico**

A avaliação de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F sobre *A. gossypii* não foi realizada devido ao fato dessa espécie não ter se desenvolvido satisfatoriamente na dieta artificial líquida. Por restrição na quantidade disponível de Cry1F, houve avaliação apenas da toxicidade Cry1Ac sobre *M. persicae*.

Para o ensaio de toxicidade de Cry1Ac sobre o pulgão *M. persicae*, a toxina foi oferecida via dieta artificial líquida na concentração de 30 µg/mL, em conjunto com o teste de desempenho desse inseto à dieta artificial líquida, utilizando a mesma estrutura de testes e com a observação dos mesmos parâmetros expostos no item 5.2.2.

##### **5.4.2. Ensaio de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F sobre o predador via sistema tritrófico**

Para a avaliação de possível efeito das toxinas sobre o predador *C. sanguinea*, foi utilizado o sistema artificial de criação do pulgão *M. persicae* em dieta líquida para simular uma via de exposição tritrófica. Dessa forma, quantidades conhecidas das toxinas puderam ser oferecidas aos pulgões e estes, por sua vez, oferecidos ao predador em diferentes tratamentos.

Utilizando esse sistema tritrófico, os seguintes alimentos foram oferecidos às joaninhas: (i) pulgões *M. persicae* alimentados com folha de couve (*B. oleracea*) (controle); (ii) pulgões *M. persicae* alimentados com dieta artificial líquida (controle); (iii) pulgões *M. persicae* alimentados com dieta artificial líquida adicionada de 30

$\mu\text{g/mL}$  de Cry1Ac e (iv) pulgões *M. persicae* alimentado com dieta artificial líquida com adição de 20 e 70  $\mu\text{g/mL}$  de Cry1Ac e Cry1F, respectivamente.

A quantidade de pulgões oferecida foi de 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 50 e 30 indivíduos para o 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º e 10º dias de desenvolvimento das larvas de joaninha, respectivamente. Tais quantidades foram estabelecidas a partir de testes preliminares de consumo.

Foram empregadas 12 repetições por tratamento, com uma larva de primeiro instar de *C. sanguinea* por repetição. Os indivíduos foram observados diariamente até o período de pré-pupa, verificando-se a quantidade de pulgões predados, duração de todo o período larval e a massa de cada indivíduo ao atingir o estágio de pré-pupa.

A comparação entre a média global dos tratamentos foi feita por análise de deviança (ANODEV) com modelos lineares generalizados (MLG) com distribuição de Poisson, pois trata-se de dados de contagem. Devido à alta variabilidade presente nos dados, foi necessária uma correção no modelo de Poisson através do método de quasiverossimilhança, o que leva a denominação modelo quasipoisson, ajustado com a análise de resíduo, segundo diagnóstico do MLG realizado pelos envelopes de Paula (2004). Quando a ANODEV apontou diferença significativa entre os tratamentos, foram aplicadas comparações múltiplas por contraste (CRAWLEY, 2007) através do pacote ComS.R, o qual considera a estatística do qui-quadrado no contexto dos MLG. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2012).

#### **5.4.3. Detecção e quantificação das toxinas Cry1Ac e Cry1F nos diferentes níveis tróficos**

Para a avaliação da possível transmissão trófica das toxinas ao inseto não-alvo da transgenia, *C. sanguinea*, foi realizado outro bioensaio adotando a mesma estrutura apresentada no item 5.4.2. Porém, nesse bioensaio, as larvas, ao atingirem o estágio de pré-pupa, foram coletadas para a detecção e a quantificação das toxinas. As larvas foram observadas diariamente para determinação do tempo de desenvolvimento em cada estágio, tempo total de desenvolvimento e massa de cada indivíduo ao atingir o estágio de pré-pupa.

A exposição das toxinas Cry1Ac e Cry1F à *C. sanguinea*, como descrito no item 5.4.2, foi realizada a partir da adição das toxinas em quantidades conhecidas à dieta artificial líquida para pulgões, os quais após sete dias foram oferecidos aos predadores.

A exposição à Cry1Ac isoladamente foi repetida em três bioensaios idênticos, realizados em momentos distintos. Já a exposição à Cry1Ac combinada à Cry1F foi repetida em dois bioensaios iguais entre si, realizados em momentos distintos.

Ao final do bioensaio de exposição, foram coletadas amostras de dieta (300 µL), todos os pulgões remanescentes (entre 50 e 150 indivíduos) e a pré-pupa do predador de cada recipiente. Essas amostras foram transferidas para microtubos de 2,0 mL e acondicionados a -20°C até a realização dos testes de detecção e quantificação das toxinas por ELISA através dos kits comerciais. Para detecção de Cry1Ac/Ab e Cry1F, foram usados kits PathoScreen®, adquiridos da Agdia Inc. Os testes de ELISA foram realizados separadamente para cada toxina. A coleta da dieta foi realizada com auxílio de uma pipeta P1000 diretamente dos sachês. Os pulgões foram coletados, com auxílio de pincel número zero, e pesados em *pool* em balança semianalítica antes de serem armazenados. As pré-pupas foram coletadas e pesadas em balança semianalítica individualmente.

Para a detecção e quantificação das toxinas na dieta, três amostras foram utilizadas provenientes do grupo controle e também de cada tratamento, sendo diretamente aplicadas nas placas de ELISA (100 µL por poço) em duplicata ou triplicata. Para a detecção e quantificação das toxinas nos insetos houve necessidade de realizar extração proteica. Para tanto, três amostras de pulgões, com aproximadamente 30 mg cada, e três amostras de pré-pupas, com aproximadamente 40 mg cada, foram maceradas em solução salina fosfatada e adicionada de Tween (PBST), fornecida nos kits, na proporção de 1:1 até 1:4 de massa de inseto por volume de solução.

Os tubos com os insetos macerados foram centrifugados a 10.621xg a 4°C por 15 min e o sobrenadante foi transferido para novos tubos, sempre mantidos em gelo. Uma alíquota de 5 µL foi retirada de cada amostra do sobrenadante para quantificação proteica por Qubit (Invitrogen®) de acordo com o método indicado pelo fabricante. Após a quantificação proteica, a concentração final de proteína nas amostras foi normalizada para 0,09 mg/mL até 1,68 mg/mL com adição de PBST, e 100 µL foram aplicados, em duplicata ou triplicata, em poços das placas de ELISA.

Para a quantificação proteica pelo método fluorescente por Qubit, 1 µL de amostra foi adicionada a 199 µL de solução de uso (obtida da adição de 1 µL de reagente *Quant-iT* a 199 µL de *Buffer Quant-iT*) e incubadas por 15 min à temperatura ambiente, após serem agitadas em vortex. Para a montagem da curva de calibração, 10 µL dos padrões 0, 200 e 400 ng/µL foram adicionados a 190 µL de solução de uso.

A quantificação dos níveis de toxinas nas amostras foi determinada através das leituras de absorvância na leitora de placas de ELISA TP READER NM Thermo Plate® a 630nm. Os valores de absorvância obtidos nos grupos controle (branco) foram subtraídos daqueles obtidos nos grupos tratamento, a fim de retirar a interação inespecífica. Uma curva padrão de calibração foi empregada utilizando as concentrações 0, 3, 6, 12, 25, 50, 100 e 200 ng/mL tanto para Cry1Ac quanto para Cry1F.

Os valores de absorvância resultantes, quando positivos, foram utilizados na equação de regressão linear (método dos mínimos quadrados) obtida a partir da curva de calibração para estimar a concentração de toxina nas amostras. Essa concentração calculada foi multiplicada pelo fator de diluição de cada amostra e convertendo-se a unidade final em ng de toxina por mg de amostra fresca (pulgões e pré-pupas de joaninhas).

## **6. Resultados**

### **6.1. Dietas artificiais**

#### **6.1.1. Desempenho de *C. sanguinea* em dieta artificial sólida**

As larvas de *C. sanguinea* alimentadas com as dietas artificiais 1, 2, 3, 4 e 5 não conseguiram atingir o segundo instar. No entanto, todas as dietas artificiais utilizadas na segunda etapa, bem como o tratamento controle, permitiram o desenvolvimento das larvas até o estágio adulto. Os tempos de desenvolvimento larval, pupal e total (ovo a adulto), a proporção de indivíduos que chegaram ao estágio de pupa e de adulto e a longevidade dos adultos da segunda etapa estão sumarizados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Tempo (média  $\pm$  desvio padrão) de desenvolvimento larval, pupal e total (ovo a adulto), proporção de indivíduos que chegaram ao estágio de pupa e adulto e longevidade dos adultos de *C. sanguinea*. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson.

Tratamentos	Tempos de desenvolvimento (dias)			Longevidade (dias)
	Larva a pupa <sup>1</sup>	Pupa a adulto <sup>2</sup>	Total <sup>3</sup>	Adulto <sup>4</sup>
<b>Dieta 6</b>	21,48 $\pm$ 3,83 a	5,50 $\pm$ 0,58 a	24,50 $\pm$ 4,51 a	78,25 $\pm$ 7,68 c
<b>Dieta 7</b>	18,82 $\pm$ 4,59 b	4,31 $\pm$ 0,48 b	22,19 $\pm$ 3,78 b	110,56 $\pm$ 7,11 b
<b>Dieta 8</b>	16,09 $\pm$ 2,07 c	4,56 $\pm$ 0,53 b	20,00 $\pm$ 1,66 b	119,38 $\pm$ 7,00 a
<b>Dieta 9</b>	19,00 $\pm$ 4,60 b	5,06 $\pm$ 1,29 a	24,06 $\pm$ 4,60 a	121,69 $\pm$ 6,62 a
<b>Controle</b>	10,58 $\pm$ 1,99 d	4,12 $\pm$ 0,93 b	14,70 $\pm$ 2,15 c	123,65 $\pm$ 8,55 a

<sup>1</sup>Resultado estatística: RV = 322,15; GL = 4; valor-p < 0,001

<sup>2</sup>Resultado estatística: RV = 20,155; GL = 4; p-valor < 0,001

<sup>3</sup>Resultado estatística: RV = 221,51; GL = 4; valor-p < 0,001

<sup>4</sup>Resultado estatística: RV = 161,12; GL = 4; valor-p < 0,001

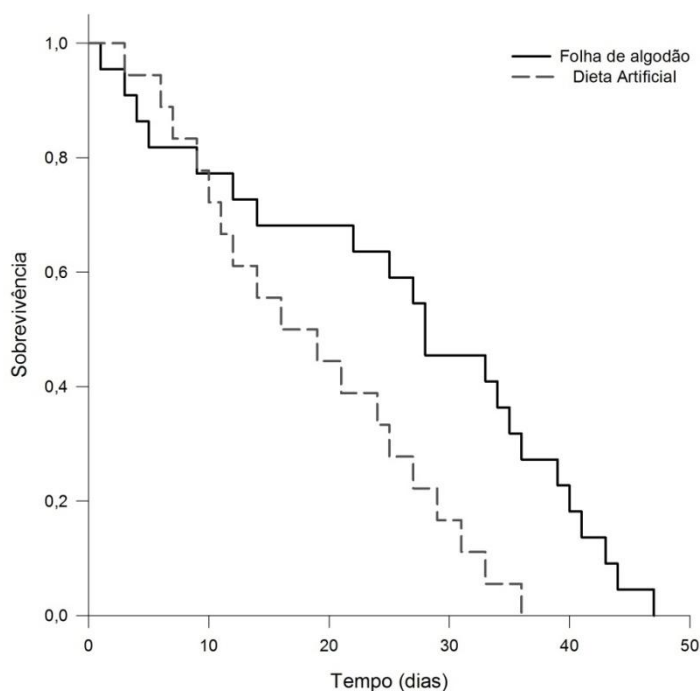
Todos os 40 indivíduos do grupo controle atingiram o estágio de pupa, enquanto pouco mais de dois terços (67,5%) daqueles alimentados com a Dieta 6, sem adição de pulgões, e pouco mais da metade dos indivíduos alimentados com as demais dietas artificiais sólidas atingiram o mesmo estágio (53,1% para a Dieta 9 e 55,0% para as Dietas 7 e 8). A taxa de emergência das pupas em adultos foi de 14,8% para a Dieta 6, valor inferior aos obtidos para os demais tratamentos, com 72,7% para a Dieta 7, 78,9% para o grupo controle, 81,8% na Dieta 8 e 100,0% na Dieta 9.

