

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**Nermy Ribeiro Valadares**

**DESENVOLVIMENTO DE ARTRÓPODES NÃO ALVOS E ESTRESSE  
FISIOLÓGICO EM ALGODOEIRO GENETICAMENTE MODIFICADO  
EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CRY1F E CRY1AC**

**DIAMANTINA - MG**

**2017**

**Nermy Ribeiro Valadares**

**DESENVOLVIMENTO DE ARTRÓPODES NÃO ALVOS E ESTRESSE  
FISIOLÓGICO EM ALGODOEIRO GENETICAMENTE MODIFICADO  
EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CRY1F E CRY1AC**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração Manejo Integrado de Pragas, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares

**DIAMANTINA - MG  
2017**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

V136d

Valadares, Nermy Ribeiro

Desenvolvimento de artrópodes não alvos e estresse fisiológico em algodoeiro geneticamente modificado expressando as proteínas CRY1F e CRY1AC / Nermy Ribeiro Valadares. – Diamantina, 2017. 43 p. : il.

Orientador: Marcus Alvarenga Soares

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Algodão. 2. Transgenia. 3. Organismos não alvos. I. Título.  
II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 633.51**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

NERMY RIBEIRO VALADARES

**Desenvolvimento de artrópodes não alvos e estresse fisiológico em algodoeiro geneticamente modificado expressando as proteínas Cry1f e Cry1ac**

Dissertação apresentada ao  
PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO  
VEGETAL, nível de MESTRADO,  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de MAGISTER  
SCIENTIAE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL

Orientador: Prof. Dr. Marcus  
Alvarenga Soares

Data da aprovação 17/02/2017

Dr. Veríssimo Gibran Mendes de Sá - Dow AgroSciences

Prof. Dr. Evander Alves Ferreira – UFVJM

Prof. Dr. Sebastião Lourenço de Assis Júnior - UFVJM

Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares - UFVJM

DIAMANTINA

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Benedito e Neuza, pelo amor, atenção, apoio, pelos valores, por serem minha base, de onde tiro forças, agradeço por tudo, sem eles nada seria.

A toda minha família, em especial a minha irmã Leonora, e meus avós José (*in memoriam*) e Nermy; Lucas e Raimunda, que sempre estiveram ao meu lado.

Ao Alcinei pelo companheirismo e amor.

A Deus por ser fonte de sabedoria e calma.

A UFVJM e todos os professores, pelos ensinamentos.

Em especial ao professor Marcus pelas oportunidades e confiança.

Aos colegas do grupo de estudos NEMIP

A todos os meus amigos e colegas, que de alguma forma me ajudaram e alegraram nesses anos.

A banca pela disponibilidade.

## RESUMO

NERMY RIBEIRO VALADARES. **DESENVOLVIMENTO DE ARTRÓPODES NÃO ALVOS E ESTRESSE FISIOLÓGICO EM ALGODOEIRO GENETICAMENTE MODIFICADO EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CRY1F E CRY1AC.** (Dissertação - Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de algodão, não apenas em volume, mas também em qualidade e inovação. Porém, o ataque de insetos pragas é um dos principais entraves para a produtividade das lavouras de algodão, o que é acentuado pelas grandes áreas de monocultivo. Uma das táticas de manejo que está sendo empregada é a resistência de plantas. A cultura hospeda diversos organismos, dentre eles um grande número de artrópodes como o pulgão *Aphis gossypii* Glover 1877 (Hemiptera: Aphididae) e o ácaro fitófago *Tetranychus ludeni* Zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae), que se alimentam da parte aérea das plantas, podendo causar prejuízos econômicos. As variedades transgênicas utilizadas no manejo de pragas são desenvolvidas para controlar determinado grupo de insetos, de acordo com a toxina que expressam. Porém ao serem expressas continuamente, essas toxinas ficam expostas aos demais herbívoros que se hospedam na planta, surgindo uma preocupação de que o uso em larga escala desta tecnologia possa ter efeitos adversos sobre artrópodes não alvos. O impacto das proteínas Bt em artrópodes não visados é menos compreendido do que os seus efeitos nos organismos alvos, onde o mecanismo da ação tóxica é conhecido. Há pouca informação sobre efeitos de transgênicos Bt sobre populações de pulgões e ácaros, e sobre o estresse causado pelo ataque desses artrópodes. Com isso, esse trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de organismos não alvos em algodão geneticamente modificado. E avaliar o estresse fisiológico causado pelo ataque de ácaros e pulgões em algodão transgênico e convencional. De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que as toxinas Cry1F e Cry1Ac não exercem qualquer efeito no desenvolvimento do *T. ludeni*, e que o algodão Bt foi menos infestado por *A. gossypii*. A severidade da infestação desses artrópodes causa alterações nos parâmetros da fluorescência da clorofila, promovendo estresse fisiológico nas plantas, tanto do algodão Bt como da isolinha. Coletivamente, esses resultados fornecem fortes evidências de que a tecnologia Bt pode complementar outras táticas integradas de controle de pragas, especialmente se em conjunto com o controle biológico.

**Palavras-chave:** Algodão, Transgenia, Organismos não alvos

## ABSTRACT

NERMY RIBEIRO VALADARES. **DEVELOPMENT OF NON-TARGETED ARTHROPODS AND PHYSIOLOGICAL STRESS IN GENETICALLY MODIFIED COTTON EXPRESSING CRY1F AND CRY1AC PROTEINS** 2017. 44 p. Dissertation (Masters in Plant Production) - Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Diamantina, 2017.

Brazil is one of the world's largest cotton producers, not only in terms of volume but also in quality and innovation. However, insect pest attack is one of the main barriers to cotton productivity, which is accentuated by large areas of monoculture. One of the management tactics that is being used is the resistance of plants. The culture hosts several organisms, including a large number of arthropods such as the aphid *Aphis gossypii* Glover 1877 (Hemiptera: Aphididae) and the phytophagous spider mite *Tetranychus ludeni* zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae), which feed on the aerial part of the plants. Cause economic losses. The transgenic varieties used in pest management are developed to control a particular group of insects, according to the toxin they express. However, when expressed continuously, these toxins are exposed to other plant-eating herbivores, raising concerns that large-scale use of this technology may have adverse effects on non-target arthropods. The impact of Bt proteins on non-target arthropods is less understood than its effects on target organisms where the mechanism of toxic action is known. There is little information on the effects of Bt transgenics on populations of aphids and mites, and on the stress caused by the attack of these arthropods. The objective of this work was to evaluate the development of non-target organisms in genetically modified cotton and to evaluate the physiological stress caused by the attack of spider mites and aphids in transgenic and conventional cotton. According to the results obtained it is possible to conclude that the toxins Cry1F and Cry1Ac have no effect on the development of *T. ludeni*, and that Bt cotton was less infested by *A. gossypii*. The severity of the infestation of these arthropods causes changes in chlorophyll fluorescence parameters, promoting plant Physiological stress in both Bt cotton and isolate. Collectively, these results provide strong evidence that Bt technology can complement other integrated pest control tactics, especially if coupled with biological control.

**Key words:** Cotton, Transgenic, Non-target organisms

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
DESENVOLVIMENTO DE <i>Tetranychus ludeni</i> zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae) E ESTRESSE FISIOLÓGICO EM ALGODOEIRO GENETICAMENTE MODIFICADO EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CRY1F E CRY1AC.....	17
1. Introdução.....	19
2. Material e métodos .....	21
2.1 Obtenção dos dados biológicos de <i>T. ludeni</i> .....	21
2.2 Teste de preferência alimentar de <i>T. ludeni</i> .....	22
2.3 Avaliação do estresse fisiológico do algodoeiro .....	22
2.4 Análises estatísticas.....	22
3. Resultados .....	23
3.1 Biologia de <i>T. ludeni</i> .....	23
3.2 Preferência Alimentar.....	25
3.3 Estresse Fisiológico .....	25
4. Discussão.....	27
5. Conclusões .....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
DESENVOLVIMENTO DO <i>Aphis gossypii</i> Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) E ESTRESSE FISIOLÓGICO EM ALGODOEIRO GENETICAMENTE MODIFICADO EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CRY1F E CRY1AC.....	34
1. Introdução.....	36
2. Material e métodos .....	37
2.1 Avaliações da infestação de <i>A. gossypii</i> .....	37
2.1 Avaliações do estresse fisiológico do algodoeiro.....	38
2.2 Análises estatísticas .....	38
3. Resultados .....	38
3.1 Infestação de <i>A. gossypii</i> .....	38
3.2 Estresse fisiológico .....	39
4. Discussão.....	42
5. Conclusões .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
CONCLUSÃO GERAL .....	46



## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil tem raízes firmes na cultura do algodão. É desde a época colonial, um dos maiores produtores mundiais dessa matéria-prima, não apenas em volume, mas também em qualidade e inovação (LIMA JUNIOR, *et al.*, 2012). A indústria têxtil e de confecção brasileira produz cerca de 60% de seus produtos utilizando essa fibra natural. Sua importância vem aumentando, também, em decorrência do óleo, uma importante alternativa para a produção de energia (BELTRÃO; AZEVEDO, 2008).

Atualmente a cotonicultura é uma atividade de relevante importância econômica para o agronegócio brasileiro. O país está entre os cinco maiores produtores mundiais, ao lado de países como a China, Índia, EUA e Paquistão. Sendo também o terceiro país exportador e o primeiro em produtividade no sequeiro (ABRAPA, 2016). Porém, o ataque de insetos pragas é um dos principais entraves para a produtividade das lavouras de algodão, o que é acentuado pelas grandes áreas de monocultivo. A cultura exige numerosas aplicações de inseticidas e acaricidas durante as fases de desenvolvimento (NUNES, 2010), pois hospeda diversos organismos, dentre eles um grande número de artrópodes.

O pulgão *Aphis gossypii* Glover 1877 (Hemiptera: Aphididae) é uma das principais pragas do algodoeiro em razão dos danos diretos, causados pela sucção do floema, e indiretos pela transmissão de viroses. Além de favorecer a ocorrência de fungos, como a fumagina, que indiretamente prejudicam a qualidade e quantidade das fibras do algodoeiro (FONTES *et al.*, 2006). Este inseto alimenta-se sugando continuamente a seiva, causando encarquilhamento das folhas, deformação dos brotos e redução severa no desenvolvimento da planta. A espécie *A. gossypii* é encontrada em todos os continentes, sendo particularmente abundante nos trópicos, onde ataca diversas culturas além do algodão, tais como o melão, melancia, pimenta, pepino, batata, cajueiro, tomate e plantas ornamentais (GALLO *et al.* 1988).

Entre as pragas do algodoeiro, o pulgão *A. gossypii* tem se destacado pelo aumento da resistência aos inseticidas e escape à predação e ao parasitismo devido à redução desses agentes de controle biológico, podendo provocar reduções na produção (WEATHERSBEE; HARDEE, 1994).

Outros artrópodes danosos à cultura são os ácaros fitófagos, que se alimentam da parte aérea das plantas, podendo causar prejuízos econômicos (MENEZES, *et al.*, 2007). Sendo o ácaro rajado - *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae), vermelho - *Tetranychus ludeni* Zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae) e branco - *Polyphagotarsonemus*

*latus* Banks, 1904 (Acari: Tarsonemidae) relatados como pragas secundárias do algodoeiro (MIRANDA, 2010). Porém, podem causar reduções significativas na colheita e qualidade da fibra, afetando também outras características, como a viabilidade das sementes (SILVA, 2002).

