



BIONOMIA COMPARADA DO PULGÃO DO ALGODOEIRO *APHIS GOSSYPYII* CRIADO EM ALGODOEIRO BT E NÃO-BT¹

Edison R. Sujii (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / sujii@cenargen.embrapa.br), Pedro H. B. Togni (UnB), Erich Y. T. Nakasu (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/UFRGS), Paulo H. Ribeiro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Viviane A. Beserra (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Tainã R. Macedo (UNICEUB), Carmen S.S. Pires (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Eliana M. G. Fontes (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

RESUMO - A expressão da toxina Cry pelo algodão Bt, embora se apresente como uma excelente ferramenta para o manejo de lagartas, apresenta o risco potencial de favorecer as populações do pulgão do algodoeiro tornando essa praga ainda mais importante devido a desocupação do nicho das lagartas ou devido a efeitos pleiotrópicos (inesperados) causados pela transgenia. Esse trabalho testou se pulgões criados no algodão Bt podem apresentar alterações em seu ciclo de vida ou capacidade reprodutiva com implicações em sua dinâmica populacional e sua importância como praga do algodoeiro. A bionomia do pulgão foi avaliada em casa-de-vegetação com insetos criados em gaiolas individuais contendo plantas de algodão Bt da variedade DP 404BG (Bollgard) ou sua isolinha não transformada DP 4049, cujas sementes foram cedidas pela empresa Delta & Pine. A comparação das variáveis: período pré-reprodutivo (fase imatura) e reprodutivo, além da longevidade e curva de sobrevivência que estão relacionadas ao ciclo de vida; e a produção de prole total e diária por fêmea e curva acumulada de produção de prole da população, que estão relacionadas à fecundidade, não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados indicam que o algodoeiro Bt não favorece o aumento da taxa de crescimento intrínseco de *A. gossypii*.

Palavras-chave: biossegurança, toxina Cry, praga, espécie não-alvo.

INTRODUÇÃO

O pulgão *Aphis gossypii*, Glover (Hemiptera: Aphididae) é uma das principais pragas do algodoeiro devido aos danos diretos, causados pela sucção do floema, e indiretos pela transmissão de viroses. Além disso, uma substância açucarada (honeydew) exudada pelo pulgão favorece a ocorrência de fungos (fumagina) que prejudicam a qualidade das fibras do algodoeiro na fase final de seu ciclo (FONTES et al., 2006). Essa praga coloniza o algodoeiro desde a fase de plântula e se reproduz de forma rápida e abundante por partenogênese telítoca. Essas características permitem que o inseto produza várias gerações e altas densidades populacionais a cada safra, favorecendo a rápida seleção de indivíduos resistentes a fatores do ambiente restritivos ao seu crescimento populacional (GALLO et al., 2002; LIU et al., 2005). O controle de lagartas pela toxina Cry produzida pelo algodão Bt representa uma excelente ferramenta para o programa de manejo das pragas do algodoeiro por possibilitar a redução do número de aplicações de inseticidas químicos sintéticos e promover um controle mais efetivo contra diversas espécies de lagartas (FITT e WILSON, 2000; SHARMA e ORTIZ,