Em nenhum tratamento houve registro de ovos férteis a partir dos casais formados, impossibilitando a avaliação do ciclo reprodutivo.

### 6.1.2. Desempenho de *A. gossypii* e *M. persicae* em dieta artificial líquida e ensaio de toxicidade da toxina Cry1Ac sobre *M. persicae*

As curvas de sobrevivência das populações de pulgões de *A. gossypii* criadas em dieta artificial nos recipientes mostram uma mortalidade mais acentuada e menor longevidade quando comparadas às populações mantidas nas folhas de algodoeiro em ágar (Figura 10), havendo diferença significativa entre os tratamentos de acordo com a análise de sobrevivência (RV = 12,69; GL = 1; valor-p < 0,001).

### Análise de sobrevivência *A. gossypii*



**Figura 10.** Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) para o pulgão *A. gossypii* desenvolvendo-se folhas do algodoeiro (*G. hirsutum*) (linha contínua) e em dieta artificial líquida (linha tracejada) ao longo dos dias (RV = 12,69; GL = 1; valor-p < 0,001).

A dieta artificial afetou negativamente o desenvolvimento das ninfas e a fecundidade do pulgão *A. gossypii* em todas as variáveis testadas (Tabela 9).

**Tabela 9.** Bionomia (média  $\pm$  desvio-padrão) do pulgão *A. gossypii* criado em dieta artificial líquida e em folhas do algodoeiro. Médias seguidas por letras diferentes em cada linha diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson.

Parâmetros bionômicos	Em folha de algodoeiro	Em dieta artificial líquida
<b>Prole total por fêmea<sup>1</sup></b>	49,00 $\pm$ 13,83 a	9,33 $\pm$ 5,01 b
<b>Prole diária por fêmea<sup>2</sup></b>	3,23 $\pm$ 0,61 a	0,90 $\pm$ 0,41 b
<b>Período reprodutivo (dias)<sup>3</sup></b>	15,61 $\pm$ 5,27 a	12,05 $\pm$ 6,31 b
<b>Longevidade (dias)<sup>4</sup></b>	32,00 $\pm$ 8,79 a	22,29 $\pm$ 8,16 b

<sup>1</sup>Resultado estatística: RV = 182,48; GL = 1; valor-p < 0,001

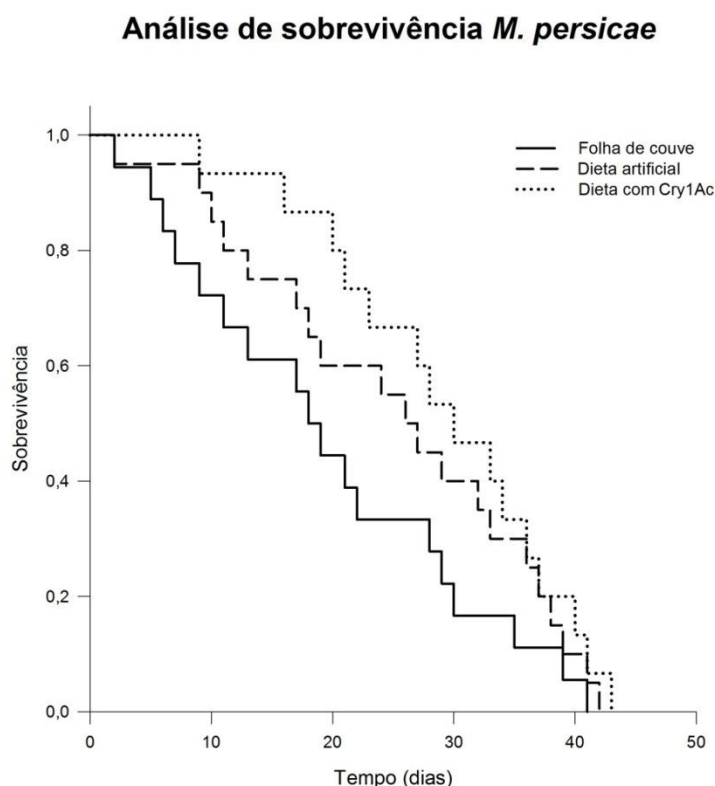
<sup>2</sup>Resultado estatística: RV = 163,66; GL = 1; valor-p < 0,001

<sup>3</sup>Resultado estatística: RV = 4,2564; GL = 1; valor-p = 0,039

<sup>4</sup>Resultado estatística: RV = 17,554; GL = 1; valor-p < 0,001

Para pulgões *A. gossypii* oriundos de folhas de algodoeiro e de dieta artificial líquida, a mortalidade pré-reprodutiva foi de 13,80% e 23,30% e o número observado de indivíduos foi de 29 e 30, respectivamente.

As curvas de sobrevivência da população de *M. persicae* criada em dieta artificial líquida (com e sem adição de Cry1Ac) mostram uma mortalidade menos acentuada e semelhante longevidade total quando comparadas às populações mantidas e nas folhas de couve em ágar a 1% (Figura 11), havendo diferença significativa entre os tratamentos em relação ao grupo controle (RV = 11,08; GL = 2; valor-p = 0,004).



**Figura 11.** Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) para o pulgão *M. persicae* desenvolvendo-se folhas de couve (*B. oleracea*) (linha contínua), em dieta artificial líquida (linha tracejada) e em dieta artificial com 30 µg/mL de Cry1Ac (linha pontilhada) ao longo dos dias (RV = 11,08; GL = 2; valor-p = 0,004).

A bionomia e os parâmetros da tabela de vida do pulgão *M. persicae* estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Bionomia (média  $\pm$  desvio-padrão) do pulgão *M. persicae* desenvolvendo-se em folha de couve, em dieta artificial líquida sem adição de toxinas e em dieta artificial líquida adição de 30  $\mu\text{g/mL}$  de Cry1Ac. Médias seguidas por letras diferentes em cada linha diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson.

Parâmetros bionômicos	Folha de couve	Dieta artificial líquida	Dieta artificial líquida com Cry1Ac (30 $\mu\text{g/mL}$ )
Prole total por fêmea <sup>1</sup>	48,48 $\pm$ 26,66 a	17,15 $\pm$ 8,18 b	20,42 $\pm$ 7,46 b
Prole diária por fêmea <sup>2</sup>	4,30 $\pm$ 1,03 a	1,56 $\pm$ 0,29 b	1,71 $\pm$ 0,26 b
Período reprodutivo (dias) <sup>3</sup>	12,84 $\pm$ 6,89 a	15,67 $\pm$ 8,72 a	17,95 $\pm$ 7,15 a
Longevidade (dias) <sup>4</sup>	21,84 $\pm$ 9,57 b	28,15 $\pm$ 9,40 a	31,68 $\pm$ 8,52 a

<sup>1</sup>Resultado estatística: RV = 364,73; GL = 2; valor-p < 0,001

<sup>2</sup>Resultado estatística: RV = 64,386; GL = 2; valor-p < 0,001

<sup>3</sup>Resultado estatística: RV = 4,8406; GL = 2; valor-p = 0,089

<sup>4</sup>Resultado estatística: RV = 12,859; GL = 2; valor-p = 0,002

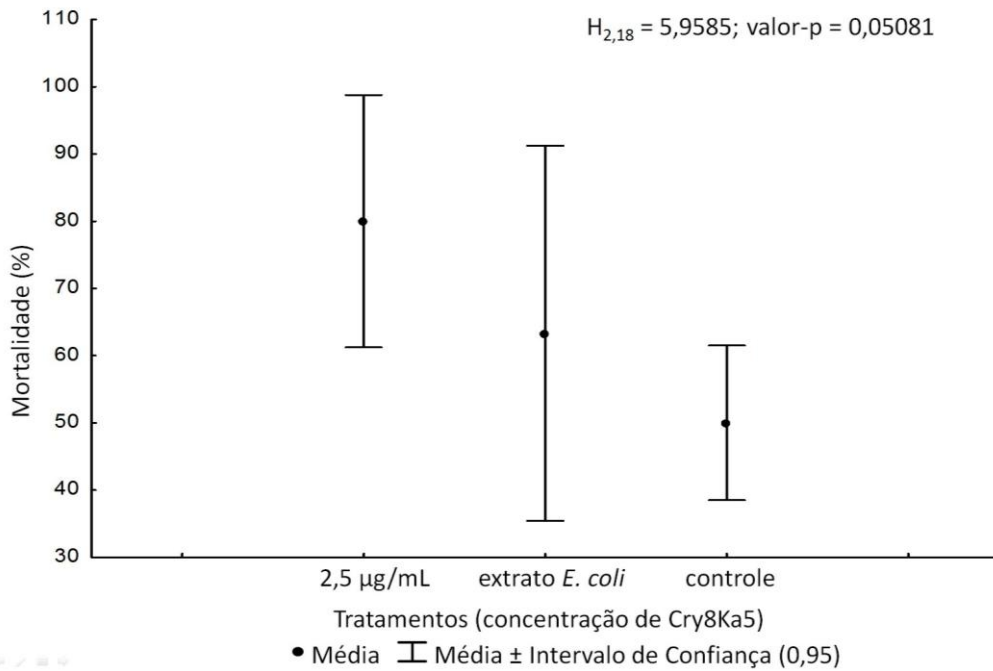
Para pulgões *M. persicae* oriundos de folhas de couve, de dieta artificial líquida e de dieta artificial líquida com 30 $\mu\text{g/mL}$  de Cry1Ac, a mortalidade pré-reprodutiva foi de 16,6%, 10,00% e 5,00% e o número de indivíduos observados foi de 25, 27 e 19, respectivamente.

## 6.2. Testes de atividade biológica das toxinas Cry

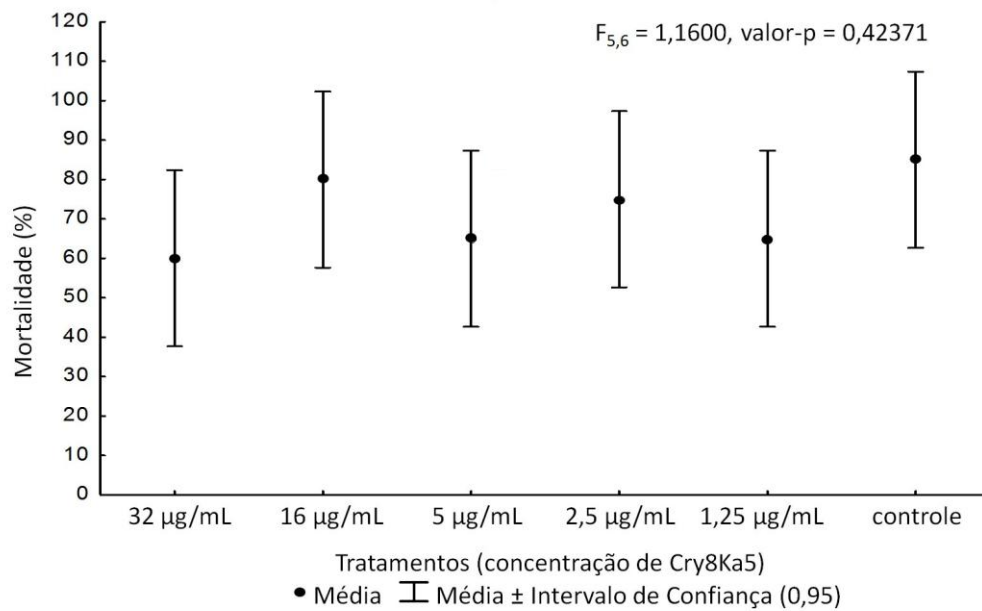
### 6.2.1. Teste de atividade biológica da toxina Cry8Ka5 sobre o inseto alvo *A. grandis*

Não houve diferença significativa entre os tratamentos realizados no Teste 1 (teste de Kruskal-Wallis  $H_{2,18} = 5,9585$ ; valor-p = 0,05081) (Figura 12), no Teste 2 (ANOVA  $F_{5,6} = 1,1600$ , valor-p = 0,42371) (Figura 13), no Teste 4 (Kruskal-Wallis  $H_{4,15} = 5,4264$ ; p = 0,246) (Figura 14) e nem no Teste 5 (teste de Kruskal-Wallis  $H_{2,15} = 5,4264$ ; valor-p = 0,888) (Figura 15) em relação aos resultados obtidos no tratamento controle (dieta artificial líquida sem adição de toxinas), indicando que não foi possível detectar a atividade biológica da toxina produzida nos respectivos lotes.