O *T. ludeni* causa danos à várias espécies de plantas. Seu ataque tem início geralmente nas folhas mais velhas generalizando-se por toda a planta. As folhas atacadas apresentam pequenas manchas avermelhadas entre as nervuras, que posteriormente tomam toda a folha, que seca e cai (NAKANO, SILVEIRA NETO, ZUCCHI, 1981).

Devido a seu hábito polífago, vários autores registraram ocorrência de ataque de *T. ludeni* em diversas culturas, como Soares *et al.* (2012) e Castro *et al.* (2014) que verificaram ataque em plantas de batata-doce, causando danos severos e morte de plantas bem como a ocorrência de seu controlador natural *Phytoseiulus macropilis* Banks, 1904 (Acari: Phytoseiidae). Soares *et al.* (2014) também registraram ocorrência de ataque do *T. ludeni* causando redução na área fotossintética, no crescimento vegetativo e produção de frutos em plantas de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). Já Roggia (2008) relatou ataque deste ácaro em soja.

Uma das táticas utilizadas no manejo integrado de pragas na cultura do algodão é a tecnologia das plantas geneticamente modificadas, possibilitando a redução do número de aplicações de inseticidas químico-sintéticos e promovendo o controle mais efetivo de pragas (SHARMA; ORTIZ, 2000).

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) são entidades biológicas manipuladas de modo a favorecer características desejadas pelo homem, cujo material genético foi alterado por meio de qualquer técnica de engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante (COSTA, *et al.*, 2011). Essas variedades modificadas, após a aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, são lançadas no mercado, e continuam sendo monitoradas para avaliar seu efeito sobre o ambiente, resistência de pragas, alergenicidade em humanos, impactos sobre organismos não alvos, entre outros aspectos.

A tecnologia dos OGMs melhora a qualidade e rendimento dos cultivos, promovendo resistência a pragas e doenças, e ao estresse ambiental das culturas, garantido maior produtividade e reduzindo a utilização de produtos químicos. Com a exploração de algodoeiros geneticamente modificados com genes provenientes de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911, países como China e a Índia, por exemplo, diminuíram o uso de inseticidas em mais de 50% (JAMES, 2015). Além disso, houve redução do número de ocorrências de

intoxicações dos aplicadores e aumento do número de espécies de insetos benéficos (WU; GUO, 2003).

Nesse contexto, o uso de plantas com genes da bactéria *B. thuringiensis* conferindo proteção contra espécies de lepidópteros ganha destaque no Brasil. Este é o caso do algodoeiro 281-24-236/3006-210-23 que foi liberado para comercialização no Brasil pela CTNBio, em março de 2009. O algodoeiro tinha como objetivo agrônomo controlar diversas lagartas, tais como *Heliothis virescens* Fabrícus, 1781 (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea* Boddie, 1850, (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), *Alabama argillacea* Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* Saunders, 1844 (Lepidoptera: Gelechiidae), *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera eridania* Cramer, 1782 (Lepidoptera; Noctuidae) e *Chrysodeixis includens* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae). Foi obtido por retrocruzamentos piramidados entre os eventos 281-24-236, contendo o gene *cryIF*, que codifica para a toxina Cry1F e o evento 3006-210-23 contendo o gene *cryIAC*, que codifica a toxina Cry1Ac. Ambas as toxinas são proteínas inseticidas cristalizadas, obtidas de *B. thuringiensis* var *aizawai* cepa PS811 e de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD73, respectivamente (CTNBIO, 2016). A combinação de duas diferentes proteínas Bt tem sido um recurso muito utilizado no mercado para aumentar a eficiência no controle de pragas alvos, reduzindo o risco de evolução da resistência de insetos.

Além de resistência a insetos pela ação dos genes *cryIF* e *cryIAC*, o algodoeiro 281-24-236/3006-210-23 também apresenta resistência ao herbicida glufosinato de amônio devido a presença de duas cópias do gene *pat*, que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase - *pat*. O gene *Pat* é uma versão baseada no gene natural de *Streptomyces viridochromogenes* (Krainky) Waksman & Henrici, 1914, uma bactéria não patogênica encontrada no solo. A proteína *Pat* não confere atividade inseticida, e não há efeito adverso desta proteína conhecido no ambiente ou ao homem, bem como toxicidade ou alergenicidade relatada (CTNBIO, 2016).

As variedades transgênicas são desenvolvidas para controlar determinado grupo de insetos, como visto anteriormente, de acordo com a toxina que expressam. As toxinas Cry1F e Cry1AC são específicas para lepidópteros. Porém ao serem expressas continuamente, essas toxinas ficam expostas aos demais herbívoros que se hospedam na planta e, conseqüentemente, aos seus inimigos naturais, assim como a outros insetos benéficos, como os polinizadores (TORRES; RUBERSON, 2008), surgindo uma preocupação de que o uso em

larga escala desta tecnologia possa ter efeitos adversos sobre artrópodes não alvos que estão associados a essas variedades (SZENASI *et al.*, 2014).

O estresse fisiológico causado pelo ataque dessas pragas à planta é diferenciado em variedades geneticamente modificadas, podendo a própria inserção do gene, especialmente em eventos piramidados ou estaqueados, alterar a expressão gênica total da planta, contribuindo para a magnitude do estresse (AGAPITO-TENFEN *et al.*, 2014).

O impacto das proteínas Bt em artrópodes não visados é menos compreendido do que os seus efeitos nos organismos alvos, onde o mecanismo da ação tóxica é conhecido (YUAN *et al.*, 2014). Alguns estudos foram realizados investigando possíveis efeitos de plantas transgênicas sobre organismos não alvos, porém há pouca informação sobre efeitos de transgênicos Bt sobre populações de pulgões e ácaros, e sobre possível estresse causado pelo ataque dessas pragas a cultura.

Com isso, esse trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de organismos não alvos em algodão geneticamente modificado, resistente a lepidópteros pragas e tolerante a herbicida. E avaliar o estresse fisiológico no algodoeiro transgênico e seu respectivo isogênico convencional causado pelo ataque de ácaros e pulgões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPITO-TENFEN, S. Z. *et al.* Effect of stacking insecticidal cry and herbicide tolerance epsps transgenes on transgenic maize proteome. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 346, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO. **O algodão no Brasil**. Brasília, DF: ABRAPA, 2016. Disponível em: <http://www.abrapa.com.br/estatisticas/Paginas/Algodao-no-Brasil.aspx>. Acesso em: 17/02/2016.
- BELTRÃO, N.E.M.; AZEVEDO, D.M. P. **O agronegócio de algodão no Brasil**. [S.l.]. Embrapa Algodão, 2008.
- CASTRO, B.M.C. *et al.* The predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) occurring on sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants in Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n. 3, p. 685-686, 2014.
- COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Liberações**. CTNBio, 2016.
- COSTA, T. E. M. M. *et al.* Avaliação de risco dos organismos geneticamente modificados. Rio de Janeiro, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.16, n.1, p. 327-336, 2011.
- FONTES, E. M. G. *et al.* The cotton agricultural context in Brazil. Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. Wallingford. **CABI**, p. 21, 2006.
- Gallo, D. *et al.* **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1988.
- JAMES, C. **20th Anniversary of the Global Commercialization of Biotech Crops (1996 to 2015) and Biotech Crop Highlights in 2015**. [S.l.]. ISAAA Brief, 2015.
- LIMA JÚNIOR, J. C. *et al.* **Estratégias para o algodão no Brasil**. São Paulo, SP. Editora Atlas S. A., 2012.
- MENEZES, E. L. A. *et al.* **Ácaros: taxonomia, bioecologia e sua importância agrícola**. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. Documentos, 2007.
- MIRANDA, J. E. **Manejo integrado de pragas do algodoeiro no cerrado brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão. Circular Técnica, 2010.
- NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. **Entomologia Econômica**. São Paulo, SP. Livroceres, 1981.
- NUNES, D. H. **Efeito do algodoeiro geneticamente modificado (Bollgard) em organismos não-avos**. 2010. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- ROGGIA, S. **Caracterização dos fatores responsáveis pelos aumentos populacionais de ácaros tetraniquídeos em soja**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo.

SHARMA, H.C.; ORTIZ, R. Transgenics, pest management, and the environment. **Current Science**, v.79, n.4, p.421-434, 2000.

SILVA, S. A.D. Biologia e exigências térmicas (*Tetranychus ludeni* Zacher) em folhas de algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.5, p. 573-580, 2002.

SOARES, M.A. *et al.* Lesiones de *Tetranychus ludeni* (Acari: Tetranychidae) en el cultivo de *Physalis peruviana* (Solanaceae) en Diamantina, Brasil. **Revista Colombiana de Entomología**, v.40, n.2, p. 187-189, 2014.

SOARES, M. A. *et al.* Attack of two new spider mites on sweet potato (*Ipomoea batatas*) in Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n.4, p. 971-971, 2012.

SZENASI, A. *et al.* Short-term effects of different genetically modified maize varieties on arthropod food web properties: an experimental field assessment. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5315, 2014, 2014.

TORRES, J; B.; RUBERSON, J. R. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. **Transgenic Research**, v. 17, n.3, p. 345-54, 2008.

WEATHERSBEE, A. A.; HARDEE, D. D. Abundance of cotton aphids (Homoptera: Aphididae) and associated biological control agents on six cotton cultivars. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, n. 1, p. 258-265, 1994.

WU, K.; GUO, Y. Influences of *Bacillus thuringiensis* Berliner Cotton Planting on population dynamics of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, in Northern China. **Environmental Entomology**, v. 32, n. 2, p. 312-318, 2003.

YUAN Y. *et al.* Microarray detection and qPCR screening of potential biomarkers of *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) exposed to Bt proteins (Cry1Ab and Cry1Ac). **Environmental Pollution**, v. 184, p. 170-178, 2014.

## ARTIGO CIENTÍFICO I

### DESENVOLVIMENTO DE *Tetranychus ludeni* ZACHER, 1913 (ACARI: TETRANYCHIDAE) E ESTRESSE FISIOLÓGICO EM ALGODOEIRO GENETICAMENTE MODIFICADO EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CRY1F E CRY1AC

RESUMO - O algodoeiro constitui uma das principais culturas para o agronegócio do Brasil. A produção nacional do algodão é, prioritariamente, destinada à indústria têxtil. Diversas espécies de ácaros podem causar reduções significativas na qualidade da fibra e na colheita do algodão. Dentre eles, o ácaro vermelho - *Tetranychus ludeni* zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae), que se encontra amplamente distribuído pelos países produtores. O uso de plantas geneticamente modificadas é uma das táticas utilizadas no manejo integrado de pragas que possibilita a redução do número de aplicações de inseticidas químico-sintéticos e promove o controle mais efetivo de pragas. Há uma grande preocupação com o impacto de plantas geneticamente modificadas sobre organismos não alvos. Por outro lado, existe pouca informação na literatura sobre efeitos de transgênicos Bt sobre populações de ácaros fitófagos, e as respostas fisiológicas que esse ataque promove em plantas geneticamente modificadas e convencionais. Logo, objetivou-se com esse trabalho avaliar a biologia do ácaro fitófago *T. ludeni* em algodoeiro geneticamente modificado, expressando as proteínas Cry1F e Cry1Ac. Avaliar se há um comportamento de preferência alimentar e postura em relação ao algodão Bt e sua isolinha. E verificar ainda se o estresse fisiológico causado pelo ataque de *T. ludeni* é diferenciado em algodão Bt. Os ácaros foram criados em algodão Bt e isolinha, num total de 40 repetições no delineamento inteiramente casualizado, onde foram avaliadas as características do ciclo biológico. A análise de preferência alimentar e de postura foi feita com 10 repetições, com escolha. As análises dos parâmetros da fluorescência da clorofila foram realizadas por meio de fluorômetro em casa de vegetação. Os dados da biologia de *T. ludeni* foram analisados pelo teste t Student, para os dados de preferência alimentar e de postura foi realizado o teste qui-quadrado. Para os parâmetros da fluorescência foram ajustados modelos de regressão para os tratamentos em função da infestação de *T. ludeni*. Para testar as diferenças entre Bt e isolinha foi utilizado o teste de identidade de modelos. As proteínas Cry1F e Cry1Ac não exercem efeito na biologia de *T. ludeni*. Os parâmetros fotossintéticos em plantas de algodão Bt foram menos influenciados pela infestação de *T. ludeni*.