¹ Apoio financeiro: FAPDF, CNPq, FINEP



2000; WU, 2001). No entanto, apresenta o risco potencial de indiretamente facilitar um aumento de populações do pulgão, como observado na China (DENG et al., 2003), devido a possíveis mudanças das interações ecológicas no agroecossistema ou devido a efeitos pleiotrópicos (inesperados) causados pela transgenia, tornando essa praga ainda mais importante (SUJII et al., 2006). Adicionalmente, estudos em laboratório mostraram que pulgões alimentados por três gerações com algodão Bt que expressa Cry1Ac e *CpTI* apresentaram maior capacidade reprodutiva e maiores taxas de sobrevivência em comparação com indivíduos alimentados com algodão não-BT, com possível impacto sobre a dinâmica populacional da espécie (LIU et al., 2005,). Ao alimentar-se do floema, o inseto provavelmente ingerirá a toxina Bt, podendo esta ter ação desconhecida sobre sua bionomia, além de passá-la a níveis tróficos superiores através da predação ou parasitismo. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia que permita testar se pulgões criados em algodão Bt podem apresentar alterações em seu ciclo de vida ou capacidade reprodutiva que tenham implicações em sua dinâmica populacional e sua importância como praga do algodoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O ciclo de vida e reprodução do pulgão *A. gossypii*, foi comparado experimentalmente em plantas de algodão Bt da variedade DP 404 BG (Bollgard) e sua isolinha não transformada DP 4049 O experimento foi constituído de 50 replicações de cada tratamento e conduzido em casa de vegetação a 25 ± 4 °C. Cada parcela experimental era constituída por uma gaiola plástica medindo 32 cm de altura e 18 cm de diâmetro (capacidade de 6 l) contendo um vaso de 10 cm de diâmetro e 7 cm de altura (capacidade de 0,45 l). Na parte superior das gaiolas havia uma abertura recoberta com voile, permitindo aeração do sistema. Sementes de algodão Bt ou sua isolinha não-transformada, foram plantadas nos vasos em solo esterilizado e adubado, sendo que apenas uma plântula foi deixada por vaso. As sementes foram doadas pela empresa Delta & Pine. A rega foi provida por um sistema de gotejamento individual e a base da planta era recoberta por isopor para evitar a perda de indivíduos e não prejudicar a contagem dos mesmos. Três ninfas neonatas de pulgão (menos de 24 h de vida) foram colocadas em cada planta, quando estas apresentavam duas folhas verdadeiras estendidas (Fig. 1). Após três dias, apenas uma ninfa foi deixada em cada planta. Os pulgões foram observados diariamente visando determinar o tempo de desenvolvimento na fase imatura (período pré-reprodutivo), o período reprodutivo e a quantidade de prole de cada indivíduo, além da longevidade de cada fêmea. As ninfas recém nascidas em cada gaiola foram registradas e retiradas diariamente visando determinar a fecundidade e o ritmo reprodutivo das fêmeas. As gaiolas em que as fêmeas não alcançaram a fase reprodutiva foram retiradas do experimento por não permitirem avaliar a duração da fase imatura e da fase reprodutiva, além da quantidade média e acumulada de prole produzida por fêmea.

Amostras das plantas foram analisadas quanto a expressão da proteína Bt, através do teste ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay). As variáveis medidas foram comparadas por teste t com auxílio do programa SigmaStat v. 3.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema desenvolvido se mostrou eficiente para as avaliações propostas. As plantas mantidas em condições de vaso e casa de vegetação expressaram a toxina Cry 1Ac segundo teste ELISA realizado em amostras de folhas. As folhas não apresentaram sintomas visíveis de injúria como engruvinhamento e clorose causada pela alimentação contínua dos pulgões durante o experimento, garantindo assim que os possíveis efeitos da toxina sobre a bionomia do pulgão fossem avaliados sem interferência dos próprios insetos na qualidade nutricional do alimento. Os pulgões apresentaram taxas de sobrevivência elevadas nas gaiolas, sendo que apenas 3% dos insetos não alcançaram a fase

reprodutiva (dois em planta Bt e um em planta não-Bt), além de fecundidade semelhante a outros experimentos com a mesma espécie (LIU et al., 2005). As variáveis biológicas avaliadas apresentaram boa padronização com coeficiente de variação inferior a 45% e permitiram o uso de testes paramétricos

As plantas de algodão Bt não afetaram o desenvolvimento das ninfas do pulgão. A duração da fase imatura ou o período pré-reprodutivo em plantas Bt ($7,25 \pm 1,45$ dias) não diferiu em relação às plantas não-Bt $7,12 \pm 1,24$ dias ($t = 0,466$; 95 g.l.; $P = 0,642$). O período reprodutivo em plantas Bt $16,35 \pm 5,91$ dias e não Bt $16,18 \pm 6,66$ dias também não diferiu significativamente ($t = 0,133$; 95 g.l.; $P = 0,894$). Da mesma forma, a longevidade média dos insetos em plantas Bt $20,47 \pm 6,56$ dias e não-Bt $20,98 \pm 7,29$ dias ($t = 0,361$; 95 g.l.; $P = 0,719$) também não diferiu significativamente. As curvas de sobrevivência das populações criadas em algodão Bt e não Bt apresentaram o mesmo padrão com aumento da mortalidade a partir de 16 dias de vida e longevidade máxima em torno de 38 dias (Fig. 2). A curva de sobrevivência do tipo I, atípica para insetos (BEGON et al., 1996), pode ser explicada pela exclusão de predadores e parasitóides no experimento e ausência de outros possíveis fatores de mortalidade como a interação inseto/planta.