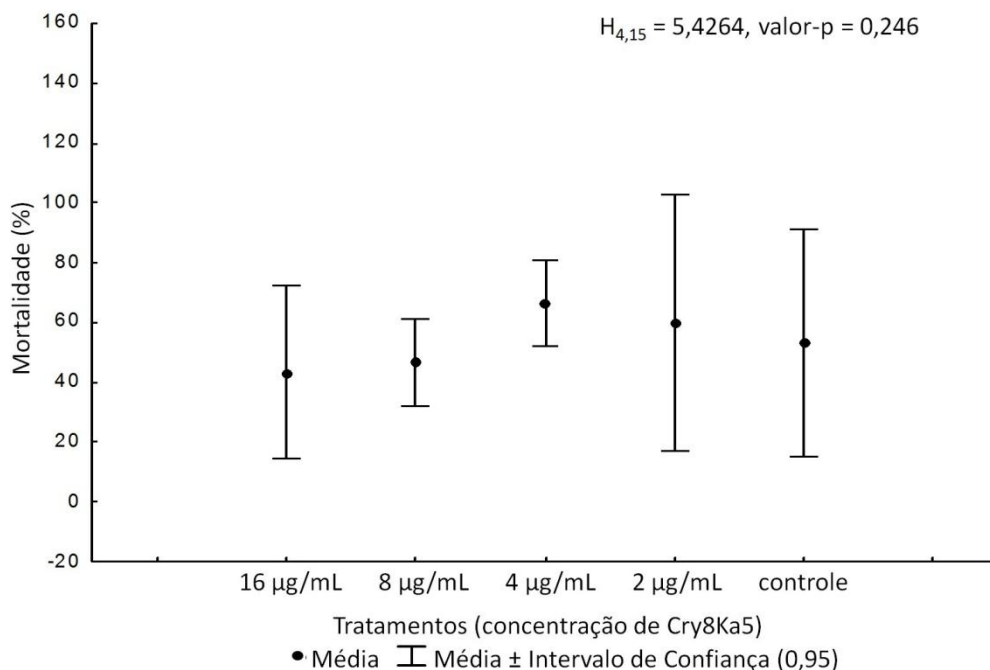




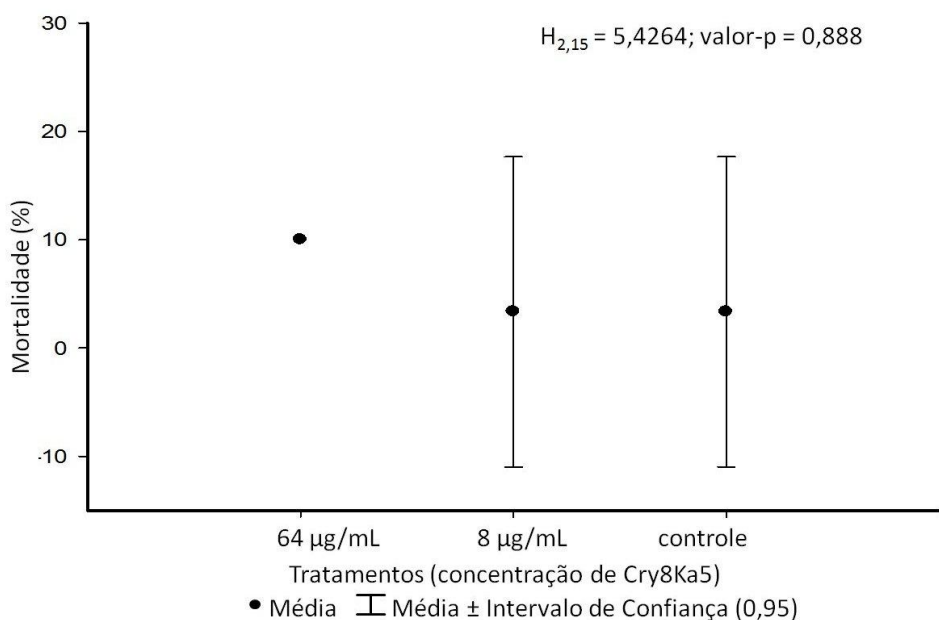
**Figura 12.** Resultado do 1º bioensaio realizado (Teste 1) para testar a atividade biológica do 1º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo *A. grandis*.



**Figura 13.** Resultado do 2º bioensaio realizado (Teste 2) para testar a atividade biológica do 2º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo *A. grandis*.



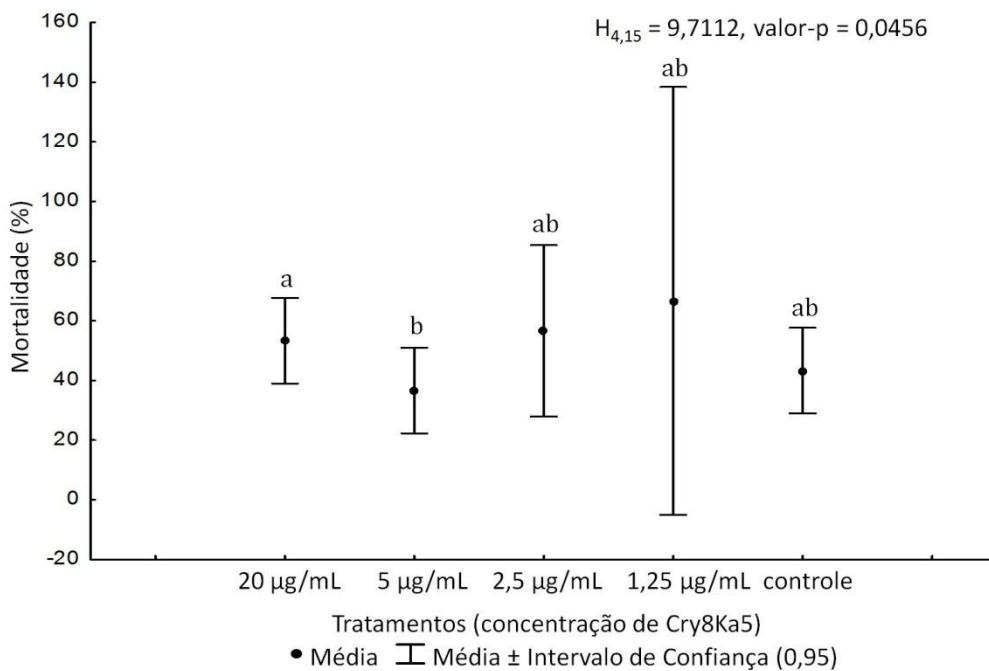
**Figura 14.** Resultado do 4º bioensaio realizado (Teste 4) para testar a atividade biológica do 3º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo *A. grandis*.



**Figura 15.** Resultado do 5º bioensaio realizado (Teste 5) para testar a atividade biológica do 4º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo *A. grandis*.

Houve diferença significativa de mortalidade (%) apenas entre as concentrações de 5 e 20 µg/mL da toxina no Teste 3 (Kruskal-Wallis  $H_{4,15} = 9,7112$ , valor-p = 0,0456) (Figura 16). Porém, assim como nos outros testes, não foi possível detectar a atividade biológica da toxina em relação aos resultados obtidos no tratamento controle (dieta

artificial líquida sem adição de toxinas).



**Figura 16.** Resultado do 3º bioensaio realizado (Teste 3) para testar a atividade biológica do 2º lote de Cry8Ka5 sobre larvas do inseto alvo *A. grandis*.

A taxa de mortalidade média do grupo controle foi de 50,0%, 85,0%, 43,3%, 53,3% e 3,3% nos Testes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

### 6.2.2. Teste de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo *A. gemmatalis*

As toxinas tiveram efeito letal sobre larvas de segundo instar de *A. gemmatalis*, causando a morte de mais da metade dos indivíduos alimentados com dieta contendo Cry1Ac (53,3%) ou Cry1F (86,7%) após 48 h de exposição, contra mortalidade de apenas 3,3% do grupo controle. Após 96 h de observação, não houve mortalidade do grupo controle e todos os indivíduos dos tratamentos-teste estavam mortos, indicando plena atividade dessas toxinas (Tabela 11).

**Tabela 11.** Teste de atividade biológica das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o inseto alvo *A. gemmatalis*.

Tratamento	Tempo (h) <sup>1</sup>	Mortalidade média (%)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
<b>Dieta controle (sem toxina)</b>	48 <sup>2</sup>	3,3	5,8	173,2
	96 <sup>3</sup>	3,3	5,8	173,2
<b>Dieta com Cry1Ac (30 µg/mL)</b>	48	53,3	5,8	10,8
	96	100,0	0,0	0,0
<b>Dieta com Cry1F (30 µg/mL)</b>	48	86,7	5,8	6,7
	96	100,0	0,0	0,0

<sup>1</sup>Tempo decorrido desde a montagem do bioensaio.

<sup>2</sup>Larvas mantidas em contato com a dieta com adição de toxina por 48 h.

<sup>3</sup>Larvas mantidas em contato com a dieta sem adição de toxina por mais 48 h.

### 6.3. Ensaios de toxicidade e rotas de exposição das proteínas Cry1Ac e Cry1F

#### 6.3.1. Ensaio de toxicidade das proteínas Cry1Ac e Cry1F sobre *C. sanguinea*

O tempo de desenvolvimento larval até o estágio de pré-pupa das joaninhas foi significativamente menor quando alimentadas com pulgões *M. persicae* alimentados em folhas de couve, do que quando alimentadas com pulgões *M. persicae* oriundos da dieta artificial líquida com e sem toxina (Tabela 12) (RV = 23,060; GL = 3; p-valor < 0,001).

**Tabela 12.** Tempo médio para que as larvas de *C. sanguinea* atingissem o estágio de pré-pupa sendo alimentadas com pulgões *M. persicae* provenientes de diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson.

Tratamento	N	Tempo médio (dias)*	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
<b>Dieta com Cry1Ac (30 µg/mL) e Cry1F (70 µg/mL)</b>	14	10,29 a	0,49	4,74
<b>Dieta com Cry1Ac (30 µg/mL)</b>	25	9,44 a	1,47	15,62
<b>Dieta sem adição de toxinas</b>	29	9,41 a	1,09	11,54
<b>Folha de couve</b>	17	8,12 b	0,33	4,09

\*Resultado estatística: RV = 23,060; GL = 3; p-valor < 0,001

O consumo médio das larvas de joaninhas alimentadas com pulgões *M. persicae* criados em folhas de couve foi significativamente maior comparado quando alimentadas com pulgões *M. persicae* alimentados com dieta líquida com e sem toxinas, os quais não diferiram entre si (Tabela 13) (RV = 79,549; GL = 3; p-valor < 0,001).

**Tabela 13.** Consumo médio das larvas de *C. sanguinea* alimentadas com pulgões *M. persicae* provenientes de diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson.

Tratamento	N	Consumo médio (n° pulgões)*	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Folha de couve	17	222,35 a	22,03	9,91
Dieta com Cry1Ac (30 µg/mL) e Cry1F (70 µg/mL)	6	178,17 b	18,48	10,37
Dieta com Cry1Ac (30 µg/mL)	12	165,00 b	18,78	11,38
Dieta sem adição de toxinas	12	158,33 b	23,57	14,89

\*Resultado estatística: RV = 79,549; GL = 3; p-valor < 0,001

A massa média das pré-pupas das joaninhas alimentadas com pulgões *M. persicae* criados em folhas de couve foi significativamente menor do que as das larvas alimentadas de pulgões *M. persicae* criados em dieta artificial líquida com e sem toxina (Tabela 14) (RV = 14,597; GL = 3; p-valor = 0,002).