**Palavras-chave:** Algodão, Transgenia, Ácaro

**DEVELOPMENT OF *Tetranychus ludeni* ZACHER, 1913 (ACARI: TETRANYCHIDAE) AND PHYSIOLOGICAL STRESS IN GENETICALLY MODIFIED COTTON EXPRESSING PROTEINS CRY1F AND CRY1AC**

ABSTRACT - Cotton is one of the main crops for Brazil's agribusiness. The national cotton production is primarily intended for the textile industry. Several species of mites can cause significant reductions in fiber quality and cotton harvest. Among them, the red spider mite - *Tetranychus ludeni* zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae), which is widely distributed among producing countries. The use of genetically modified plants is one of the tactics used in integrated pest management that reduces the number of applications of chemical-synthetic insecticides and promotes more effective control of pests. There is great concern about the impact of genetically modified plants on non-target organisms. On the other hand, there is little information in the literature on the effects of Bt transgenics on populations of phytophagous mites, and the physiological responses that this attack promotes in genetically modified and conventional plants. The objective of this work was to evaluate the biology of *T. ludeni* phytophagous spider mite in a genetically modified cotton plant, expressing the Cry1F and Cry1Ac proteins. Evaluate if there is a behavior of food preference and posture in relation to Bt cotton and its isoline. And verify if the physiological stress caused by the attack of *T. ludeni* is differentiated in cotton Bt. The spider mites were created in Bt cotton and isoline, in a total of 40 replicates in a completely randomized design, where the characteristics of the biological cycle were evaluated. The analysis of food preference and posture was done with 10 replicates, with choice. Analyzes of chlorophyll fluorescence parameters were performed using a fluorometer in a greenhouse. Data from the *T. ludeni* biology were analyzed by the Student t-test, for the food preference and posture data the chi-square test was performed. For the fluorescence parameters, regression models were adjusted for the treatments as a function of *T. ludeni* infestation. To test the differences between Bt and isoline was using the model identity test. Cry1F and Cry1Ac proteins have no effect on the biology of *T. ludeni*. The photosynthetic parameters in Bt cotton plants were less influenced by *T. ludeni* infestation.

**Key words:** Cotton, Transgenic, Spider Mite



## 1. Introdução

A cultura do algodoeiro constitui uma das principais para o agronegócio do Brasil, sendo este o quinto maior produtor mundial, com área cultivada de mais de 911,7 mil hectares (CONAB, 2017). A produção nacional do algodão é, prioritariamente, destinada à indústria têxtil, sendo a principal preocupação da cotonicultura a qualidade da fibra, para atender às exigências das indústrias nacionais e clientes externos.

Diversas espécies de ácaros podem causar reduções significativas na qualidade da fibra e na colheita do algodão, e também afetar outros atributos como a viabilidade das sementes (WILSON, 1993). Dentre eles, o ácaro vermelho - *Tetranychus ludeni* zacher, 1913 (Acari: Tetranychidae), que se encontra amplamente distribuído pelos países produtores.

Os ácaros compreendem um grande número de artrópodes incluídos na subclasse Acari da classe Arachnida (MENEZES *et al.*, 2007). São especializados em alimentar do conteúdo citoplasmático das células, causando destruição dessas durante a alimentação (FADINI, *et al.*, 2012). Os ácaros fitófagos são potenciais pragas para algumas culturas, como o morangueiro, porém atuam como praga secundária em uma série de espécies vegetais, incluindo o algodoeiro. No entanto, tem-se registrado surtos populacionais em diversas regiões e culturas, devido à aplicação de inseticidas de amplo espectro, principalmente alguns piretróides e organofosforados, que causam significativo aumento na densidade populacional desses ácaros fitófagos (BARROS, *et al.*, 2007). Esses surtos causam danos às culturas, podendo ocorrer morte de plantas, levando a perda na produtividade. Ainda não se sabe a razão desse aumento populacional em presença de inseticidas, porém alguns autores já comprovaram aumento na oviposição de ácaros expostos à neonicotinoides e piretroides (CANAN, *et al.*, 2011) e morte de predadores.

Nesse contexto, o uso de plantas transgênicas que expressam proteínas inseticidas poderia afetar ou alterar a biologia e o desenvolvimento de organismos não alvos, como os ácaros. Essa é uma preocupação frequentemente associada ao uso de plantas Bt, sua possível influência negativa sobre organismos não alvos (BECKER, *et al.*, 2014).

O agente de controle biológico microbiano de insetos pragas mais usado em todo o mundo é o *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911, uma bactéria do solo (OLIVEIRA, 2007). É considerado um agente seguro para a maioria dos organismos não alvos, devido à especificidade do seu modo de ação, onde as protoxinas requerem um pH elevado para a solubilização, e as proteases específicas, para clivar as protoxinas em subunidades inseticidas tóxicas ativas no intestino dos insetos susceptíveis. Porém, as toxinas Bt produzidas dentro dos tecidos da planta geneticamente modificada apresentam propriedades inseticidas sem a

necessidade de pH apropriado e proteases específicas, e a única barreira dos organismos não alvo às toxinas é a falta dos receptores específicos no epitélio do intestino médio (STOTZKY, 2000).

O uso de plantas geneticamente modificadas é umas das táticas utilizadas no manejo integrado de pragas (MIP), possibilita a redução do número de aplicações de inseticidas químico-sintéticos e promove o controle mais efetivo de pragas (SHARMA; ORTIZ, 2000). Essa tática já está bem estabelecida em todo o mundo, com 180 milhões de hectares plantados com culturas transgênicas, uma vez que 60% do todo o algodão plantado é geneticamente modificado (JAMES, 2014).

Dentre as culturas transgênicas cultivadas no Brasil destaca-se o algodoeiro Bt, evento 281-24-236/3006-210-23, obtido por retrocruzamentos piramidados entre os eventos 281-24-236, contendo o gene *cryIF*, que codifica para a Protoxina Cry1F e o evento 3006-210-23 contendo o gene *cryIAC*, que codifica a Protoxina Cry1Ac. Além de resistência a insetos pela ação dos genes *cryIF* e *cryIAC*, o algodoeiro 281-24-236/3006-210-23 também apresenta resistência ao herbicida glufosinato de amônio devido a presença de duas cópias do gene *pat*, que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT). O gene *pat* é uma versão baseada no gene *pat* natural de *Streptomyces viridochromogenes* (Krainsky) Waksman & Henrici, 1914 (CTNBIO, 2016).

Há pouca informação na literatura sobre efeitos de transgênicos Bt em populações de ácaros. Uma ferramenta importante para o estudo do efeito de qualquer tecnologia sob a população de determinados organismos é avaliar o desenvolvimento e ciclo biológico. Além disso, injúrias causadas pelo ataque de artrópodes associados às culturas causam estresse fisiológico nas plantas. A análise da fluorescência da clorofila *a* é útil no entendimento dos mecanismos da fotossíntese e da avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos ou abióticos pelos quais as plantas estão sujeitas (BOWN; HALL; MACGREGOR, 2002). Esses fatores afetam o crescimento das plantas, podendo em organismos geneticamente modificados impedir a expressão do gene.

O estudo dos parâmetros de fluorescência tem sido muito usado, principalmente no entendimento da fotossíntese, por ser um método não destrutivo, que permite a análise qualitativa e quantitativa da absorção e aproveitamento da energia luminosa pelo fotossistema II e possíveis relações com a capacidade fotossintética (NETTO *et al.*, 2005). São eles a relação  $F_v/F_m$  que expressa o rendimento quântico dos processos fotoquímicos, ou seja, a eficiência relativa da captura de energia luminosa pelo FSII (PEREIRA, 2001), a fluorescência inicial, fluorescência máxima e taxa de transporte de elétrons.

A partir desses parâmetros é possível investigar se o estresse fisiológico causado pelo ataque de pragas em plantas transgênicas e convencionais é diferenciado. Permite ainda verificar se a inserção de genes pode alterar a expressão gênica total da planta, influenciando nas respostas fisiológicas aos fatores externos aos quais as plantas estão sujeitas (AGAPITO-TENFEN *et al.*, 2014).

De acordo com o exposto, esse estudo teve por objetivo avaliar a biologia do ácaro fitófago *T. ludeni* em algodoeiro geneticamente modificado, investigando se as proteínas Bt associadas a esse produto exercem algum efeito sobre esses organismos não alvos. Avaliar se há um comportamento de preferência alimentar e postura do ácaro vermelho em relação ao algodão Bt e sua isolinha. E verificar se o estresse fisiológico causado pelo ataque e *T. ludeni* é diferenciado em algodão Bt.

## 2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Laboratório de Entomologia Agrícola da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM. Os ácaros utilizados foram retirados da criação massal do laboratório e submetidos a dois tratamentos, o algodoeiro Bt 281-24-236/3006-210-23 e sua isolinha.

As sementes foram plantadas em casa de vegetação em vasos de polietileno de 5L, com solo adubado segundo as recomendações para vasos (MALAVOLTA, 1980), mantendo duas plantas por vaso, em um total de 30 repetições para cada tratamento, para obtenção de folhas.

### 2.1 Obtenção dos dados biológicos de *T. ludeni*

Foi avaliado o ciclo biológico, a viabilidade dos ovos e a sobrevivência dos estádios de desenvolvimento para *T. ludeni*. Foi usado um total de 40 repetições em delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram feitas em estufa tipo B.O.D. a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de 60% e fotofase de 12h.

Para a avaliação da biologia de *T. ludeni* foram observados o desenvolvimento e reprodução deste ácaro em discos de folhas de algodoeiro Bt e sua isolinha, durante uma geração. Para confecção dos discos foram usadas folhas medianas das plantas de algodão, com 35 a 60 dias de idade (ESTEVES FILHO, *et al.*, 2010).

Os discos tiveram diâmetro de cinco cm, e foram colocados sob esponja de polietileno umedecida até a saturação, com água destilada e mantidas em placas tipo gerbox

(ESTEVEZ FILHO, *et al.*, 2010). Para evitar a fuga dos ácaros, os discos foram circundados por pavio de algodão hidrófilo também umedecido.

Cada disco recebeu cinco fêmeas adultas de *T. ludeni*, que permaneceram nas arenas (folha circular do algodoeiro) por 16 horas, para oviposição. Em seguida, estas foram retiradas dos discos e os ovos quantificados, deixados apenas dois por arena (SILVA, 2005).