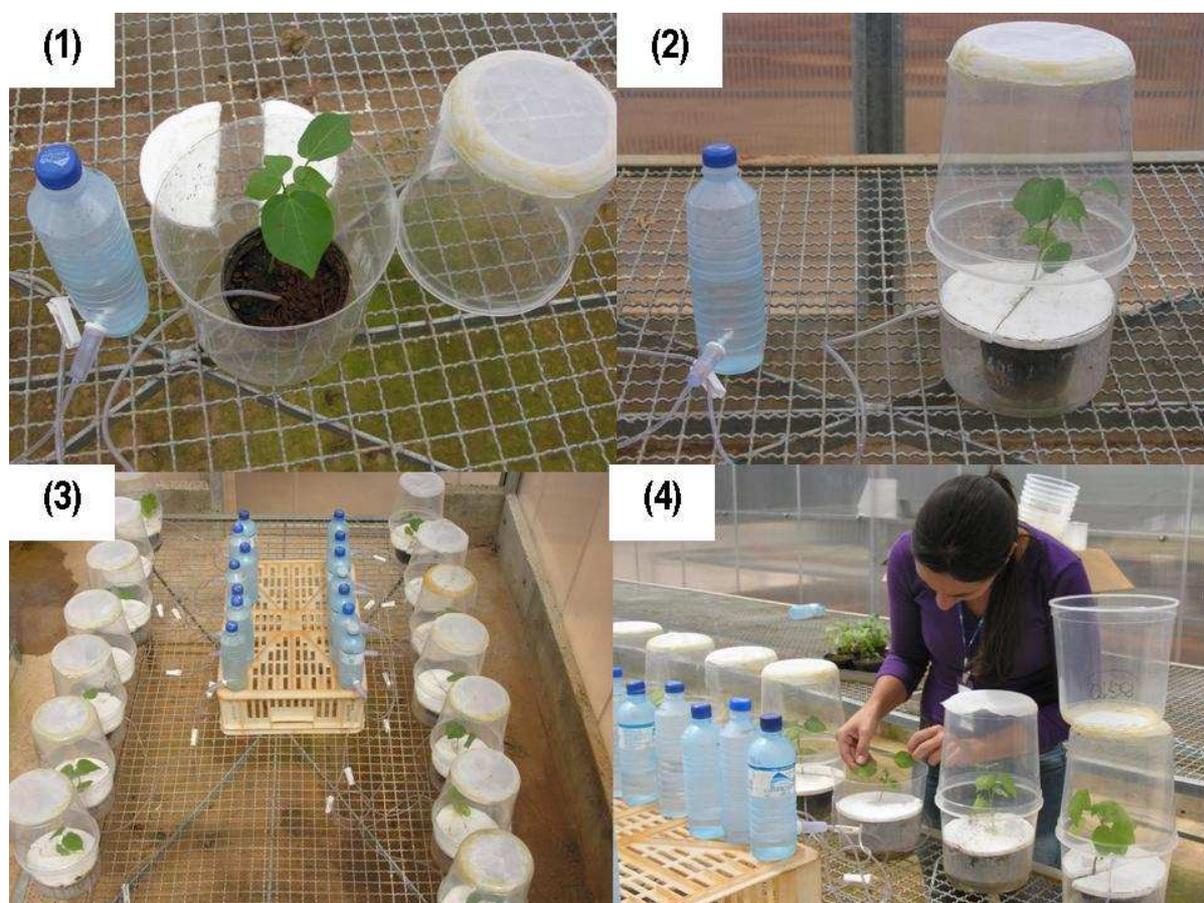


Figura 1. Montagem do experimento em casa-de-vegetação: (1) materiais utilizados e sistema de irrigação por gotejamento utilizando garrafa plástica e mangueira de soro com regulador de fluxo, (2) gaiola pronta com voile recobrendo a tampa para permitir aeração do sistema e a base da planta recoberta com o isopor, deixando apenas a parte aérea exposta, (3) vista parcial das parcelas experimentais montadas e (4) coleta dos dados.