**Tabela 14.** Massa média (mg) das pré-pupas de *C. sanguinea* alimentadas com pulgões *M. persicae* provenientes de diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ao nível de 5% segundo os contrastes obtidos através do MLG quasipoisson.

Tratamento	N	Massa média (mg)*	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Dieta com Cry1Ac (30 µg/mL)	29	18,61 a	3,51	18,87
Dieta com Cry1Ac (30 µg/mL) e Cry1F (70 µg/mL)	6	17,98 a	3,37	18,75
Dieta sem adição de toxinas	32	17,72 a	2,82	15,89
Folha de couve	17	15,36 b	1,76	11,48

\*Resultado estatística: RV = 14,597; GL = 3; p-valor = 0,002

### 6.3.2. Detecção e quantificação das toxinas Cry1Ac e Cry1F nos diferentes níveis tróficos

Para o bioensaio de exposição à Cry1Ac, a equação da reta obtida através da curva de calibração de Cry1Ac no teste de ELISA foi de  $y = 0,3785x - 0,2329$ , ( $R^2 = 0,9709$ ). A toxina Cry1Ac foi detectada em todos os níveis tróficos, com exceção para as pré-pupas provenientes da 3ª repetição de exposição (Tabela 15).

**Tabela 15.** Quantidade de Cry1Ac (em ng/mg de peso fresco) calculada para cada nível trófico dos bioensaios de exposição dessa toxina isoladamente ao predador *C. sanguinea* através do pulgão *M. persicae*.

	<b>Dieta artificial</b>	<b>Pulgões <i>M. persicae</i></b>	<b>Pré-pupas de <i>C. sanguinea</i></b>
<b>Exposição – 1ª repetição</b>	2,258	31,997	6,633
<b>Exposição – 2ª repetição</b>	2,649	33,883	42,268
<b>Exposição – 3ª repetição</b>	1,523	22,127	0,000
<b>Média</b>	2,143	29,336	16,300
<b>Desvio Padrão</b>	0,572	6,314	22,732
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	26,68	21,52	139,46

Em média, 7,14% dos 30 µg/mL de Cry1Ac adicionados inicialmente à dieta foram detectados nesse nível trófico; os pulgões registraram 13,69 vezes mais toxina que o detectado na dieta e as pré-pupas apresentaram 56% do teor encontrado nos pulgões.

Para o bioensaio de exposição às toxinas combinadamente, as equações da reta obtidas através da curva de calibração no teste de ELISA foram  $y = 0,2409x - 0,3546$  ( $R^2 = 0,9703$ ) e  $y = 1,1144x - 1,0121$  ( $R^2 = 0,9753$ ) para Cry1Ac e Cry1F, respectivamente. Não houve detecção de Cry1Ac nos pulgões e nas pré-pupas de joaninhas, mas apenas na dieta artificial, sendo o valor médio de  $2,224 \pm 0,215$  ng/mg, o que representa 11,22% do total adicionado inicialmente. Já a toxina Cry1F foi detectada em todos os níveis tróficos (Tabela 16).

**Tabela 16.** Quantidade de Cry1F (em ng/mg de peso fresco) calculada para cada nível trófico dos bioensaios de exposição dessa toxina combinada com Cry1Ac ao predador *C. sanguinea* através do pulgão *M. persicae*.

	<b>Dieta artificial</b>	<b>Pulgões <i>M. persicae</i></b>	<b>Pré-pupas de <i>C. sanguinea</i></b>
<b>Exposição – 1ª repetição</b>	3,067	3,922	112,319
<b>Exposição – 2ª repetição</b>	3,374	3,925	101,746
<b>Média</b>	3,221	3,924	107,032
<b>Desvio Padrão</b>	0,217	0,002	7,476
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>	0,067	0,000	0,070

Em média, 4,60% dos 70 µg/mL de Cry1F adicionados inicialmente à dieta foram detectados nesse nível trófico; os pulgões registraram 1,22 vezes o teor de toxina detectado na dieta e as pré-pupas apresentaram 27,28 vezes o teor dos pulgões.

## 7. Discussão

O uso da dieta artificial como única fonte de alimento permite que larvas de joaninhas alcancem o estágio adulto, apresentando extensa longevidade. Porém, essa dieta precisa ser aperfeiçoada visando melhorar o desenvolvimento (tempo e sobrevivência) além de permitir a maturação reprodutiva dos adultos, aproximando-se da dieta natural. As nove dietas artificiais testadas, apesar de permitirem avaliações comparativas na fase larval, ainda não são adequadas para o uso em bioensaios de avaliação de risco ambiental de toxinas em *C. sanguinea* por gerações consecutivas.

As larvas de *C. sanguinea* não foram capazes de se desenvolver quando alimentadas nas dietas sólidas 1 a 5, possivelmente, devido à falta de algum nutriente em sua composição ou a uma inadequação nutricional dos compostos usados nas dietas testadas. Os resultados estão de acordo com o proposto por Michaud (2005), que relatou que quando um alimento é inadequado para o desenvolvimento larval de joaninhas, o primeiro instar larval raramente é completado.

O tratamento controle, composto de pulgões *A. gossypii* frescos oferecidos à vontade, apresentou tempo de desenvolvimento larval semelhante ao encontrado por Işikber e Copeland (2002), em que indivíduos de *C. sanguinea* foram alimentados com ninfas de *A. gossypii* em temperatura e umidade próximas às utilizadas em nossos bioensaios. Isso evidencia que o tratamento controle foi satisfatório, servindo de parâmetro de comparação com os demais tratamentos sob teste.

O possível fator determinante do sucesso da Dieta 6, permitindo o desenvolvimento das larvas até o estágio adulto, o que não havia ocorrido com as Dietas 1 a 5, foi a maior proporção de água utilizada, alterando a textura e facilitando o acesso à dieta pelas larvas. Além disso, supõe-se que a suspensão da adição de frutose na dieta; a redução de anticontaminantes com a retirada do ácido sórbico e a redução na proporção de levedo de cerveja e gérmen de trigo foram medidas importantes para os indivíduos chegarem à fase adulta. Devido ao resultado positivo, essas alterações foram mantidas nas Dietas 7, 8 e 9, que receberam a adição do pulgão congelado e macerado.

A redução no tempo de desenvolvimento das larvas nas Dietas 7, 8 e 9, bem como as taxas de emergência das pupas superiores às taxas encontradas na Dieta 6, sugerem que o pulgão atuou como complemento alimentar, contendo composto(s) ou um balanço nutricional que favoreça o desenvolvimento das joaninhas. Esses resultados corroboram os resultados de Işikber e Copland (2002), em que o pulgão *A. gossypii* é

considerado um alimento satisfatório ao desenvolvimento de *C. sanguinea*. Assim, a adição do pulgão congelado à dieta favoreceu o desenvolvimento das joaninhas pois partes dos insetos-presa estimularam a alimentação (fagoestimulante) e forneceram fatores de crescimento (DE CLERCQ, 2008).

A longevidade dos adultos das Dietas 6, 7, 8 e 9 aumentou com o aumento da proporção de pulgão na dieta, sendo que cerca de 3% de afídeos em sua composição já foram suficientes para equiparar com os dados de longevidade do grupo controle. As Dietas 8 e 9, em que a longevidade se igualou ao grupo controle e se aproximou daquela obtida por Oliveira et al. (2004), cujos adultos de *C. sanguinea* foram alimentados com o pulgão *Cinara atlantica* (Hemiptera: Aphididae), mostraram-se capazes de fornecer a exigência nutricional para que as larvas chegassem à fase adulta, sem contudo gerar indivíduos férteis.

A fecundidade das fêmeas, que é determinada pela ovogênese, um processo fisiológico regulado pela disponibilidade de nutrientes no corpo dos insetos, pode ser afetada pela incorporação ou retirada de nutrientes, podendo afetar, conseqüentemente, sua fertilidade (WHEELER, 1996). Entre os nutrientes, a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e o colesterol, que são essenciais na regulação da fertilidade nos insetos adultos (GREGORY, 1996), estímulo à cópula (HODEK, 1996), crescimento larval, esclerotização da cutícula e precursor de hormônios esteroides (PARRA, 2009), podem não ter sido oferecidos em quantidades ideais nos biensaios realizados.

Segundo Hodek (1973), para a maioria dos coccinelídeos é necessário que nutrientes essenciais estejam disponíveis para o completo desenvolvimento e garantia de uma progênie viável. O pleno desenvolvimento do aparato reprodutivo do predador pode ter sido afetado pela carência de fagoestimulantes ou mesmo a precária assimilação de nutrientes, causada por sua deficiência ou excesso, comprometendo a fertilidade de machos, de fêmeas ou de ambos.

O mel foi utilizado na dieta devido à presença de uma mistura complexa de açúcares (principalmente glicose e frutose) bem como pequenas quantidades de outros constituintes como: minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos, enzimas e outras substâncias biologicamente ativas (HOOPER, 1981; WELKE et al., 2008). As principais vitaminas encontradas no mel são do complexo B, C e D, essenciais ao desenvolvimento e manutenção dos insetos adultos (CRANE, 1985). Além disso, o mel pode funcionar como fagoestimulante, principalmente devido à rica presença de açúcares.



O levedo de cerveja funcionou como fonte de carboidratos, proteínas (nitrogênio), cálcio e ferro, sendo este último essencial para produção do hormônio da ecdise e processo da formação da cutícula. O gérmen de trigo forneceu, além de carboidratos e proteínas, lipídeos que atuam como fonte de energia, constituintes das membranas celulares e formação de hormônios juvenis e da muda. O ovo desidratado foi utilizado pela riqueza em proteínas e colesterol (PARRA, 2009).

Dentre outros fatores, a baixa taxa de indivíduos que alcançaram o estágio adulto pode ser devido ao comprometimento da vitamina C nas dietas. Apesar da vitamina C estar presente no mel, ela é muito suscetível à degradação, especialmente quando presente em solução exposta ao calor, luz, oxigênio e radicais livres (COHEN, 2004). No preparo das dietas, o ágar foi aquecido em água a temperaturas elevadas para promover solidificação. Em seguida, foi adicionado mel com a água a 60°C, o que pode ter causado a degradação da vitamina C. Segundo Ave (1995), a vitamina C é essencial como fagoestimulante, antioxidante, para esclerotização da cutícula e, possivelmente, em reações de defesa imunológica.

A adição dos pulgões funcionou, possivelmente, como fagoestimulante e complemento nutricional, favorecendo a adequação da dieta sólida na criação de *C. sanguinea* em laboratório e uso em bioensaios para avaliação de proteínas entomotóxicas. Segundo Parra (2009), para alcançar uma dieta artificial adequada, é necessário garantir alta viabilidade larval, produção de insetos com duração da fase larval igual à da natureza, adultos com alta capacidade reprodutiva dentre outras características.

Baseado em estudos de ecologia nutricional, a dieta testada nesse experimento foi classificada como “marginal” por sustentar o desenvolvimento de algumas larvas e prolongar a longevidade dos adultos sem permitir sua reprodução (MICHAUD, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Michaud (2000), em que larvas de uma população de *H. axyridis* se desenvolveram com sucesso em dieta à base de *Aphis spiraecola* (Hemiptera: Aphididae), porém com tempo de desenvolvimento larval extenso e peso reduzido dos adultos, além de postura de ovos não viáveis.

A fim de aprimorar e aperfeiçoar a elaboração da dieta artificial, a realização de uma análise da composição química e valor nutricional do pulgão *A. gossypii* pode ser uma alternativa para permitir o conhecimento de compostos essenciais presentes na presa e quais as proporções adequadas ao predador estudado. A partir disso, uma dieta méridica, cujos componentes são quimicamente definidos (PARRA, 2009), pode ser

elaborada com um balanço nutricional próximo às necessidades da espécie *C. sanguinea*. Além disso, novos testes com diferentes combinações de componentes da dieta devem ser conduzidos, levando-se em consideração propriedades físicas, tais como resistência, textura, homogeneidade e teor de água, a fim de melhorar os resultados das variáveis avaliadas, aproximando-as da dieta controle e do melhor custo-benefício.