A viabilidade dos ovos foi calculada pela diferença entre o número de ovos deixados nas arenas e o número de ovos não eclodidos. Para o período de incubação e a fase de desenvolvimento, foram realizadas avaliações diárias.

Após a emergência, as fêmeas foram acasaladas com machos obtidos da criação, observando-se, diariamente, o número de ovos produzidos e a longevidade dos adultos.

## 2.2 Teste de preferência alimentar de *T. ludeni*

Para a avaliação da preferência alimentar e de postura foram utilizados discos foliares de cinco cm de diâmetro, obtidos da parte central de folhas de algodão Bt e isolinha. Os discos foram colocados lado a lado e conectados por uma lamínula plástica. Esse conjunto foi disposto sobre uma esponja saturada em água, no interior de placas plásticas (gerbox). Na porção mediana da lamínula foram liberadas seis fêmeas de *T. ludeni*, obtidas da criação estoque do laboratório. Após 24h foi avaliado o número de fêmeas e o número de ovos depositados em cada disco. Foram utilizados os tratamentos Bt vs Bt, Bt vs isolinha e isolinha vs isolinha com 10 repetições cada (ESTEVEZ FILHO, *et al.*, 2010).

## 2.3 Avaliação do estresse fisiológico do algodoeiro

Após a ocorrência de uma infestação natural de *T. ludeni* nas plantas de algodoeiro em casa de vegetação, foi realizada a avaliação do estresse fisiológico, utilizando fluorômetro (MINI-PAM-2014, Heinz-Walz). As pinças do aparelho foram colocadas no terço médio de folhas completamente expandidas, onde foram obtidas a fluorescência inicial, fluorescência máxima, razão entre a fluorescência variável e máxima e a taxa de transporte de elétrons. As medições foram feitas após 30 minutos de adaptação ao escuro (FERREIRA, *et al.*, 2015).

Foram determinadas notas para a severidade de infestação de *T. ludeni*, de acordo com o número de ácaros adultos presentes nas folhas a serem avaliadas. Nota 1 foi atribuída a folhas não infestadas (zero ácaros), nota 2 a folhas pouco infestadas ( $\leq 100$  ácaros), e nota 3 para folhas muito infestadas ( $> 100$  ácaros).

## 2.4 Análises estatísticas

Os dados biológicos foram analisados pelo Teste T Student. Para a preferência alimentar e postura foi realizado o teste qui-quadrado, ambos utilizando o programa computacional R por meio das funções `t.test` e `chisq.test`, respectivamente. As curvas de sobrevivência para as fases juvenil e adulta foram determinadas com o estimador de Kaplan-Meyer. Para análise dos dados da fluorescência da clorofila foi ajustado o modelo de regressão linear simples. Para verificar se as regressões ajustadas para o algodão Bt e para sua isolinha são iguais estatisticamente, utilizou-se o teste de identidade de modelos. Neste teste admitiu-se como hipótese nula a igualdade dos coeficientes de regressão (B0 e B1). Detalhes sobre esta metodologia estatística são apresentados por Cruz, Regazzi e Carneiro, (2014).

## 3. Resultados

### 3.1 Biologia de *T. ludeni*

Não foram observadas diferenças para a duração dos estágios de desenvolvimentos de larva, protoninfa, deutoninfa, longevidade dos adultos e a duração de ovo a adulto para *T. ludeni* criado em algodão Bt e isolinha (Tabela 1).

**Tabela 1:** Duração média, em dias, dos estágios de desenvolvimento de *Tetranychus ludeni* criados em discos de folhas de algodoeiro Bt e isolinha

Estágios	Bt	Isolinha	Estimativa t	p-valor
Larva	2,800 ± 0,140	2,775 ± 0,098	0,147	0,884
Protoninfa	2,000 ± 0,136	1,920 ± 0,162	0,378	0,707
Deutoninfa	3,000 ± 0,277	2,867 ± 0,256	0,353	0,727
Longevidade de Adulto	11,000 ± 3,246	9,714 ± 2,447	0,316	0,756
Ovo-Adulto	14,350 ± 3,525	13,500 ± 2,490	0,197	0,847

Médias não diferem pelo teste t entre os tipos de algodoeiro ( $p > 0,05$ ).

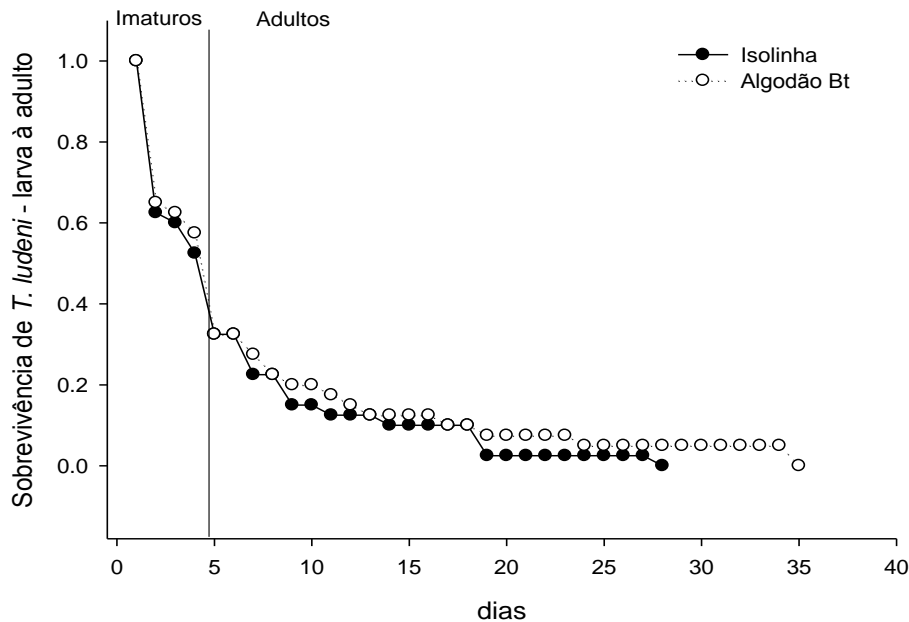
Não foram constatadas diferenças para as características avaliadas na fase adulta: número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, período de incubação, número de ovos por fêmea da primeira geração, período pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição para os dois tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos, período de incubação, número de ovos por fêmea da primeira geração, período pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição para *Tetranychus ludeni* criados em discos de folhas de algodoeiro Bt e isolinha

Característica	Bt	Isolinha	Estimativa t	p-valor
N. de ovos/♀	1,415 ± 0,112	1,225 ± 0,100	1,266	0,210
Viabilidade dos ovos	64,000 ± 5,491	60,000 ± 5,591	0,488	0,627
Período de incubação	4,486 ± 0,093	4,391 ± 0,083	0,763	0,448
N. de ovos/♀ 1ª G	24,857 ± 4,383	29,000 ± 1,080	-0,929	0,408
Pre-Oviposição	1,333 ± 0,333	1,500 ± 0,289	-0,378	0,715
Oviposição	14,167 ± 4,061	10,500 ± 2,327	0,783	0,458
Pos-oviposição	0,833 ± 0,307	1,000 ± 0,408	-0,326	0,755

Médias não diferem pelo teste t entre os tipos de algodoeiro ( $p > 0,05$ )

As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer apresentaram o mesmo comportamento para ambas as variedades estudadas (Figura 1). Constatou-se alta taxa de mortalidade na fase imatura, os indivíduos que passaram para fase adulta apresentaram menor taxa de mortalidade até completar o ciclo, caracterizando uma curva do tipo III (RICKLEFS, 2010). Os adultos criados sobre discos de algodoeiro Bt sobreviveram por seis dias a mais que a isolinha.



**Figura 1:** Curvas de sobrevivência, obtidas pelo estimador de Kaplan-Meyer, de indivíduos de *Tetranychus ludeni* criados sobre discos foliares de algodoeiro Bt e isolinha.

### 3.2 Preferência Alimentar

Nos testes de preferência alimentar e de postura também não houve diferença para os tratamentos Bt vs. Bt, Bt vs Isolinha e Isolinha vs. Isolinha (Tabela 3). Ou seja, não foi observado preferência alimentar e de postura por *T. ludeni* em relação ao algodão Bt e a isolinha.

**Tabela 3:** Resultado do teste Qui-quadrado para a preferência alimentar e de postura para *Tetranychus ludeni* submetidos a algodoeiro Bt e isolinha, com opção de escolha

Trat.	Preferência alimentar		Postura	
	X <sup>2</sup>	p-valor	X <sup>2</sup>	p-valor
Bt vs. Bt	0,154	0,695	0,600	0,438
Bt vs. Isolinha	1,000	0,317	0,053	0,818
Isolinha vs. Isolinha	0,571	0,449	3,769	0,052

Qui-quadrado não significativo ( $p > 0,05$ ).

### 3.3 Estresse Fisiológico

O teste de identidade de modelos não detectou diferenças entre o algodão Bt e sua isolinha em função da infestação de *T. ludeni* para a fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), relação fluorescência variável/fluorescência máxima ( $F_v/F_m$ ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (Tabela 4).

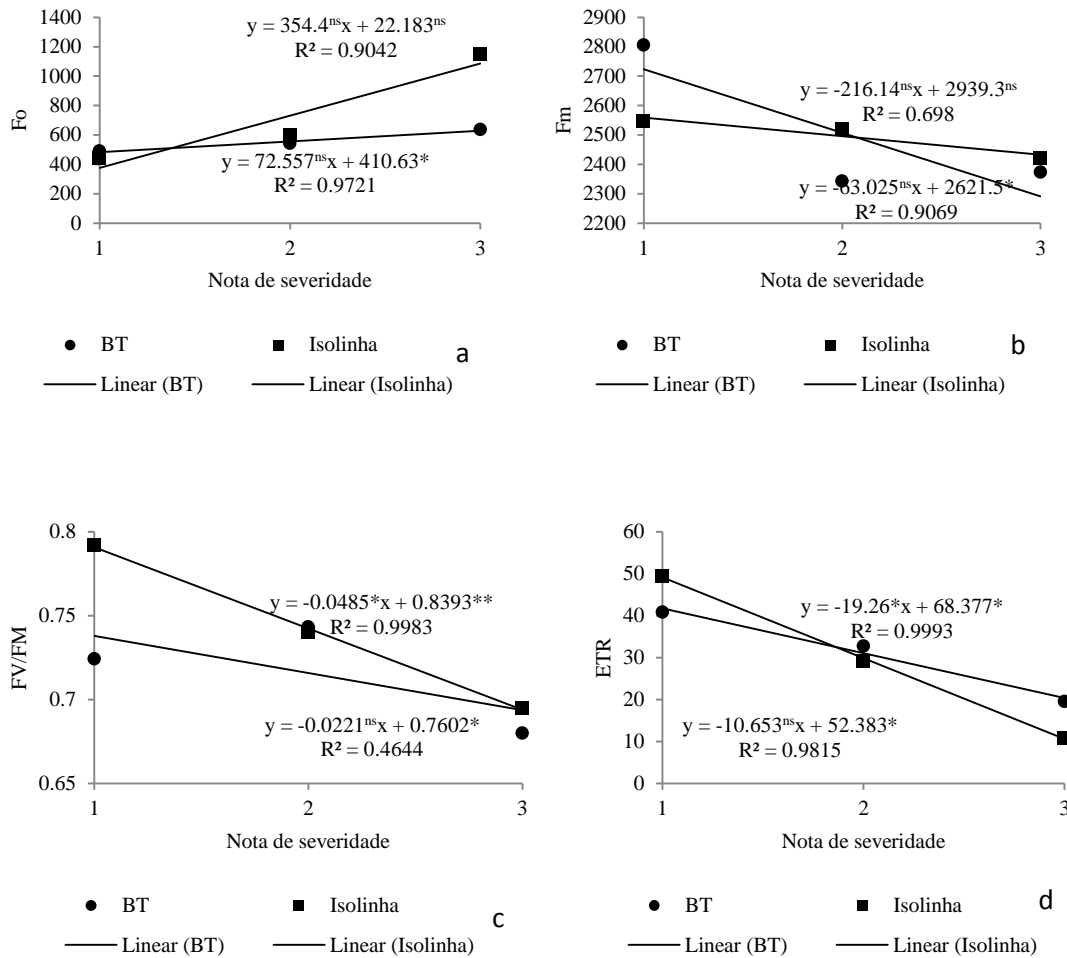
Na figura 2a encontram-se as curvas referentes a  $F_0$ , apresentado o comportamento de cada tratamento em relação a severidade da infestação. Não foi observada significância para  $B_0$ , indicando ausência de efeito na  $F_0$  em função do incremento da infestação de ácaros para os tratamentos avaliados. Porém, esta não significância pode ser consequência do baixo número de graus de liberdade do resíduo presente na análise. Embora não tenha sido verificada significância para o coeficiente angular da reta ( $B_0$ ), houve tendência de aumento para a  $F_0$  em função do aumento da severidade na isolinha.