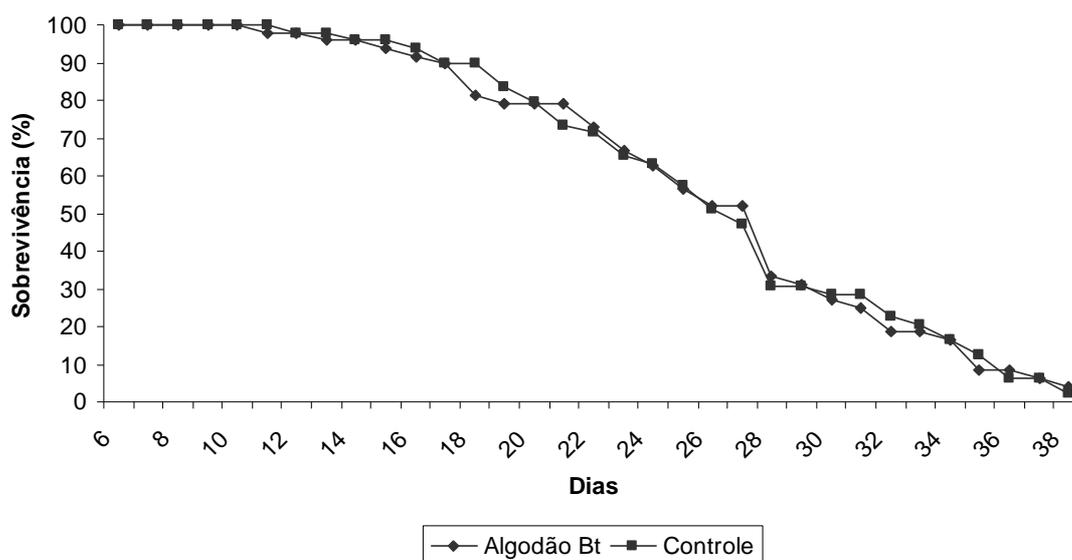


Figura 2. Curva de sobrevivência da população do pulgão *Aphis gossypii* criada em Algodão Bt (Bolgard) e não-Bt em casa-de-vegetação no Distrito Federal.

A produção média de prole total por fêmea foi de $47,26 \pm 19,20$ ninfas (média \pm desvio padrão) no tratamento com a planta geneticamente modificada e $46,98 \pm 21,31$ ninfas no tratamento controle, não havendo diferença significativa entre eles ($t = 0,0665$; 95 g.l.; $P = 0,947$). Da mesma forma, as curvas de produção média diária de ninfas por fêmea em algodão Bt e não-Bt (Fig. 3) e de produção acumulada de ninfas por fêmea em algodão Bt e não-Bt (Fig. 4) não apresentaram diferenças significativas. A curva de fecundidade média das fêmeas com início em torno de 6 dias, pico de fecundidade entre 12 e 14 dias e redução gradativa até os 34 dias. A ausência de alterações bruscas na dinâmica de oviposição confirmam que fatores de estresse como oscilações bruscas na temperatura ou na qualidade nutricional do alimento não ocorreram durante o experimento.

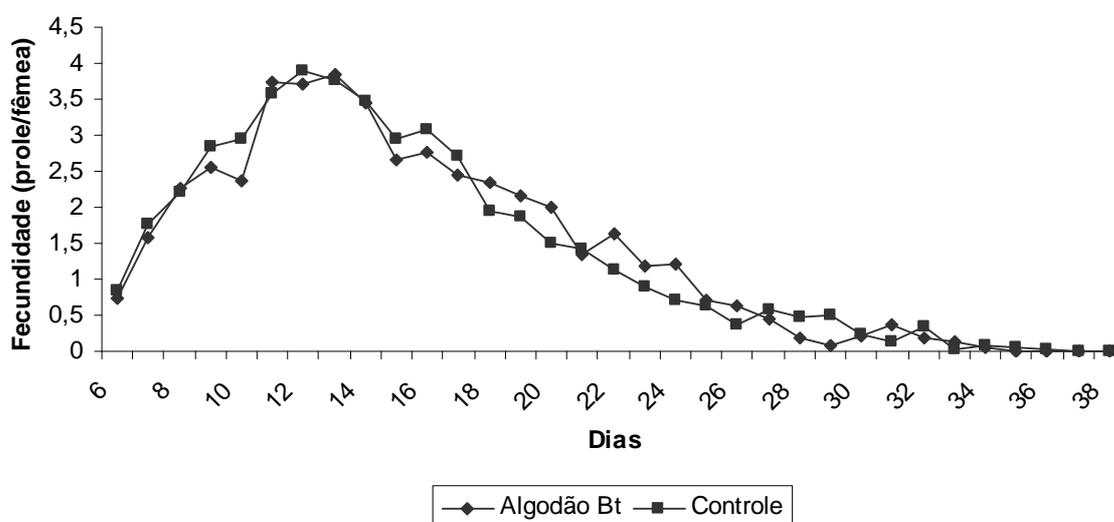


Figura 3. Fecundidade média diária do pulgão *Aphis gossypii* criada em algodão Bt (Bolgard) e não-Bt em casa-de-vegetação no Distrito Federal.