Em função das dietas testadas não terem permitido a obtenção de adultos viáveis, não foi possível estabelecer a rota de exposição bitrófica de toxinas Cry para o predador não-alvo da transgenia *C. sanguinea* através a adição dessas toxinas à dieta artificial para o predador.

Paralelamente aos testes com as dietas artificiais para criação do predador *C. sanguinea*, foram realizados testes para comprovação de atividade biológica da toxina recombinante Cry8Ka5 (OLIVEIRA et al., 2011) sobre o inseto alvo *A. grandis*. O objetivo desse teste é garantir que a não observação de alterações na bionomia do inseto não-alvo não fossem devidas à falta de atividade da toxina.

Os resultados do Teste 1, realizado sobre o 1º lote recebido da toxina, não apresentaram diferença significativa da mortalidade das larvas do grupo controle, alimentado apenas com dieta, daquele alimentado com dieta contendo 2,5 µg/mL de Cry8Ka5 e do grupo alimentado com dieta contendo extrato de *E. coli*. Assim, não foi possível concluir que a morte das larvas foi determinada por ação da toxina. Além disso, o grupo controle apresentou mortalidade acima de 20%, valor considerado excessivamente elevado em bioensaios comparativos (HILBECK et al., 2012).

O Teste 2, realizado com um novo lote de toxina (com maior grau de pureza), também não apresentou diferença significativa na mortalidade das larvas de bicudo-do-algodoeiro entre os tratamentos. Esses dados também não são conclusivos, pois novamente houve elevada mortalidade do grupo controle.

Como a alta mortalidade do grupo controle pode estar associada à qualidade da colônia de origem do bicudo, o Teste 3, feito com o mesmo lote de toxina do anterior, foi realizado somente após a renovação da colônia. Isso representou sensível redução da mortalidade desse grupo, mas novamente não foi possível verificar diferença na mortalidade entre os tratamentos.

Aventou-se a possibilidade de que a temperatura da dieta no momento da adição da toxina (60°C) poderia desnaturá-la e, portanto, promover redução de sua atividade. Dessa forma, o Teste 4 foi realizado com adição da toxina à dieta quando essa estivesse a 50°C, já que em temperaturas inferiores não foi possível fazer a mistura por conta da

solidificação da dieta. Também não foi possível verificar diferenças nas mortalidades.

O Teste 5 foi realizado na mesma condição de temperatura que o anterior, porém os indivíduos utilizados foram derivados de ovos prestes a eclodir ao invés de larvas derivadas de ovos recém-eclodidos. Observou-se que esse procedimento é mais adequado, uma vez que a taxa de mortalidade do grupo controle foi bastante reduzida, ficando abaixo de 20%. Porém, também não foi verificada diferença entre as mortalidades, mesmo com a concentração máxima da toxina sendo mais de 20 vezes superior à CL<sub>50</sub> apresentada por Oliveira et al. (2011).

Os seguidos resultados negativos obtidos nos bioensaios podem estar relacionados à baixa capacidade de produção da toxina Cry8Ka5 pelo sistema heterólogo utilizado, o que dificulta seu processo de diálise (retirada de sais) e não permite manter proteína suficiente para ser purificada e utilizada nos testes. Para novos testes com as toxinas Cry8Ka5 será necessário utilizar lotes derivados de processos com elevada produção de proteínas, a fim de permitir a verificação de sua atividade biológica sobre o inseto-praga alvo *A. grandis* e, então, uma avaliação de possíveis efeitos sobre as joaninhas *C. sanguinea*.

Para avaliação dos potenciais impactos das toxinas Cry1Ac e Cry1F sobre o predador não-alvo *C. sanguinea*, realizou-se o teste de sua atividade sobre o inseto-alvo *A. gemmatalis*, lepidóptero suscetível às duas toxinas (BOBROWSKI et al., 2002; MONNERAT et al., 2007). Todas as lagartas do bioensaio morreram após 96 h de observação, contra mortalidade do grupo controle abaixo de 5%, atestando sua atividade biológica.

Referente à avaliação de desempenho dos afídeos no sistema de criação com dieta artificial líquida, a curva de sobrevivência observada para *A. gossypii* e *M. persicae* foi semelhante à curva teórica do tipo II, atípica para insetos (BEGON et al., 2006), podendo ser explicada pela exclusão de predadores e parasitoides no experimento e pela ausência de outros possíveis fatores de mortalidade como a interação inseto-planta (KAZANA et al., 2007).

Não foram obtidos resultados negativos sobre a bionomia do pulgão *A. gossypii* criados em folha de algodoeiro (grupo controle) para os parâmetros observados, tendo por base os resultados obtidos em outros trabalhos com pulgões alimentados com plantas de algodoeiro em campo ou casa de vegetação (SUJII et al., 2008; MICHELOTTO; BUSOLI, 2009; SILVA et al., 2007; LIU et al., 2005). A mortalidade pré-reprodutiva ficou abaixo do valor crítico de 20% (HILBECK et al., 2012). Assim,

evidencia-se que o tratamento controle foi adequado ao desenvolvimento do inseto, servindo de parâmetro de comparação para os demais tratamentos sob teste.

Entretanto, quando os pulgões *A. gossypii* foram alimentados em sistema artificial, houve diferença significativa na curva de sobrevivência, na prole total por fêmea, na prole diária, no período reprodutivo e na longevidade quando comparados ao controle, além da mortalidade pré-reprodutiva ter ficado acima de 20%. Esses resultados demonstram a inviabilidade da utilização dessa dieta artificial líquida como rota de exposição de toxinas Bt, via presa, aos predadores, pois não será possível afirmar se diferenças na bionomia do predador ocorreram por causa da toxina ou por causa da baixa qualidade da presa.

O baixo rendimento observado para o pulgão *A. gossypii* pode ser devido à especificidade da dieta artificial líquida para o pulgão *M. persicae*, inseto de natureza generalista. Caso haja interesse no uso dessa dieta para *A. gossypii*, estudos sobre alterações na composição e proporção dos nutrientes talvez permitam sua utilização para uma criação satisfatória desse pulgão. Dessa forma, pode ser possível a avaliação do potencial impacto de endotoxinas e outras substâncias sobre a população de *A. gossypii*, além de também permitir seu uso como rota de exposição de toxinas ao predador não-alvo *C. sanguinea* em laboratório.

Uma análise da composição química e valor nutricional do floema do algodoeiro *G. hirsutum* pode permitir a identificação de compostos essenciais presentes e as proporções que seriam adequadas a *A. gossypii*, para que esse pulgão possa ser criado sob dieta líquida artificial e, conseqüentemente, seja testado em bioensaios como rota de exposição de toxinas Bt para *C. sanguinea*.

Para o pulgão *M. persicae*, alimentado com folhas de couve (tratamento controle), não foram obtidos resultados negativos para sua bionomia, tendo por base os resultados encontrados para os mesmos pulgões quando criados sobre folhas de couve (CHI; SU, 2006; BASTOS et al., 1996; DOUGLAS; EMDEN, 2007; CIVIDANES; SOUZA, 2003), de berinjela (MICHELOTTO et al., 2005) ou pimentão (BARBOSA et al., 2011), apesar de alguns desvios. As pequenas variações encontradas entre tratamentos semelhantes podem estar relacionados à existência de diferentes biótipos de *M. persicae* (TAMAKI et al., 1982) e às diferenças entre as plantas hospedeiras utilizadas, que podem alterar a longevidade e outras características da bionomia de pulgões (WALE et al., 2000).

Dessa forma, os dados registrados para a bionomia de *M. persicae* em folhas de

couve, somados à mortalidade pré-reprodutiva abaixo de 20%, evidenciam a qualidade do tratamento controle para servir de parâmetro de comparação com os demais tratamentos sob teste.

O desempenho do pulgão *M. persicae* na dieta artificial líquida utilizada tendo diferiu do grupo controle em alguns parâmetros, como número médio de prole diária e total. Porém, seu período reprodutivo não diferiu do grupo controle e sua longevidade foi maior, que pode ter ocorrido pelo fato do pulgão não ter de lidar com compostos secundários presentes nas folhas de couve (KAZANA et al., 2007). Assim, o desempenho do inseto na dieta foi satisfatório e de acordo com resultados encontrados por Douglas e Emden (2007).

A adição da toxina Cry1Ac na dieta na concentração de 30 µg/mL não causou qualquer alteração no desempenho do *M. persicae* quando comparado ao grupo alimentados no sistema artificial com dieta livre de toxinas, resultado semelhante ao descrito por Sims (1995) e Zhang et al. (2008). Isso pode ser devido ao fato de os pulgões não apresentarem receptores para as toxinas Cry em suas células do epitélio intestinal médio. Dessa forma, o pulgão não foi prejudicado pela toxina nos parâmetros observados e serviu rota de exposição tritrófica ao predador não-alvo.

O desenvolvimento larval das joaninhas *C. sanguinea* alimentadas com pulgões *M. persicae* derivados de folhas de couve está de acordo com dados obtidos por: Santos et al. (2003) e Santa-Cecília et al. (2001), que estudaram o efeito da alimentação com *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) em genótipos de sorgo; Boiça Júnior et al. (2004), que ofereceram *A. gossypii* obtidos de algodoeiro desenvolvendo-se em casa de vegetação e Işikber e Copland (2002), que ofereceram *A. gossypii* e *M. persicae*. O consumo total de pulgões por larva de joaninha observado no grupo controle está de acordo com o obtido por Gurney e Hussey (1970). Assim, constata-se que o tratamento controle foi adequado em permitir a comparação com os demais tratamentos sob teste.

Quando indivíduos de *C. sanguinea* foram alimentados com pulgões cuja dieta não continha toxinas, a duração de seu período larval registrado foi condizente com resultados observados por Santos e Pinto (1981), mas diferiu significativamente do grupo controle. O consumo de pulgões foi significativamente menor se comparado ao grupo controle, porém a massa das pré-pupas foi maior.

Dessa forma, o fato de submeter o pulgão *M. persicae* à dieta artificial antes de oferecê-lo à joaninha retarda seu o tempo de desenvolvimento em relação ao grupo controle, o que provavelmente provocou aumento da massa média das pré-pupas, mas

causou redução do consumo de pulgões. Apesar disso, não houve diferença nos parâmetros obtidos para as joaninhas alimentadas de pulgões que se desenvolveram em dieta líquida sem adição de toxina em relação àquelas que se alimentaram de pulgões desenvolvidos em dieta líquida com adição de toxina, seja de forma isolada ou então combinada.

Assim, constata-se que, além do sistema artificial ter funcionado adequadamente garantindo a manutenção da qualidade dos parâmetros avaliados tanto para a presa quanto para o predador, a adição de Cry1Ac, de forma isolada ou combinada com Cry1F, não causou qualquer alteração negativa no desenvolvimento dos parâmetros aqui observados para o predador não-alvo *C. sanguinea*.

O resultado obtido está de acordo com aquele observado por Nakasu et al. (2013) que, a fim de investigar os efeitos da entomotoxina Cry1Ac, expressa em diversas culturas GM para resistência a insetos, sobre a bionomia da joaninha *C. sanguinea*, expuseram o predador à toxina por rota bitrófica, aspergindo  $235 \pm 15 \mu\text{L/gaiola}$  de uma solução a  $500 \mu\text{g/mL}$  em água destilada sobre *A. gossypii*, ficando as joaninhas expostas a aproximadamente  $1,85 \mu\text{g}$  de toxina por  $\text{cm}^2$ . Os autores não encontraram diferença no tempo de desenvolvimento larval para indivíduos alimentados com pulgões sem e com toxina.

Sims (1995) verificou resultados semelhantes, em que a proteína Cry1Ac oferecida em dieta artificial a  $20 \mu\text{g/mL}$  também não afetou a bionomia da joaninha *H. convergens*. Os autores testaram os efeitos da toxina Cry1Ac produzida em sistema heterólogo, purificada e ativada, em dieta artificial contra 14 diferentes espécies de insetos de diversas ordens, alvo e não-alvo, e encontrou da toxina efeito apenas entre lepidópteros.