Ao se avaliar as variáveis fluorescência máxima (Figura 2b), razão fluorescência variável e fluorescência máxima (Figura 2c) e taxa de transporte de elétrons (Figura 2.d) verificou-se comportamento similar, com tendência de redução nos valores com o incremento da infestação de *T. ludeni*. Tanto o algodão Bt como a isolinha apresentaram valores inferiores de  $F_v/F_m$ , na condição de alta severidade (Figura 2c). Destaca-se que houve efeito significativo ( $B_0$ ) da infestação de *T. ludeni* na relação  $F_v/F_m$  e no ETR para a isolinha (Figura 2c e 2d). Porém, o algodão Bt não foi afetado pela infestação ( $B_0$  não significativo), apresentando comportamento estável para todos os parâmetros fotossintéticos (Figura 2).

**Tabela 4.** Esquema da análise de variância relativa ao teste de identidade de modelos, considerando como hipótese nula a igualdade dos dois modelos de regressão ajustados para as variáveis fluorescência inicial, fluorescência máxima, relação entre fluorescência variável e máxima e taxa de transporte de elétrons em função do grau de infestação de *Tetranychus ludeni*

Fluorescência inicial (Fo)					
FV	GL	SQ	QM	F	p-Valor
Modelo (Completo)	4	2791302.180	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	2665805.180	-	-	-
Redução (Ho)	2	125497.010	62748.504	4.660	0.177
Resíduo	6	26928.780	13464.391	-	-
Fluorescência máxima (Fm)					
Modelo (Completo)	4	37638964.800	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	37615317.020	-	-	-
Redução (Ho)	2	23647.780	11823.892	0.573	0.636
Resíduo	6	41242.840	20621.422	-	-
Fluorescência variável / fluorescência máxima (Fv/ Fm)					
Modelo (Completo)	4	3.196	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	3.195	-	-	-
Redução (Ho)	2	0.002	0.001	1.532	0.395
Resíduo	6	0.001	0.001	-	-
Taxa de transporte de elétrons (ETR)					
Modelo (Completo)	4	6540.549184	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	6540.549	-	-	-
Redução (Ho)	2	76.318	38.159	15.794	0.060
Resíduo	6	4.832	2.416	-	-





**Figura 2.** Modelo de regressão para fluorescência inicial (Fo), Fluorescência máxima (Fm), razão entre fluorescência variável e máxima (Fv/Fm) e taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de algodoeiro Bt e isolinha em função das notas de severidade de infestação de *Tetranychus ludeni*: 1= zero, 2=  $\leq 100$ , 3=  $>100$  ácaros/folha.

#### 4. Discussão

As toxinas Cry1F e Cry1Ac produzidas pelo algodão Bt não afetaram a duração dos estágios de desenvolvimento de larva, protoninfa, deutoninfa, longevidade dos adultos e a duração de ovo a adulto. Resultados semelhantes foram encontrados para *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae), sem diferenças para os estágios imaturos, a longevidade dos adultos e o período ovo adulto para ácaros submetidos a tratamentos com algodão Bt expressando a proteína Cry1Ac (ESTEVES FILHO, *et al.*, 2010). Guo *et al.* (2016) obtiveram as mesmas conclusões em estudos com a toxina Cry1F, não encontrando impactos para a biologia de ácaros *T. urticae*. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem fortes evidências de que essa tecnologia, inclusive em híbridos piramidados, é segura para os organismos não alvos em questão.

As médias encontradas para as características avaliadas na fase adulta demonstram que não há efeito das toxinas Cry em *T. ludeni*. Resultados contrários foram verificados por Ma *et al.*, (2014), observando que alterações causadas no metabolismo secundário de plantas de algodão Bt foram responsáveis pela redução no tempo de geração e aumento do número de ovos de ácaros *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval, 1987 (Acari: Tetranychidae) e *Tetranychus truncatus* Ehara, 1956 (Acari: Tetranychidae).

O comportamento observado para as curvas de sobrevivência é esperado para ácaros, pois uma curva de sobrevivência do tipo III resulta de uma alta mortalidade no início da vida, devido à vulnerabilidade dos indivíduos jovens (RICKLEFS, 2010). A sobrevivência de organismos fitófagos está diretamente ligada à qualidade da planta hospedeira. As curvas de sobrevivência apresentam o mesmo comportamento para ácaros criados em plantas Bt e isolinha. Esteves Filho *et al.* (2010) avaliando a biologia e o comportamento de ácaros *T. uticae* obtiveram resultados semelhantes, constatando que não houve diferença para sobrevivência em plantas de algodão Bt e isolinha. Porém, os adultos criados sobre discos foliares de algodoeiro Bt sobreviveram por mais tempo do que nos da isolinha, embora sem diferenças estatísticas na longevidade média de *T. ludeni* nos diferentes tratamentos. A sobrevivência por um tempo prolongado de alguns indivíduos no tratamento Bt, pode estar relacionada a alterações no metabolismo secundário provocado pela adição de genes. Visto que a inserção de genes Bt em plantas de algodoeiro pode promover mudanças em compostos secundários associados com a interação planta-herbívoros (YAN, *et al.* 2004).

Estudos sobre os efeitos das proteínas Cry expressas por plantas transgênicas sobre populações de ácaros fitófagos ainda são incipientes, mas demonstraram que esses organismos geralmente não são afetados, apesar da grande exposição via aquisição e acúmulo da toxina em seu corpo e do fato da toxina se manter ativa após a ingestão (OBRIST, *et al.*, 2006).

*Tetranychus ludeni* não apresentou preferência alimentar e de postura em relação ao algodoeiro Bt e isolinha. De acordo com Rovenská *et al.* (2005) ácaros *T. uticae* preferiram plantas transgênicas para alimentação e postura em relação a plantas convencionais. Já Li *et al.* (2014) afirma que ácaros *Tetranychus turkestanii* Tetrk, 1937 (Acari: Tetranychidae) preferiram se alimentar e colocar ovos em plantas convencionais do que em transgênicos. Poucos estudos e a complexidade de adequação dos ensaios podem ser as razões das variações nos resultados e dificuldade das comparações. Mas deve-se considerar que o comportamento dos ácaros pode ser influenciado pelas características constitutivas das plantas, que incluem seus aleloquímicos e as toxinas expressas.

Dessa maneira os resultados expostos nesse estudo fornecem indícios de que as tecnologias Bt contendo os genes *cryIF* e *cryIAC* não afetam populações de *T. ludeni*. Uma das grandes vantagens do uso de organismos geneticamente modificados - OGMs é a redução na utilização de inseticidas, o que permite a utilização dessa tática juntamente com o controle biológico no MIP. Assim, populações de ácaros fitófagos que se desenvolvem em algodoeiro Bt poderiam ser controladas e mantidas abaixo do nível de dano econômico por seus inimigos naturais, a exemplo do ácaro predador *Phytoseiulus macropilis* Banks, 1904 (Acari: Phytoseiidae) já associado à *T. ludeni* (Castro *et al.*, 2014) e à cultura do algodoeiro (Esteves Filho *et al.* 2010) na literatura.

Na avaliação do estresse fisiológico maiores valores da  $F_o$  podem indicar danos estruturais nos centros de reação do Fotossistema II ou comprometimento no transporte de energia de excitação dos complexos antena para os centros de reação (CRUZ, *et al.*, 2009). Os pigmentos acessórios como as clorofilas *a*, *b* fazem parte do complexo antena e tem como função principal absorver os fótons e transferir a energia para o complexo do centro de reação (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989). Dessa forma, pode ter ocorrido dano no aparato fotossintético nas plantas de algodão do tratamento isolinha, em consequência da infestação de *T. ludeni*. Isso porque a alimentação dos ácaros danifica diretamente o aparato fotossintético das células (ALDEA *et al.*, 2005).

O rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) é determinante para a identificação de um estresse biótico (Kalaji; Guo, 2008). E pode variar de 0,75 a 0,85 em plantas não submetidas a estresses (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989). Valores inferiores aos citados acima indicam estresse e redução da eficiência quântica máxima do fotossistema II e, por consequência, do potencial fotossintético da planta (FERREIRA, *et al.*, 2015), o que foi observado para as plantas de algodão Bt e isolinha.

Huang *et al.* (2013) afirmam que sob baixa infestação de sugadores as reações fotoquímicas e a ETR não são muito afetadas, entretanto, quando se tem alta infestação e um longo período de interação entre herbívoro-planta, os parâmetros de fluorescência são influenciados negativamente, o que ocorreu com a  $F_m$ ,  $F_v/F_m$  e ETR. Porém foi observado comportamento mais estável para as plantas Bt, que foram menos afetadas pela severidade da infestação. Isso pode ser uma vantagem para o uso de plantas Bt. Visto que os ácaros se alimentam do conteúdo citoplasmático celular, danificando diretamente o aparato fotossintético da célula e indiretamente as trocas gasosas, por interromper o transporte de nutrientes e água (ALDEA *et al.*, 2005). Este ataque acarreta redução na taxa fotossintética e

menor crescimento foliar da planta (Velikova *et al.*, 2010), clorose e perda prematura das folhas, com conseqüente decréscimo da produtividade (Li *et al.*, 2013). O uso de OGMs vem ganhando cada vez mais espaço na agricultura, principalmente em um país como o Brasil, que devido à extensa área territorial e clima propício apresenta potencial para aumentar a eficiência de produção.

## **5. Conclusões**

As proteínas Cry1F e Cry1Ac presentes de forma constitutiva no algodão Bt não exercem efeitos nos parâmetros biológicos de ácaros *T. ludeni*.

Os parâmetros fotossintéticos em plantas de algodão Bt foram menos influenciados pela infestação de *T. ludeni*. A isolinha apresentou maior estresse fisiológico em alta severidade de infestação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPITO-TENFEN, S. Z. *et al.* Effect of stacking insecticidal cry and herbicide tolerance epsps transgenes on transgenic maize proteome. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 346, 2014.
- ALDEA, M. *et al.* Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean. **Plant, Cell & Environment**, v. 28. n.3, P. 402-411, 2005.
- BARROS, R. *et al.* Desequilíbrio biológico do ácaro-rajado *tetranychus urticae* koch, 1836 (acari: tetranychidae) após Aplicações de inseticidas em algodoeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.2, p.171-174, 2007.
- BECKER, R. *et al.* Impact of multi-resistant transgenic Bt maize on straw decomposition and the involved microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 9-18, 2014.
- BOLHÀR-NORDENKAMPH, H. R. *et al.* Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field. **Functional Ecology**, v. 3, n. 4, p. 497-514, 1989.
- BOWN, A. W.; HALL, D. E.; MACGREGOR, K. B. Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. **Plant Physiology**, v. 129, n.4, p. 1430-1434, 2002.
- CANAN, V.L., *et al.* **Efeito sistêmico de inseticidas sobre a oviposição do ácaro-vermelho *Tetranychus desertorum* em soja**. Londrina, PA. Embrapa Soja, 2011.
- CASTRO, B.M.C. *et al.* The predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) occurring on sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants in Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 685-686, 2014.
- CTNBIO - COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Liberações Comerciais**. Parecer técnico nº 1757-2009, p. 1-33, 2014.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento, fevereiro 2017, v.4, 2017.
- CRUZ, C. D. ; REGAZZI, A. J. ; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**, Editora UFV, Viçosa, MG. 2014. 2 v.
- CRUZ, M.C.M., *et al.* Fluorescência da clorofila a em folhas de tangerineira ‘Ponkan’ e limeira ácida ‘Tahiti’ submetidas ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 896-901, 2009.
- ESTEVES FILHO, A.B. *et al.* Biologia Comparada e Comportamento de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) em Algodoeiro Bollgard<sup>TM</sup> e Isolinha não-Transgênica. **Neotropical Entomology**, v.39, n.3, p.338-344, 2010.

- FADINI, M.A.M. *et al.*, Ocorrência do ácaro fitófago *Catarhinus tricholaenae* Keifer (Acari: *Diptilomiopidae*) em cultivares de milho Bt. **Ciência Rural**, v.42, n.9, p.1524-1527, 2012.
- FERREIRA, E.A. *et al.*, Respostas fisiológicas da mandioca à aplicação de herbicidas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 645-656, 2015.
- GUO, Y. Y. *et al.* The interaction of two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch, with Cry protein production and predation by *Amblyseius andersoni* (Chant) in Cry1Ac/Cry2Ab cotton and Cry1F maize. **Transgenic Research**, v. 25, n.1, p. 33-44, 2016.
- HUANG, J. *et al.* Chlorophyll content and chlorophyll fluorescence in tomato leaves infested with an invasive Mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). **Environmental Entomology**, v.42, n. 5, p. 973-979, 2013.
- JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014**. [S.l.]. ISAAA Brief, 2014.
- KALAJI, M.H.; GUO, P. **Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs**. [S.l.]. Photochemistry research progress, 2008.
- LI, G.D. *et al.* Effects of Bt plus CpTI transgenic cotton on the performance of *Tetranychus turkestanii* (Acari: Tetranychidae). **Systematic and Applied Acarology**, v. 19, n. 2, p. 236-247, 2014.
- LI, Q. *et al.* Dynamic changes in photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Nicotiana tabacum* infested by *Bemisia tabaci* (Middle East–Asia Minor 1) nymphs. **Arthropod-Plant Interactions**, v.7, n. 4, p. 431-443, 2013.
- MA, H. *et al.* Comparative incidence of cotton spider mites on transgenic Bt versus conventional cotton in relation to contents of secondary metabolites. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2014.
- MALAVOLTA, Eurípedes. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980.
- MENEZES, E. L. A. *et al.* **Ácaros: taxonomia, bioecologia e sua importância agrícola**. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. Documentos, p.1-28, 2007.
- NETTO, A.T. *et al.* Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v.104, n.2, p.199-209, 2005.
- OBRIST L, B. *et al.* Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. **BioControl**, v. 51, n. 1, p. 31-48, 2006.
- PEREIRA, W. E. **Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, crescimento e composição mineral de quatro porta-enxertos de citros submetidos a estresse por Alumínio, em Cultivo Hidropônico**. Viçosa, MG 2001. 123 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 6.ed.Guanabara Koogan, 2010.

ROVENSKÁ, G. Z. *et al.* Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bb-eggplants. **Biological Control**, v. 33, n. 3, p. 293-300, 2005.

SHARMA, H.C.; ORTIZ, R. Transgenics, pest management, and the environment. **Current Science**, v. 79, n. 4, p.521-437, 2000.

SILVA, F.R. *et al.* Exigências Térmicas e Tabela de Vida de Fertilidade de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.2, p. 291-296, 2005.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. **Journal of Environmental Quality**. v. 29 n. 3, p. 691-705, 2000.

VELIKOVA, V. F. *et al.* Influence of feeding and oviposition by phytophagous pentatomids on photosynthesis of herbaceous plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 6, p. 629-41, 2010.

WILSON, L. J. Spider mites (Acari: Tetranychidae) affect yield and fiber quality of cotton. **Jornal of Economic Entomology**, v.86, n. 2, p. 566-585, 1993.

YAN, F. *et al.* Antennal response of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) to volatiles in transgenic Bt cotton. **Journal of Applied Entomology**, v.128, n.5, p. 354-357, 2004.

## ARTIGO CIENTÍFICO II

### DESENVOLVIMENTO DE *Aphis gossypii* GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE) E ESTRESSE FISIOLÓGICO EM ALGODOEIRO GENETICAMENTE MODIFICADO EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS CRY1F E CRY1AC

RESUMO - O algodoeiro é uma das principais plantas domesticadas pelo homem e uma das mais antigas. A cotonicultura tem-se destacado na agricultura brasileira por sua importância econômica e social. Destaque é dado à utilização do algodão transgênico no Brasil, com resistência a insetos, principalmente para Lepidoptera. Porém são várias as pragas associadas à cultura. Uma das mais importantes é o pulgão-do-algodoeiro, *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera, Aphididae) devido aos danos diretos, causados pela sucção do floema, e indiretos pela transmissão de viroses, podendo haver redução na produtividade. A injúria causada pelo ataque de insetos causa estresse fisiológico nas plantas, que pode acarretar respostas nas características agronômicas. As informações sobre as interações entre plantas Bt e organismos não alvos, e os impactos causados pelo ataque de *A. gossypii* em planta Bt, ainda são escassas. Com isso, este estudo teve por objetivo avaliar a infestação de *A. gossypii* em algodão Bt e sua isolinha, e investigar o estresse fisiológico causado pelo ataque. A infestação de *A. gossypii* foi avaliada pela contagem direta do número de pulgões nas plantas de algodoeiro, que foram plantadas em vasos e mantidas em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, com 30 repetições. As análises dos parâmetros da fluorescência da clorofila foram realizadas por meio de fluorômetro. Para a análise dos dados foram ajustados modelos de regressão para o algodoeiro Bt e a isolinha em função da infestação de *A. gossypii*. Para testar a diferença entre os tratamentos foi usado o teste de identidade de modelos. Conclui-se que o algodão Bt foi menos atacado por *A. gossypii*. E que as plantas de algodão Bt e isolinha apresentam as mesmas respostas fisiológicas quando atacadas por *A. gossypii*.

**Palavras-chave:** Algodão, Transgenia, Pulgão



**DEVELOPMENT OF *Aphis gossypii* GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE)  
AND PHYSIOLOGICAL STRENGTH IN GENETICALLY MODIFIED COTTON  
EXPRESSING PROTEINS CRY1F AND CRY1AC**

**ABSTRACT** - Cotton is one of the main plants domesticated by man and one of the oldest. Cotton farming has been prominent in Brazilian agriculture because of its economic and social importance. The use of transgenic cotton in Brazil, with resistance to insects, mainly Lepidoptera, is highlighted. However, there are several plagues associated with culture. One of the most important is the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera, Aphididae) due to direct damage, caused by phloem suction, and indirect by the transmission of virus, and a reduction in productivity. The insult caused by insect attack causes physiological stress in the plants, which can lead to responses in the agronomic characteristics. Information on the interactions between Bt plants and non-target organisms, and the impacts caused by the attack of *A. gossypii* on a Bt plant, are still scarce. The objective of this study was to evaluate the infestation of *A. gossypii* in Bt cotton and its isoline, and to investigate the physiological stress caused by the attack. The *A. gossypii* infestation was evaluated by direct counting of the number of aphids in the cotton plants, which were planted in pots and kept in greenhouse, in a completely randomized design with 30 replicates. Analyzes of chlorophyll fluorescence parameters were performed using a fluorometer. For the analysis of the data, regression models were adjusted for Bt cotton and isoline as a function of *A. gossypii* infestation. To test the difference between treatments, the model identity test was used. It is concluded that Bt cotton was less attacked by *A. gossypii*. And that Bt and isoline cotton plants have the same physiological responses when attacked by *A. gossypii*.

**Key Words:** Cotton, Transgene, Aphid

## 1. Introdução

O algodoeiro (*Gossypium* sp.) é uma das principais plantas domesticadas pelo homem e uma das mais antigas. Os primeiros registros de seu uso datam de mais de 4.000 anos no sul da península Arábica (BELTRÃO, AZEVEDO, 2008). A cotonicultura tem-se destacado na agricultura brasileira por sua importância econômica e social, demandando mão de obra rural e gerando renda aos diversos agentes envolvidos no processo (BUENO; ROMERO, 2006). Destaque é dado à utilização do algodão transgênico no Brasil, sendo que em 2014 o país registrou uma área de 42,2 milhões de hectares de culturas transgênicas, incluindo o algodoeiro, a soja e o milho (JAMES, 2014).

A transformação genética de plantas tem sido conduzida empregando diversos genes que objetivam conferir resistência a pragas e tolerância a herbicidas, formando um pacote tecnológico. Neste contexto, a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 é o organismo mais utilizado como fonte de genes para a transformação de plantas, visando principalmente à resistência a Lepidoptera e Coleoptera (PERLAK *et al.*, 2001).

O modo de ação dos transgênicos já é bem conhecido, as toxinas expressas são específicas para as pragas alvo, ou seja, o transgênico mata a praga por antibiose. Havendo a necessidade de um receptor específico no intestino médio do inseto, para que ocorra a ligação da toxina Bt, esse é o fator chave para a atividade inseticida das toxinas Cry (Li *et al.*, 2014).

O Algodoeiro Bt 281-24-236/3006-210-23 foi liberado no Brasil no ano de 2009. Contém os genes *cryIF*, *cryIAC* e *pat*, e por isto, apresenta resistência à insetos da ordem Lepidoptera e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (CTNBIO, 2016). Como visto as toxinas expressas por esse evento são para um alvo específico, mas dependendo da região e do clima uma alta diversidade de insetos praga pode atacar essa cultura. Dentre as principais pragas destaca-se o pulgão do algodoeiro, *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae), que apresenta ampla distribuição mundial e encontra-se associado a culturas de grande importância econômica. Sua importância é devido aos danos diretos, causados pela sucção do floema, e indiretos pela transmissão de viroses, podendo haver redução na produtividade (FONTES *et al.*, 2006).