A joaninha *H. axyridis*, quando exposta diretamente à toxina Cry1Ab ao se alimentar de pólen de milho transgênico, também não apresentou alterações nas taxas de desenvolvimento, peso e atividade metabólica, segundo Zhang et al. (2005). O consumo de pólen derivado de batata expressando Cry3A também não causou alteração significativa na sobrevivência de adultos de *H. axyridis* durante 21 dias e, apesar de ter sido observada perda de massa durante esse período, não foi verificada diferença significativa na massa média entre os grupos teste e controle (FERRY et al., 2007). Nenhum efeito foi observado para o coleóptero predador *Pterostichus madidus* (Coleoptera: Carabidae), alimentado com larvas que se desenvolveram em canola transgênica expressando Cry1Ac (FERRY et al., 2006).

Entretanto, Zhang et al. (2006) observaram que a duração do ciclo de vida da joaninha *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) foi menor quando alimentados com pulgões criados em cultivar de algodoeiro transgênico expressando Cry1Ac/Ab do que aquelas alimentadas com pulgões criados em cultivar de algodoeiro não-Bt. Em um estudo sobre o algodoeiro Bt DP99B e GK-12 (expressando Cry1Ac e Cry1Ab/Ac, respectivamente), Guo et al. (2005) também verificaram potencial tóxico das toxinas sobre a larva do predador não-alvo *Chrysopa formosa* (Neuroptera: Chrysopidae) através do herbívoro também não-alvo *A. gossypii*, alterando tempo de desenvolvimento e sobrevivência larval além da razão sexual e longevidade dos adultos.

Tais resultados, somados aos obtidos em trabalhos com *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) (HILBECK et al., 1998, DUTTON, et al. 2002) e *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) (BIRCH et al. 1999), sugerem que os efeitos dos transgenes contra pragas em predadores não-alvo podem ser maiores que os assumidos por outros autores.

Com relação aos bioensaios de exposição de Cry1Ac isoladamente, foi possível a detecção da toxina tanto no nível da dieta artificial (7% do total inicial), quanto nos insetos herbívoros (1.369% em relação ao teor detectado na dieta) e também dos carnívoros (56% do teor detectado nos pulgões). Tais resultados estão de acordo com os obtidos por Torres e Ruberson (2008) que, em estudo com heterópteros predadores se alimentando de pragas do algodoeiro, a toxina Cry1Ac também foi detectada nos três níveis tróficos. Do teor detectado em folhas do algodoeiro Bt, de 68% a 1679% foram detectados em herbívoros (tisanópteros e ácaros, respectivamente) e entre 17% e 9% foram detectados nos predadores dos tisanópteros e dos ácaros, respectivamente, compatíveis com os dados registrados aqui.

Os resultados também são semelhantes aos obtidos por Zhang et al. (2006) que, a partir dos teores de Cry1Ab e Cry1Ac detectados em folhas, encontraram 12% e 4% em *A. gossypii*, respectivamente. Foi detectada toxina também nos predadores, aumentando com a extensão do período de predação. Os teores encontrados nos adultos da joaninha *P. japonica* foram de 225% a 567% de Cry1Ab quando alimentados durante 5 e 20 dias, respectivamente, e 225% a 600% de Cry1Ac quando alimentadas durante 5 e 20 dias, respectivamente. Esses dados laboratoriais confirmam os dados de campo de Zhang et al. (2004), em que toxinas Bt (Cry1Ab ou Cry1Ac) estavam presentes em ninfas e adultos de *A. gossypii* e larvas de *H. armigera*, além de larvas e adultos do predador *P. japonica*.

Entretanto, outros estudos mostraram que nenhuma ou pouca quantidade de Cry1Ab pode ser detectada em *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) alimentado em milho-Bt (RAPS et al., 2001; DUTTON et al., 2004), e também que a toxina Cry1Ac nem sempre é detectável em *A. gossypii* quando alimentado em algodoeiro Bt (TORRES; RUBERSON, 2008, LAWO et al., 2009).

Lövei e Arpaia (2005), em extensa revisão sobre os estudos de impacto de plantas transgênicas sobre inimigos naturais, concluíram que os testes de laboratório não representam o pior cenário pretendido nos desenhos experimentais e nem sempre são ecologicamente realistas, pois tipicamente apresentam disponibilidade de alimento em abundância, não permitem escolhas de presas, oferecem apenas um tipo de presa, não fazem combinações de fatores estressantes e usualmente ocorrem em temperaturas uniformes.

Hilbeck et al. (2012) realizaram um estudo para investigar as razões subjacentes para os diferentes resultados encontrados por Schmidt et al. (2009) e Alvarez-Alfageme et al. (2010) para o coccinelídeo predador não-alvo *A. bipunctata*, em que os primeiros relatam os efeitos letais das toxinas Bt Cry1Ab e Cry3Bb sobre o predador enquanto os últimos não observam qualquer efeito adverso. Os autores concluíram que a utilização de um protocolo de teste significativamente diferente, em que Schmidt et al. (2009) expuseram as larvas de *A. bipunctata* continuamente, enquanto Alvarez-Alfageme et al. (2010) promoveram curta exposição, aplicada a um inseto alvo altamente sensível, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), com grande redução ou mesmo perda do efeito letal, pode ser a causa das diferenças encontradas.

Ao repetir as experiências de alimentação com a toxina Bt Cry1Ab usando um protocolo combinado de ambos os estudos anteriores, Hilbeck et al. (2012) observaram efeito letal sobre larvas de *A. bipunctata*. Os testes ELISA com larvas alimentadas com toxina Bt e pupas confirmaram a ingestão da toxina. Os novos dados corroboram os resultados anteriores de que a toxina Cry1Ab aumenta a mortalidade de larvas de *A. bipunctata*. Também foi demonstrado que os diferentes protocolos de ensaio explicam os resultados contrastantes.

Em relação aos bioensaios de exposição de 20 µg/mL de da Cry1Ac combinados com 70 µg/mL de Cry1F, houve detecção de Cry1Ac apenas na dieta (11% do total inicial), enquanto que a toxina Cry1F foi detectada tanto na dieta (5% do total inicial) quanto nos níveis tróficos dos pulgões *M. persicae* (122% do teor detectado na dieta) e das pré-pupas de *C. sanguinea* (2.728% do teor detectado nos pulgões).



O resultado encontrado para a exposição combinada de Cry1Ac com Cry1F, simulando estaqueamento, em que se detectou apenas a toxina Cry1F, ocorreu talvez porque essa proteína, nas espécies avaliadas, possui maior afinidade de ligação aos receptores intestinais ou ainda porque sua concentração era mais de três vezes superior à Cry1Ac. A fim de averiguar essas hipóteses, bioensaios subsequentes devem ser realizados com ambas as toxinas na mesma concentração e, adicionalmente, com concentrações de Cry1Ac superiores à de Cry1F.

O presente estudo de exposição procurou seguir as orientações de Lövei et al. (2005) e Hilbeck et al. (2012), com cuidado ao planejar ensaios laboratoriais de exposição de proteínas expressas por OGM, evitando contaminações, promovendo exposição contínua e simulando uma rota de exposição tritrófica ecologicamente relevante.

## **8. Conclusões**

As dietas sólidas artificiais à base do pulgão *A. gossypii* para a joaninha *C. sanguinea* permitem o desenvolvimento das larvas até o estágio adulto com uma longevidade satisfatória, porém sem haver reprodução dos indivíduos. Portanto, é necessário aperfeiçoar a dieta sólida artificial para criação do predador a fim de se obter uma dieta que possa ser utilizada em bioensaios de avaliação de risco ambiental de toxinas.

O sistema com dieta líquida artificial para criação de afídeos se mostrou adequado para a criação do pulgão *M. persicae*, garantindo seu desenvolvimento de forma semelhante às populações mantidas no grupo controle ou em plantas em sala de criação. Também foi adequado como forma de criação também do predador *C. sanguinea*, além de servir como uma via de exposição das toxinas Cry aqui testadas, permitindo sua detecção em todos os níveis tróficos. Porém, esse sistema não foi adequado para o pulgão *A. gossypii* e estudos nutricionais mais aprofundados deverão ser realizados para permitir sua criação em dieta artificial líquida.

A toxina Cry1Ac, de forma isolada ou combinada com a toxina Cry1F, não apresentou efeitos sobre o predador não-alvo *C. sanguinea* nas concentrações testadas nos bioensaios em condições de laboratório. Testes para detecção de receptores das entomotoxinas em ambos os insetos poderão permitir compreender melhor os resultados obtidos.

## 9. Referências Bibliográficas

- ALVAREZ-ALFAGEME, F.; BIGLER, F.; ROMEIS, J. Laboratory toxicity studies demonstrating no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. *Transgenic Res*, v. 20, p. 467-479, 2010.
- 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.; ZWAHLEN, C. Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Letters*, v. 9, n. 2, p. 196-214, 2005.
- ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G.; HILBECK, A.; JOHNSTON, J.; CAPALBO, D. M. F.; NELSON, K. C.; UNDERWOOD, E.; FITT, G. P.; SUJII, E. R.; ARPAIA, S.; BIRCH, A. N. E.; PALLINI, A.; WHEATLEY, R. E. Supporting Risk Assessment of Bt Cotton in Brazil: Synthesis and Recommendations. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. p. 346-361
- ANDOW, D. A. Assessing unintended effects of GM plants on biological species. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, v. 6, n. 1, p. 119, 2011.
- ARPAIA, S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; PIRES, C. S. S.; SILVEIRA, F. S. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. p.155-174.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE ALGODÃO (ABRAPA). *Estatísticas 2012 - Números do algodão*. Conteúdo disponível em <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/default.aspx>. Acesso em: jan., 2013.
- ATTALLAH, Y. H.; NEWSON, L. D. Ecological and nutritional studies on *Coleomegilla maculata* De Geer (Coleoptera: Coccinellidae). The development of an artificial diet and laboratory rearing technique. *Journal of Economic Entomology*, v. 59, p. 1173-1179, 1966.
- AUCLAIR, J. L.; CARTIER, J. J. Pea aphid rearing on a chemically defined diet. *Science*, v. 142, p. 1068-1069, 1963.
- AVE, D. A. Stimulation of feeding: insect control agents. In: CHAPMAN, R. F.; DE BOER, G. (Ed.). *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 345-363.
- BARBOSA, L. R.; CARVALHO, C. F.; AUAD, A. M.; SOUZA, B.; BATISTA, E. S. P. Tabelas de esperança de vida e fertilidade de *Myzus persicae* sobre pimentão em laboratório e casa de vegetação. *Bragantia*, Campinas, v. 70, n. 2, p. 375-382, 2011.
- BASTOS, C. S.; PIKANÇO, M. C.; LEITE, G. L. D.; ARAÚJO, J. M. Tabelas de fertilidade e esperança de vida de *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) em couve comum. *Científica*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 187-197, 1996.
- BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. *Ecology: from individuals to ecosystems*. 4. ed. Oxford: Blackwell, 2006. 577 p.
- BERNAL, C. C.; AGUDA, R. M.; COHEN, M. B. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipennis*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, v. 102, p. 21-28, 2002.
- BERNARDES, T. A.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, P. A.; SOUZA, E. S. H.; PIRES, C. S. S.; E. M. G. FONTES; SUJII, E. R. Uso de dieta artificial na criação da joaninha, *Cycloneda sanguinea* L. (Coleoptera: Coccinellidae), em laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO

- DE ENTOMOLOGIA, 22., 2008. *Anais...* Ciência, tecnologia e inovação. Viçosa, MG: UFV, 2008. 1 CD-ROM. Resumo ID: 397-2.
- BIRCH, A. N. E.; GEOGHEGAN, I. E.; MAJERUS, M. E. N.; MCNICOL, J. W.; HACKETT, C. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Tri-trophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. *Molecular Breeding*, v. 5, p. 75-83, 1999.
- BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs*. Chichester: John Wiley & Sons, 2006. 2 V. 1439 p.
- BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; FIUZA, L. M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from south Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae). *Biol. Control*, v. 25, p. 129-135, 2002.
- BOIÇA JR., A. L.; SANTOS, T. M.; KURANISHI, A. K. Desenvolvimento larval e capacidade predatória de *Cycloneda sanguinea* (L.) e *Hippodamia convergens* Guérin-Men. alimentadas com *Aphis gossypii* Glover sobre cultivares de algodoeiro. *Acta Scientiarum*, v. 26, n. 2, p. 239-244, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). *Parecer nº 513/2005 - Liberação Comercial de Algodão Geneticamente Modificado resistente a Insetos Evento 531 - Processo 01200.001471/2003-01*. Disponível em: < <http://www.ctnbio.gov.br/> >. Acesso em: jan., 2013.
- BRASIL. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). *Resolução Normativa nº 05, de 12 de março de 2008*. Disponível em: < <http://www.ctnbio.gov.br/> >. Acesso em: jan., 2013.
- BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). *Acompanhamento da safra brasileira: algodão - levantamento da safra 2011/2012*. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: jan., 2013.
- BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. *Diário Oficial da União*. Poder Executivo, Brasília, DF, 28 mar., 2005. Seção 1. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm) >. Acesso em: jan., 2013.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, v. 49, p. 423-435, 2007.
- BURGIO, G.; LANZONI, A.; ACCINELLI, G.; DINELLI, G.; BONETTI, A.; MAROTTI, I.; RAMILLI, F. Evaluation of Bt-toxin uptake by the non-target herbivore, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), feeding on transgenic oilseed rape. *Bull Entomol Res.*, v. 97, n. 2, p. 211-215, 2007.
- CARTAGENA Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity (CBD). Montreal: Secretariat to the Convention on Biological Diversity, 2000.
- CHI, H.; SU, H. Y. Age-stage, two-sex life tables of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female fecundity and the net reproductive rate. *Environ. Entomol.*, v. 35, p. 10-21, 2006.
- CHUMAKOVA, B. M. Experiments in rearing of predatory beetle *Cryptolaemus montrouzieri* Muls on an artificial diets. *Zesz. Probl. Postep Nauk Roln*, v. 35, p. 195-200, 1962.
- CIVIDANES, F. J.; SOUZA, V. P. Exigências térmicas e tabelas de vida de fertilidade de *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) em laboratório. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 32, n. 3, p. 413-419, 2003.

- COHEN, A. C. *Insect diets: Science and Technology*. Boca Raton, FL.: CRC, 2004. 312 p.
- CRANE, E. *O livro do mel*. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1985. 226p.
- CRAWLEY, M. J. C. *The R book*. Chichester, UK: John Wiley and Sons, 2007.
- DADD, R. H.; MITTLER, T. E. Studies on the artificial feeding of aphid *Myzus persicae* (Sulzer) – III. Some major nutritional requirements. *J. Insect Physiol.*, v. 11, p. 717-743, 1965.
- DAYUAN, X. U. E. *A summary of research on the environmental impact of Bt cotton in China*. Hong Kong: Greenpeace, 2002. (Report published by Greenpeace and Nanjing Institute of Environmental Sciences).
- DE CLERCQ, P.; BONTE, M.; VAN SPEYBROECK, K.; BOLCKMANS, K.; DEFORCE, K. Development and reproduction of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) on eggs of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Phycitidae) and pollen. *Pest Management Science*, v. 61, p. 1129-1139, 2005.
- DE CLERCQ, P. Culture of natural enemies on factitious foods and artificial diets. In: CAPIRERA, J. L. (Ed.). *Encyclopedia of Entomology*. 2. ed. Dordrecht: Springer Science & Business, 2008. p. 1133-1136.
- DENG, S. D.; XU, J.; ZHANG, Q. W.; ZHOU, S. W.; XU, G. J. Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton on population dynamics of non-target pests and natural enemies. *Acta Entomologica Sinica*, v. 46, p. 1-5, 2003.
- DEWAR, A. M. Chemical control. In: EMDEN, H. F. VAN; HARRINGTON, R. (Ed.). *Aphids as crop pests*. Wallingford: CAB International, 2007. p. 391-422
- DOUGLAS, A.; VAN EMDEN, H. F. Nutrition and symbiosis. In: EMDEN, H. F. VAN; HARRINGTON, R. (Ed.). *Aphids as crop pests*. Wallingford: CAB International, 2007.
- DIAS, S. C.; MONNERAT, R. G.; NOBRE, S. D. N.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; SCHMIDT, F. G. V.; LAUMANN, R.; GROSSI DE SÁ, M. F.; SUJIL, E. R. *Parâmetros Bionômicos do Bicudo-do-algodoeiro (Anthonomus grandis) criado em dieta artificial para a realização de bioensaios*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1676-1340, n. 29)
- DUTTON, A.; D'ALESSANDRO, M.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Assessing expression of Bt-toxin (Cry1Ab) in transgenic maize under different environmental conditions. *IOBC/WPRS Bulletin*, v. 27, n. 3, p. 49-55, 2004.
- DUTTON, A.; KLEIN, H.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Environmental Entomology*, v. 27, p. 441-447, 2002.
- DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. *BioControl*, v. 48, p. 611-636, 2003.
- EMDEN, H. F. VAN; ANDREWS, N. Twenty years of rearing the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer) on a fully-defined chemical diet. *Entomologist*, v. 116, p. 169-174, 1997.
- EMDEN, H. F. VAN; HARRINGTON, R. (Ed.), *Aphids as crop pests*. Wallingford: CAB International, 2007. 768 p.
- FARIA, M. R.; LUNDGREN, J. G.; FONTES, E. M. G.; FERNANDES, O. A.; SCHMIDT, F.; TUAT, N. V.; ANDOW, D. A. Assessing the effects of Bt cotton on generalist arthropod predators. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. p. 175-199.

- FERREIRA, V. A.; BERNARDES, T. de A.; CAVALCANTE, K. R.; RIBEIRO, P. de R.; PAULA, D. P.; SUJII, E. R.; FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S. *Exposição do predador Cycloneda sanguinea (Coleoptera: Coccinellidae) à proteína Cry1Ac em ensaio tritrófico*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1676-1340; n. 244).
- FERRY, N.; MULLIGAN, E.; MAJERUS, M.; GATEHOUSE, A. M. R. Biotrophic and tritrophic effects of Bt Cry3A transgenic potato on beneficial, non-target, beetles. *Transgenic Research*, v. 16, p. 795-812, 2007.
- FERRY, N.; MULLIGAN, E.; STEWART, C.; TABASHNIK, B. E.; PORT, G. R.; GATEHOUSE, A. M. R. Prey-mediated effects of transgenic canola on a beneficial, non-target, carabid beetle. *Transgenic Research*, v. 15, p. 501-514, 2006.
- FISZON, J. T. et al. Causas antrópicas. In: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. (Org.). *Fragmentação de ecossistemas: Causas e efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas*. Brasília: MMA/SBF, 2003. p. 66-99.
- FONTES, E. M. G.; RAMALHO, F. de S.; UNDERWOOD, E.; BARROSO, P. A. V.; SIMON, M. F.; SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; BELTRÃO, N. E. de M.; LUCENA, W. A. S.; FREIRE, E. C. The cotton agriculture context in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. p. 21-66.
- FUNICHELLO, M.; COSTA, L. L.; BUSOLI, A. C. Aspectos biológicos e tabela de vida de fertilidade de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) em cultivares de algodoeiro DELTAOPAL e NUOPAL. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 84-90, 2012.
- GATEHOUSE, A. M. R.; FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; BELL, H. A. Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, v. 366, p. 1438-1452, 2011.
- GREGORY, J. F. Vitamins. In: FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. 3. ed. [S.l.]: Marcel Dekker, 1996. p. 531-616.
- GRENIER, S.; GREANY, P. D.; COHEN, A. S. Potential for mass release of insect parasitoids and predators through development of artificial culture techniques. In: ROSEN, D.; BENNETT, F. D.; CAPINERA, J. L. *Pest Management in the Subtropics. Biological Control - A Florida Perspective*. Andover, UK: Intercept, 1994. p. 181-205.
- GUO, J. Y.; WAN, F. H.; DONG, L.; SHAN, H. Y.; HAN, Z. J. Survival, development and fecundity of *Chrysopa formosa* feeding on *Aphis gossypii* propagated on transgenic Bt cotton. *Chinese Bull. Entomol.*, v. 42, p. 149-154, 2005.
- GURNEY, B.; HUSSEY, N. W. Evaluation of some coccinellid species for the biological control of aphids in protected cropping. *Annals of Applied Biology*, v. 65, p. 451-458, 1970.
- HEAD, G.; BROWN, C. R.; GROTH, M. E.; DUAN, J. J. Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, v. 99, p. 37-45, 2001.
- HILBECK, A.; BAUMGARTNER, M.; FRIED, P. M.; BIGLER, F. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, v. 27, p. 480-487, 1998.
- HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. 373 p.

- HILBECK, A.; MCMILLAN, J. M.; MEIER, M.; HUMBEL, A.; SCHLÄPFER-MILLER, J.; TRTIKOVA, M. A controversy re-visited: Is the coccinellid *Adalia bipunctata* adversely affected by Bt toxins? *Environmental Sciences Europe*, v. 24, n. 10, 2012.
- HODEK, I. Biology of Coccinellidae. Prague: Academia Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1973. 260 p.
- HODEK, I.; EVANS, E. W. Food relationships. In: HODEK, I.; VAN EMDEN, H. F.; HONĚK, A. (Ed.). *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 2012. 600 p.
- HODEK, I.; HONEK, A. *Ecology of coccinellidae*. Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers, 1996. 480 p.
- HODEK, I.; RUZICKA, Z.; HODKOVÁ, M. Pollinivorie et aphidophagie chez *Coleomegilla maculata*. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, v. 10, p. 453-459, 1978.
- HOOPER, T. *Guia do apicultor*. 3. ed. Sintra: Europa America, 1981. 269 p.
- IPERTI, G. Biodiversity of predaceous coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 74, p. 323-342, 1999.
- IŞIKBER, A. A.; COPLAND, M. J. W. Effects of various aphid foods on *Cycloneda sanguinea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 102, p. 93-97, 2002.
- KAZANA, E.; POPE, T. W.; TIBBLES, L.; BRIDGES, M.; PICKETT, J. A.; BONES, A. M.; POWELL, G.; ROSSITER, J. T. The cabbage aphid: a walking mustard oil bomb. *Proc. R. Soc. B*, v. 274, p. 2271-2277, 2007.
- LAWO, N. C.; WÄCKERS, F. L.; ROMEIS, J. Indian Bt Cotton Varieties Do Not Affect the Performance of Cotton Aphids. *Plos One*, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2009.
- LIU, X. D.; ZHAI, B. P.; ZHANG, X. X.; ZONG, J. M. Impact of transgenic cotton plants on a non-targeted pest *Aphis gossypii* Glover. *Ecological Entomology*, v. 30, p. 307-315, 2005.
- LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S.; CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, v. 399, p. 214, 1999.
- 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.
- MENDONÇA-HAGLER, L. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; ANYANGO, B. M.; SIQUEIRA, J. O.; PHAN, V. T.; WHEATLEY, R. E. Non-target and biodiversity impacts in soil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. V. 2, p. 225-260.
- MICHAUD, J. P. Development and reproduction of ladybeetles (Coleoptera: Coccinellidae) on the citrus aphids *Aphis spiraecola* Patch and *Toxoptera citricida*, (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). *Biological Control*, v. 18, p. 287-297, 2000.
- MICHAUD, J. P. On assessment of prey suitability in aphidophagous Coccinellidae. *European Journal of Entomology*, v. 102, n. 3, p. 385-390, 2005.
- MICHELOTTO, M. D.; BUSOLI, A. C. Biologia de *Aphis gossypii* em plantas infectadas pelo vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro. *Bragantia, Campinas*, v. 68, n. 4, p. 1017-1024, 2009.
- MICHELOTTO, M. D.; CHAGAS FILHO, N. R.; SILVA, R. A.; BUSOLI, A. C. Longevidade e parâmetros reprodutivos de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) sobre berinjela em diferentes temperaturas. *Ciência Rural*, v. 35, p. 788-793, 2005.
- MITTLER, T. E.; DADD, R. H. Artificial feeding and rearing of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). on a completely defined synthetic diet. *Nature*. v. 195, p. 404, 1962.