A injúria causada pelo ataque de insetos causa estresse fisiológico nas plantas, que podem acarretar respostas nas características agrônomicas. A análise da fluorescência da clorofila *a* permite maior entendimento dos mecanismos da fotossíntese e da avaliação da capacidade fotossintética alterada por estresses bióticos ou abióticos pelos quais as plantas estão sujeitas, como o ataque de insetos (BOWN; HALL; MACGREGOR, 2002).

Esses fatores ambientais afetam o crescimento das plantas e os seus efeitos têm sido pesquisados usando medições da eficiência máxima do fotossistema II (FSII) estimada pela razão entre a fluorescência variável e a máxima ( $F_v/F_m$ ) (HAVAUX *et al.*, 1988). A relação  $F_v/F_m$  expressa o rendimento quântico dos processos fotoquímicos, ou seja, a eficiência relativa da captura de energia luminosa pelo FSII (PEREIRA, 2001). Outros parâmetros como a fluorescência inicial, fluorescência máxima e taxa de transporte de elétrons fornecem informações importantes.

O estudo dos parâmetros de fluorescência tem sido muito utilizado, principalmente no entendimento da fotossíntese, por ser um método não destrutivo, que permite a análise qualitativa e quantitativa da absorção e aproveitamento da energia luminosa pelo fotossistema II e possíveis relações com a capacidade fotossintética (NETTO *et al.*, 2005).

Os parâmetros podem ser usados para investigar se o estresse fisiológico causado pelo ataque de pragas em plantas transgênicas e convencionais é diferenciado. Podendo a inserção de genes alterar a expressão gênica total da planta, influenciando nas respostas fisiológicas aos fatores externos a qual as plantas estão sujeitas (AGAPITO-TENFEN *et al.*, 2014).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a infestação de *A. gossypii* em algodão Bt e sua isolinha, e investigar o estresse fisiológico causado pelo ataque dessa praga.

## 2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Setor de Agronomia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM.

O algodoeiro Bt (281-24-236/3006-210-23) e sua isolinha foram plantados em vasos de polietileno de 5L, com solo adubado segundo as recomendações para vasos (MALAVOLTA, 1980), mantendo duas plantas por vaso, em um total de 30 repetições e delineamento inteiramente casualizado. No decorrer do experimento foram feitas três casualizações nos vasos para dispensar uso de bordadura.

### 2.1 Avaliações da infestação de *A. gossypii*

As infestações naturais de *A. gossypii* ocorreram aos 20 dias (estádio  $V_1$ ) após o plantio, foram realizadas cinco avaliações, cada uma com intervalo de dois dias. A avaliação

consistiu na contagem do número de pulgões por planta, considerando todo o dossel, e em todas as parcelas.

## 2.1 Avaliações do estresse fisiológico do algodoeiro

Aos 65 dias (estádio B<sub>3</sub>) após o plantio ocorreu nova infestação natural de *A. gossypii*, onde foram realizadas as medidas da fluorescência da clorofila *a*, por meio de um fluorômetro (MINI-PAM-2014, Heinz-Walz). As medições foram realizadas com 30 minutos de adaptação ao escuro, onde foi medido a fluorescência inicial (F<sub>0</sub>), fluorescência máxima (F<sub>m</sub>), a razão entre a fluorescência variável e fluorescência máxima (F<sub>v</sub>/ F<sub>m</sub>) e a taxa de transporte de elétrons (ETR). Sendo que as pinças do aparelho foram colocadas no terço médio de folhas completamente expandidas.

Foram determinadas notas para a severidade de infestação de *A. gossypii*, de acordo com o número de pulgões presentes nas folhas a serem avaliadas. A nota 1 foi atribuída a folhas não infestadas (zero pulgões), a nota 2 a folhas com menor infestação ( $\leq 100$  pulgões) e a nota 3 para folhas muito infestadas ( $> 100$  pulgões).

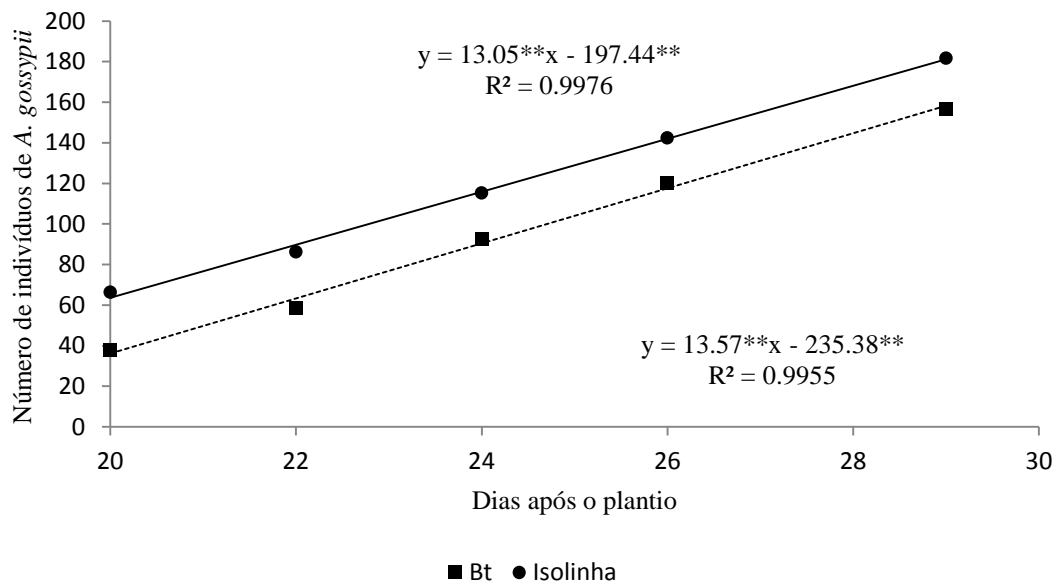
## 2.2 Análises estatísticas

Para análise dos dados foi ajustado o modelo de regressão linear simples. Para verificar se as regressões ajustadas para o algodão Bt e para sua isolinha são iguais estatisticamente, utilizou-se o teste de identidade de modelos. Neste teste admitiu-se como hipótese nula a igualdade dos coeficientes de regressão (B<sub>0</sub> e B<sub>1</sub>). Detalhes sobre esta metodologia estatística são apresentados por Cruz, Regazzi e Carneiro (2014).

# 3. Resultados

## 3.1 Infestação de *A. gossypii*

Houve efeito significativo do número de dias após o plantio em relação ao aumento da infestação de *A. gossypii*, tanto para o algodoeiro Bt como para a isolinha, o que pode ser verificado pela significância dos coeficientes angulares das retas (B<sub>0</sub>) (Figura 1). A taxa de infestação nos dois tratamentos foi similar, indicado pela proximidade dos coeficientes angulares de regressão (aproximadamente 13,0), levando à mesma inclinação das retas. Porém, pelo teste de identidade de modelos, verificou-se que as duas regressões foram diferentes (Tabela 1). Isso se deve à maior infestação na isolinha, que chegou a ter em média  $182 \pm 20$  pulgões aos 29 dias após o plantio, enquanto o algodoeiro Bt apresentou aproximadamente  $157 \pm 16$  pulgões no mesmo período.



**Figura 1:** Regressões ajustadas para o número de pulgões - *Aphis gossypii* em plantas de algodoeiro Bt e isolinha em função dos dias após o plantio

**Tabela 1:** Esquema da análise de variância relativa ao teste de identidade de modelos, considerando como hipótese nula a igualdade dos dois modelos de regressão ajustados para o número de pulgões em função do número de dias após o plantio

FV	GL	SQ	QM	F	p-Valor
Parâmetro (Completo)	4	3.923.169,00	-	-	-
Parâmetro (Reduzido)	2	3.874.975,00	-	-	-
Redução (Ho)	2	48.194,38	24.097,19	4,32	0,014
Resíduo	296	1.648	5.568,77	-	-

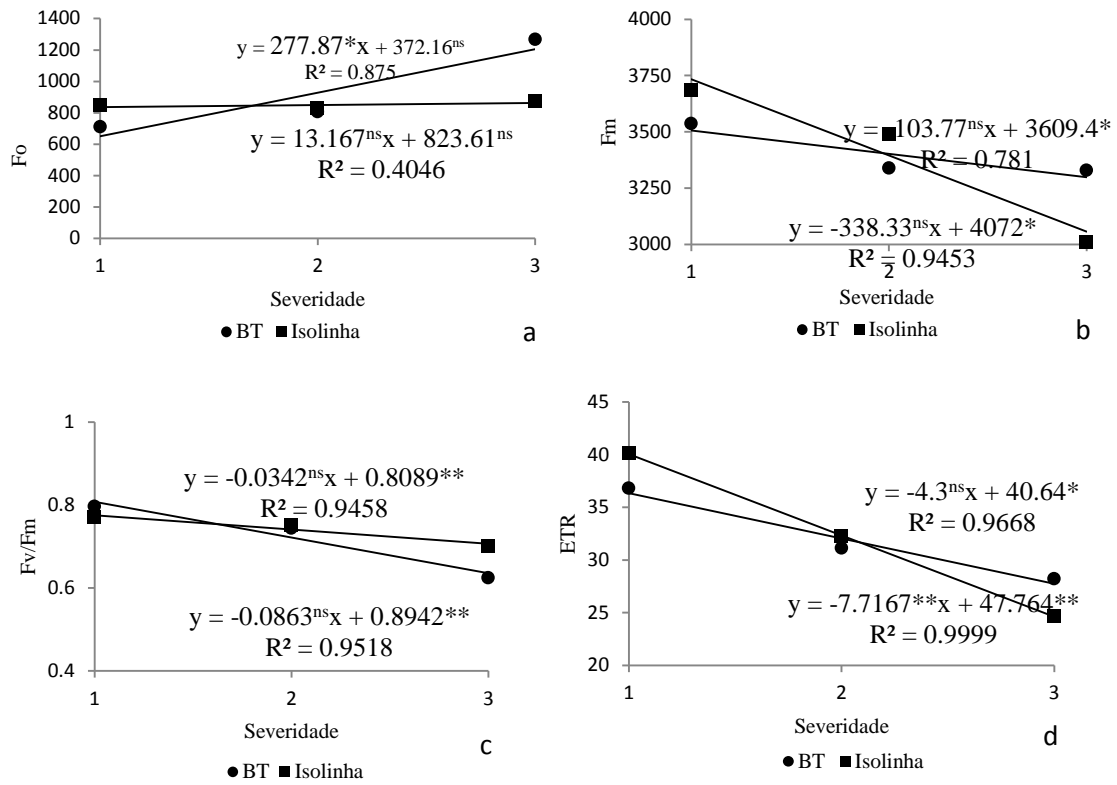
### 3.2 Estresse fisiológico

O teste de identidade de modelos não detectou diferenças entre o algodoeiro Bt e sua isolinha em função da infestação de *A. gossypii* para a fluorescência inicial ( $F_o$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), relação fluorescência variável/fluorescência máxima ( $F_v/F_m$ ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (Tabela 2). Isto indica que não há comportamento diferente para os parâmetros fotossintéticos entre o algodão Bt e sua isolinha em função do grau de infestação do afídeo.

Na figura 2a foi observado efeito significativo (B0) da infestação na Fo para o algodão Bt. Ao avaliar a Fm (Figura 2b), Fv/fm (Figura 2c) e ETR (Figura 2d) verificou-se tendência de redução em suas estimativas em função do aumento da infestação. Destaca-se que para a isolinha, o ETR foi significativamente afetado (B0) pelo nível de infestação de *A. gossypii*.

**Tabela 2:** Esquema da análise de variância relativa ao teste de identidade de modelos, considerando como hipótese nula a igualdade dos dois modelos de regressão ajustados para as variáveis fluorescência inicial, fluorescência máxima, relação entre fluorescência variável e máxima e taxa de transporte de elétrons em função do grau de infestação de *Aphis gossypii*

Fluorescência inicial (Fo)					
FV	GL	SQ	QM	F	p-Valor
Modelo (Completo)	4	4904916.540	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	4825737.440	-	-	-
Redução (Ho)	2	79179.090	39589.54731	3.51	0.221
Resíduo	6	22576.790	11288.39407	-	-
Fluorescência máxima (Fm)					
Modelo (Completo)	4	69552410.250	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	69497324.590	-	-	-
Redução (Ho)	2	55085.660	27542.82836	2.86	0.259
Resíduo	6	19276.130	9638.06713	-	-
Fluorescência variável / fluorescência máxima (Fv/ Fm)					
Modelo (Completo)	4	3.224	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	3.221	-	-	-
Redução (Ho)	2	0.003	0.001631431	3.66850236	0.214
Resíduo	6	0.001	0.000444713	-	-
Taxa de transporte de elétrons (ETR)					
Modelo (Completo)	4	6371.553	-	-	-
Modelo (Reduzido)	2	6359.753	-	-	-
Redução (Ho)	2	11.800	5.900	9.174	0.098
Resíduo	6	1.286	0.643	-	-



**Figura 2:** Modelo de regressão para fluorescência inicial (Fo), Fluorescência máxima (Fm), razão entre fluorescência variável e máxima (Fv/Fm) e taxa de transporte de elétrons em plantas de algodoeiro Bt e isolinha em função da severidade de infestação de *Aphis gossypii*: 1= zero, 2 =  $\leq 100$ , 3 =  $>100$  pulgões/folha.

#### 4. Discussão

Diferentes estudos têm avaliado o efeito de algodoeiro Bt sobre populações de pulgões e apresentam resultados contrastantes. Trabalho realizado por Wu e Guo (2003), em condições de campo, mostra resultados similares aos obtidos nesse, ou seja, menor infestação de pulgões em plantas Bt, porém isso foi associado ao aumento de inimigos naturais, que é devido à redução da aplicação de inseticidas. Essa pode ser considerada uma das grandes vantagens do uso de plantas geneticamente modificadas. Já Rodrigues, *et al.*, (2010) avaliando a dinâmica populacional do pulgão do algodoeiro afirmam que ocorreu maior infestação em plantas Bt, justificada pelo autor devido à redução da competição interespecífica entre as diversas populações que compõe a comunidade de artrópodes da cultura, visto que as plantas não serão atacadas pelas lagartas.

Segundo Sujii *et al.* (2008) o algodoeiro Bt, que expressa a proteína Cry1Ac, não apresenta ação deletéria ou favorece positivamente os fatores biológicos e a formação de colônias do pulgão *A. gossypii*, em condições de casa de vegetação. São várias as vertentes a serem discutidas, porém, os resultados obtidos indicam a necessidade de pesquisas mais complexas, pois o algodoeiro Bt, que expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ac foi significativamente menos infestado pelo pulgão.

A expressão de determinados genes em plantas de algodoeiro Bt, quando estão sobre estresse, pode aumentar sua sensibilidade aos fatores bióticos e abióticos (Li, *et al.*, 2014) e causar diferentes respostas fisiológicas das plantas como o aumento da fluorescência inicial (CRUZ, *et al.*, 2009). Conclusões semelhantes foram encontradas por Agapito-Tenfen (2014), afirmando que o estaqueamento e a piramidação de genes pode levar a alterações na expressão gênica total da planta, contribuindo para a magnitude do estresse. Maiores valores da fluorescência inicial podem indicar danos estruturais nos centros de reação do Fotossistema II ou comprometimento no transporte de energia de excitação dos complexos antena para os centros de reação. Os pigmentos acessórios clorofilas *a* e *b* fazem parte do complexo antena e têm como função principal absorver os fótons e transferir a energia para o complexo do centro de reação (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989).

O decréscimo de parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a* ( $F_m$ ,  $F_v/F_m$  e ETR) pode indicar dano na eficiência do aparato fotossintético. Neste caso, sob interferência ou danos no transporte de elétrons, a produção de ATP e NADPH é afetada e a continuidade do processo fotossintético é comprometida (CHAVES, 2015).

O rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) pode variar de 0,75 a 0,85 em plantas não submetidas a estresses (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989). Valores



inferiores aos citados acima foram encontrados sob alta infestação, para os tratamentos Bt e isolinha, e indicam estresse e redução da eficiência quântica máxima do fotossistema II e, por consequência, do potencial fotossintético da planta (FERREIRA, *et al.*, 2015).

A ETR proporciona informações valiosas sobre a eficiência quântica da fotoquímica e dissipação de calor. Isto é importante para a fotossíntese das plantas e, em última análise, a produtividade, porque a fotoquímica é utilizada para fornecer energia e reduzir o poder de assimilação de CO<sub>2</sub> (MURCHIE; LAWSON, 2013). A isolinha apresentou redução significativa na ETR. Já para Macedo *et al.* (2003), as injúrias causadas pelo pulgão da soja *Aphis glycines* Matsumura, 1917 (Hemiptera: Aphididae) não proporcionaram efeito significativo nos valores de ETR.

A inserção de novas construções no genoma de um organismo presume a melhora de propriedades úteis ao ser humano, e consequente redução nos custos de produção. No entanto, juntamente com as novas características, o organismo adquire um conjunto de novas qualidades, incluindo instabilidade e efeitos regulatórios sobre os genes vizinhos (COSTA, *et al.*, 2011). Mudanças das interações ecológicas no agroecossistema ou efeitos pleiotrópicos, quando um único gene controla diversas características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas, causados pela transgenia dão ênfase às relações do algodoeiro Bt e o pulgão *A. gossypii*, representando um fator de biossegurança a ser analisado (SUJII *et al.*, 2008). Com isso, mais estudos são necessários, para se afirmar que a menor infestação encontrada em algodoeiro Bt seria uma vantagem em campo, pois este evento além de controlar as pragas alvos, também influencia outros insetos praga da espécie. As vias pelas quais o pulgão *A. gossypii* estaria sendo controlado pelo algodoeiro Bt também precisam ser identificadas.

## 5. Conclusões

O Algodão Bt foi menos atacado pelo pulgão do algodoeiro *A. gossypii*. Mais estudos são necessários para investigar os motivos e os impactos desses resultados.

Plantas de algodão Bt e isolinha apresentaram as mesmas respostas para os parâmetros fotossintéticos quando atacadas por *A. gossypii*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPITO-TENFEN, Sarah Zanon et al. Effect of stacking insecticidal cry and herbicide tolerance epsps transgenes on transgenic maize proteome. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 346, 2014.
- BELTRÃO, N.E.M.; AZEVEDO, D.M. P. **O agronegócio de algodão no Brasil**. Embrapa Algodão, 2008.
- BOLHÀR-NORDENKAMPH, H. R. *et al.* Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field. **Functional Ecology**, v. 3, n. 4, p. 497-514, 1989.
- BOWN, A. W.; HALL, D. E.; MACGREGOR, K. B. Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. **Plant Physiology**, v. 129, n.4, p. 1430-1434, 2002.
- BUENO, O. C.; ROMERO, M.G.C. Participation of the fossil energy in cotton agroecosystem in family agricultural explorations. **Proceedings of the 6. Encontro de Energia no Meio Rural**, 2006.
- CHAVES, V.V. **Trocas gasosas e fluorescência da clorofila “a” em genótipos de cana-de-açúcar infestados por cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata***. Viçosa – Dissertação de Mestrado, UFV, 33.p, 2015.
- CTNBIO - COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Liberações Comerciais**. Parecer técnico nº 1757-2009, p. 1-33, 2014.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento, fevereiro 2017, v.4, 2017.
- COSTA, T. E. M. M. Avaliação de risco dos organismos geneticamente modificados. **Ciência & Saúde Coletiva**, p.227-336, 2011.
- CRUZ, C. D. ; REGAZZI, A. J. ; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**, Editora UFV, Viçosa, MG. 2014. V 2.
- CRUZ, M.C.M., *et al.* Fluorescência da clorofila a em folhas de tangerineira ‘Ponkan’ e limeira ácida ‘Tahiti’ submetidas ao estresse hídrico.Jaboticabal, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 896-901, 2009.
- FERREIRA, E. A., et al., Respostas fisiológicas da mandioca à aplicação de herbicidas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 645-656, 2015.
- FONTES, E.M.G, et al. The cotton agricultural context in Brazil. **CABI Publishing**, p.21-66, 2006.

HAVAUX, M.; ERNEZ, M.; LANNOYE, R. Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. **Journal of Plant Physiology**, v.133, n. 5, p. 555-560, 1988.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014**. [S.l.]. ISAAA Brief, 2014.

LI, N. *et al.* Intravital imaging of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin binding sites in the midgut of silkworm. **Analytical Biochemistry**, n.15, n. 447, p. 90-97, 2014.

MACEDO, T. B. *et al.* Photosynthetic responses of soybean to soybean aphid (Homoptera: Aphididae) injury. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 1, p. 188-193, 2003.

MURCHIE, E.H.; LAWSON, L. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications L. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n. 13, p. 3983-3898, 2013.

NETTO, A.T. *et al.* Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae, Amsterdam**, v.104, n.2, p.199-209, 2005.

PEREIRA, W. E. **Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, crescimento e composição mineral de quatro porta-enxertos de citros submetidos a estresse por Alumínio, em Cultivo Hidropônico**. Viçosa, MG 2001. 123 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

PERLAK, F. J., *et al.* Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA – early promises versus today reality. **Plant Journal**, v. 27, n. 6, p. 489-501, 2001.

RODRIGUES, T. R. *et al.* Distribuição espacial de *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera, Aphididae) e *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (Hemiptera, Aleyrodidae) em algodoeiro Bt e não-Bt. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.54. n. 1, p.136-143, 2010.

SUJII, E. R., *et al.* Impacto do algodoeiro Bt na dinâmica populacional do pulgão-do-algodoeiro em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.10, p.1251-1256, 2008.

WU, K.; GUO, Y. Influences of *Bacillus thuringiensis* Berliner cotton planting on population dynamics of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, in Northern China. **Environmental Entomology**, v. 32, n. 2, p. 312-318, 2003.

## CONCLUSÃO GERAL

As proteínas Cry1F e Cry1Ac não afetaram os parâmetros biológicos de ácaros *T. ludeni*. Porém proporcionam menor infestação do pulgão do algodoeiro - *A. gossypii*.

Os parâmetros fotossintéticos em plantas de algodão Bt foram menos influenciados pela infestação de *T. ludeni*, enquanto a isolinha foi mais sensível. Maior efeito nesses parâmetros para o ataque de *T. ludeni* está relacionado ao dano direto ao aparato fotossintético das células.

Já a infestação de *A. gossypii* influenciou de forma similar os parâmetros fotossintéticos em plantas de algodão Bt e isolinha. O ataque de *A. gossypii* não causa efeito direto no aparato fotossintético, pois os pulgões sugam o floema, ou seja, os fotoassimilados.

Esses resultados fornecem fortes evidências de que a tecnologia Bt pode complementar outras táticas integradas de controle de pragas, especialmente, se em conjunto com o controle biológico.