- MOHAGHEGH, J.; AMIR-MAAFI, M. Reproduction of the predatory stinkbug *Andrallus spinidens* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) on live and frozen prey. *Applied Entomology and Zoology*, v. 42, p. 15–20, 2007.
- MOONEY, H. A.; RISSER, P. G. Special Feature: The Release of genetically Engineered Organisms: A Perspective From the Ecological Society of America. *Ecological Society of America*, v. 70, n. 2, p. 297, 1989.
- MONNERAT, R. G.; DIAS, S. C.; OLIVEIRA NETO, O.B. de; NOBRE, S. D.; SILVA-WERNECK, J. O.; SÁ, M. F. G. de. *Criação massal do bicudo do algodoeiro Anthonomus grandis em laboratório*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 4 p. (Comunicado Técnico. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 46).
- MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biological Control*, vol. 41, p. 291-295. 2007.
- NAKASU, E. Y. T.; DIAS, S. C.; PIRES, C. S. S.; ANDOW, D. A.; PAULA, D. P.; TOGNI, P. H. B.; MACEDO, T. R.; SUJII, E. R.; SÁ, M. F. G. de; FONTES, E. M. G. Biotrophic toxicity of Cry1Ac to *Cycloneda sanguinea*, a predator in Brazilian cotton. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2013. (Aceito para publicação).
- NARANJO, S. E. Impacts of Bt Transgenic Cotton on Integrated Pest Management. *J. Agric. Food Chem*, v. 59, p. 5842-5851, 2011.
- OLIVEIRA, G. R.; SILVA, M. C.; LUCENA, W. A.; NAKASU, E. Y.; FIRMINO, A. A.; BENEVENTI, M. A.; SOUZA, D. S.; GOMES, J. E. JR.; DE SOUZA, J. D. JR.; RIGDEN, D. J.; RAMOS, H. B., SOCCOL, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnol*, v. 11, n. 85, 13 p., 2011.
- OLIVEIRA, N. C.; WILCKEN, C. F.; MATOS, C. A. O. Ciclo biológico e predação de três espécies de coccinélídeos (Coleoptera, Coccinellidae) sobre o pulgão-gigante-do-pinus *Cinara atlantica* (Wilson) (Hemiptera, Aphididae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 48, n. 4, p. 529-533, 2004.
- PALLINI, A. P.; SILVIE, P.; MONNERAT, R. G.; RAMALHO, F. S.; SONGA, J. M.; BIRCH, A. N. E. Non-target and biodiversity impacts on parasitoids. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. p. 200-224.
- PARRA, J. R. P. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.), *Bioecologia e nutrição de insetos: Base para o manejo integrado de pragas*. Embrapa Informação Tecnológica, 2009. v. 1, p. 91-174.
- PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 1015-1038.
- PAULA, G. A. Modelos de regressão com apoio computacional. São Paulo: IME-USP, 2004.
- PUSZTAI-CAREY, M.; CAREY, P. R.; LESSARD, T.; YAGUCHI, M. Isolation, quantitation, and purification of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. U.S. Patent 5,356,788, 1994.
- QAIM, M.; ZILBERMAN, D. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science*, v. 299, n. 5608, p. 900–902, 2003.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.
- RAMALHO, F. S.; DIAS, JOSÉ M. Efeitos de hospedeiros alternativos na biologia de *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitóide de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Neotrop. Entomol.*, Londrina, v. 32, n. 2, 2003.
- RAPS, A.; KEHR, J.; GUGERLI, P.; MOAR, W. J.; BIGLER, F.; HILBECK, A. Detection of Cry1Ab in phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and in the non-target herbivores *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphidae) and *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology*, v. 10, p. 525-533, 2001.
- RICHETTI, A. *Estimativa do custo de produção de algodão, safra 2007/08, para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso*. Embrapa: Dourados, 2007. 14 p. (Comunicado Técnico, 136)
- ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 1, p. 63-71, 2006.
- SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R.; TÔRRES, R. M. S.; NASCIMETNO, F. B. Aspectos biológicos e consumo alimentar de larvas de *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Coccinellidae) alimentadas com *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae). *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1273-1278, 2001.
- SANTOS, G. P.; PINTO, A. C. Q. Biologia de *Cycloneda sanguinea* e sua associação com pulgão em mudas de mangueira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 16, n. 4, p. 473-476, 1981.
- SANTOS, M. T.; FIGUEIRA, K. L.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; LARA, F. M.; CRUZ, I. Efeito da alimentação de *Schizaphis graminum* no desenvolvimento do predador *Cycloneda sanguinea* com genótipos de sorgo. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 5, p. 555-560, 2003.
- SAXENA, D.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ*. *Microbiology Ecology*, v. 33, p. 35-39, 2000.
- SCHMIDT, J. E. U.; BRAUN, C. U.; WHITEHOUSE, L. P.; HILBECK, A. Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 56, p. 221-228, 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, p. 775-806, 1998.
- SIEBERT, M. W.; PATTERSON, T. G.; GILLES, G. J.; NOLTING, S. P.; BRAXTON, L. B.; LEONARD, B. R.; VAN DUYN, J. W.; LASSITER, R. B. Quantification of Cry1Ac and Cry1F *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in selected transgenic cotton plant tissue types. *J. Econ. Entomol.*, v. 102, p. 1301-1308, 2009.
- SILVA, R. B. da; CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; TAVARES, W. S. Development of *Coleomegilla maculata* de Geer (Coleoptera: Coccinellidae) with prey and artificial diet. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 9, p. 13-26, 2010.
- SILVA, T. B. M.; BASTOS, C. S.; BARROSO, P. A. V.; SUINAGA, F. A.; ALMEIDA, M. G. M.; SILVEIRA, J. D. M. Tabela de vida de fertilidade de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) em nove genótipos de algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia: [s.n.], 2007.
- SILVA-SANTOS, P. V.; SANTOS, P. H. R.; SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; LAUMANN, R.; SILVA, K. F. A. S.; FONTES, E. M. G. Relações tróficas da cultura do algodão que



- influenciam a dinâmica de herbívoros-praga. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 10., Brasília, DF, 2005. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
- SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. *Metodologias para caracterização de isolados de Bacillus thuringiensis*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 4 p. (Circular Técnica. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 10).
- SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BALDIN, D.; VILLANOVA, N. A. *Manual de ecologia dos insetos*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419p.
- SIMS, S. R. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Cry1Ac) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist*, v. 30, n. 4, p. 493-500, 1995.
- SISTERSON, M. S.; BIGGS, R. W.; MANHARDT, N. M.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; TABASHNIK, B. E. Effects of transgenic Bt cotton on insecticide use and abundance of two generalist predators. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 24, p. 305–311, 2007.
- SISTERSON, M. S.; BIGGS, R. W.; OLSON, C.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; TABASHNIK, B. E. Arthropod Abundance and Diversity in Bt and Non-Bt Cotton Fields *Environmental Entomology*, v. 33, n. 4, p. 921-929, 2004.
- SMIRNOFF, W. A. An artificial diet for rearing coccinellid Beetles. *The Canadian Entomologist*, v. 90, p. 563-565, 1958.
- SNOW, A.; ANDOW, D. A.; GEPTS, P.; HALLERMAN, E. M.; POWER, A.; TIEDJE, J. M.; WOLFENBARGER, L. L. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecological Applications*, v. 15, n. 2, p. 377-404, 2005.
- SOARES, A. O.; CODERRE, D.; SCHANDERL, H. Dietary self-selection behaviour by the adults of the aphidophagous ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Animal Ecology*, v. 73, p. 478-486, 2004.
- SOUZA, V. P. *Dinâmica populacional de Myzus persicae (Sulzer, 1776), Brevicoryne brassicae (Linnaeus, 1758) e Lipaphis erysimi (Kaltenbach, 1843) (Hemiptera: Aphididae) na região de Jaboticabal, SP*. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- SUJII, E. R., LÖVEI, G. L., SÉTAMOU, M., SILVIE, P., FERNANDES, M. G., DUBOIS, G. S. J.; ALMEIDA, R. P. Non-target and biodiversity impacts on non-target herbivorous pests. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. Cambridge: CABI, 2006. p. 133-154.
- SUJII, E. R.; TOGNI, P. H. B.; NAKASU, E. Y. T.; PIRES, C. S. S.; PAULA, D. P.; FONTES, E. M. G. *Impacto de algodoeiro Bt na dinâmica populacional do pulgão-do-algodoeiro em casa de vegetação*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1676-1340; n. 43)
- SZUMKOWSKI, W. Aparición de un coccinélido predato nuevo para Venezuela. *Agronomia Tropical*, v. 11, p. 33-37, 1961.
- TAMAKI, G.; ANNIS, B.; FOX, L.; GUPTA, R. K.; MESZLENY, A. Comparison of yellow holocyclic and green anholocyclic strains of *Myzus persicae* (Sulzer): low temperature adaptability. *Environ. Entomol.*, v. 11, p. 231-233, 1982.
- TARVER, M. R.; SHADE, R. F.; SHUKLE, R. H.; MUIR, W. M.; MURDOCK, L. M.; PITTENDRIGH, B. R. Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). *Pest Manag. Sci*, v. 63, p. 440-446, 2007.

- TIEDJE, J. M.; COLWELL, R. K.; GROSSMAN, L. Y.; HODSON, R. E.; LENSKI, R. E.; MACK, R. N.; REGAL, P. J. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecological Society of America*, v. 70, n. 2, p. 298-315, 1989.
- TOENNIESSEN, G. H.; O'TOOLE, J. C.; DEVRIES, J. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Curr. Opinion Plant Biol.* v. 6, n. 2, p. 191-198, 2003.
- TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R.; ADANG, M. J. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agric For Entomol*, v. 8, p. 191-202, 2006.
- TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Research*, v. 17, p. 345-354, 2008.
- ZHANG, G. F.; WAN, F. H.; GUO, J. Y.; HOU, M. L. Expression of Bt toxin in transgenic Bt cotton and its transmission through pests *Helicoverpa armigera* and *Aphis gossypii* to natural enemy *Propylaea japonica* in cotton plots. *Acta Entomologica Sinica*, v. 47, p. 334-341, 2004.
- ZHANG, G. F.; WAN, F. H.; LÖVEL, G. L.; LIU, W.; GUO, J. Transmission of Bt Toxin to the Predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) Through Its Aphid Prey Feeding on Transgenic Bt Cotton. *Environmental Entomology*, v. 35, n. 1, p. 143-150, 2006.
- ZHANG, G. F.; WAN, F. H.; MURPHY, S. T.; GUO, J. Y.; LIU, W. X. Reproductive Biology of Two Nontarget Insect Species, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) and *Orius sauteri* (Hemiptera: Anthocoridae), on Bt and non-Bt Cotton Cultivars. *Environmental Entomology*, v. 37, n. 4, p. 1035-1042, 2008.
- ZHANG, Y. J.; SUN, Y.; YUAN, H. B.; WU, K. M.; PENG, Y. F.; GUO, Y. Y. Effects of transgenic Bt-cry1Ab corn pollen on the growth and development and the activity of three metabolic enzymes in *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomologica Sinica*, v. 48 n. 6, p. 898-902, 2005.
- ZWAHLEN, C.; HILBECK, A.; GUGERLI, P.; NENTWIG, W. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, v. 3, p. 765-775.
- WALE, M.; BEKELE, J.; EMIRU, S. Biology of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae) on cool-season legumes. *Insect Sci. Appl.*, v. 20, p. 171-180, 2000.
- WELKE, J. E.; REGINATTO, S.; FERREIRA, D.; VICENZI, R.; SOARES, J. M. Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, v.38, n. 6, p. 1737-1741, 2008.
- WHEELER, D. E. The role of nourishment in oogenesis. *Annual Review of Entomology*, v. 41, p. 345-369, 1996.
- WHITEHOUSE, M. E. A.; WILSON, L. J.; FITT, G. P. A Comparison of Arthropod Communities in Transgenic Bt and Conventional Cotton in Australia. *Environmental Entomology*, v. 34, p. 1224-1241, 2005.
- WILLIAMS, I. S.; DIXON, A. F. G. Life cycles and polymorphism. In: EMDEN, H. F. VAN; HARRINGTON, R. (Ed.), *Aphids as crop pests*. Wallingford: CAB International, 2007. p. 69-85.