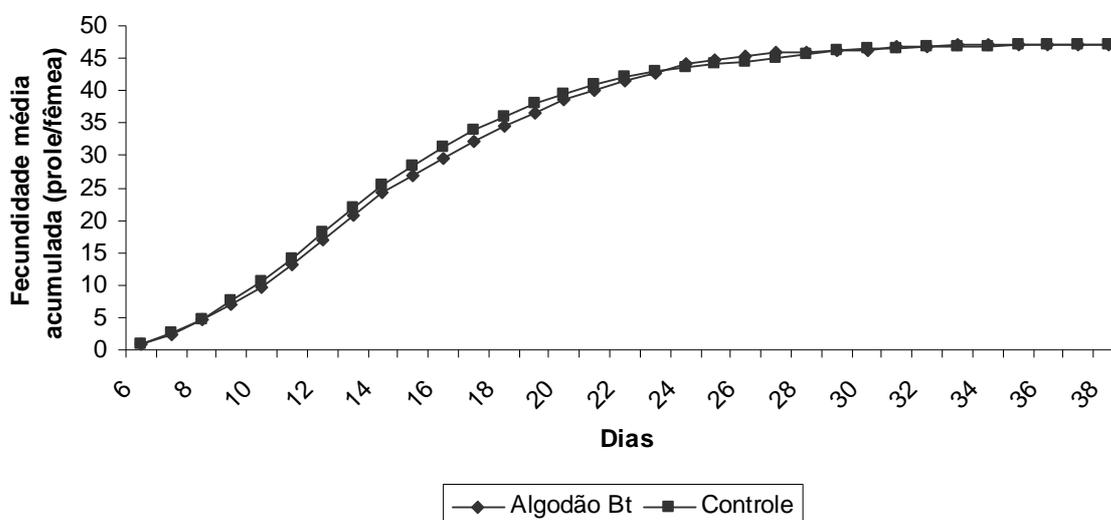


Figura 4. Fecundidade acumulada diária do pulgão *Aphis gossypii* criada em algodão Bt (Bolgard) e não-Bt em casa-de-vegetação no Distrito Federal.

No presente trabalho a comparação dos dados da bionomia do pulgão com outros estudos realizados para a mesma espécie são tão importantes quanto às comparações entre os tratamentos testados, devido a proposta de se desenvolver uma metodologia de bioensaio que possa ser utilizada para avaliar o impacto de diferentes eventos de transformação de plantas sobre *A. gossypii* ou outras espécies não-alvo da tecnologia. Apesar do presente estudo ter sido conduzido em casa-de-vegetação com grande amplitude de variação na temperatura, $25 \pm 4^\circ\text{C}$, o ciclo de vida considerando a fase imatura, período reprodutivo e longevidade total de *A. gossypii*, apresentaram amplitude de variação e média semelhante aos resultados apresentados em outros trabalhos (LIU et al., 2005; XIU et al., 1999; VENDRAMIN, 1980). A taxa de sobrevivência em ambos os tratamentos foram elevadas (>98%) e a fecundidade média de aproximadamente 47 ninfas por fêmea, além do ritmo de produção de prole pelo conjunto de fêmeas medido pela fecundidade média diária e fecundidade acumulada (Fig. 2 e 3), são similares aos resultados obtidos por LIU et al. (2005) e Vendramin (1980). Estes dados indicam a qualidade da metodologia proposta para a realização de bioensaios com *A. gossypii* minimizando a possibilidade de erros do tipo II.

Todas as variáveis testadas confirmam a biossegurança do evento DP404 Bollgard em relação aos efeitos da toxina Cry1Ac na bionomia do pulgão do algodoeiro, uma espécie praga não-alvo da tecnologia. A inserção de um novo gene que poderia silenciar genes ou a expressão de uma nova proteína pela planta não afetou os parâmetros que poderiam levar a um aumento na capacidade de crescimento intrínseco das populações do pulgão (SUJII et al., 2006).

CONCLUSÕES

- O sistema desenvolvido para a realização do bioensaio é eficiente para a avaliação do efeito de algodoeiros transgênicos que expressam a toxina Bt em insetos não-alvo como o pulgão do algodoeiro.



- O algodão Bt, expressando a proteína Cry 1Ac, não apresentou ação deletéria ou favoreceu positivamente alterações no ciclo de vida, sobrevivência e fecundidade do pulgão *A. gossypii* em condições de casa-de-vegetação.

CONTRIBUIÇÃO PRÁTICA E CIENTÍFICA DO TRABALHO

O presente estudo contribui para o uso seguro do algodão Bt (DP 404 Bollgard) ao mostrar que fatores intrínsecos à planta transformada não alteram as características de desenvolvimento, sobrevivência e reprodução do pulgão do algodoeiro com reflexos em sua dinâmica populacional. Outros fatores como efeito da toxina em inimigos naturais ou o uso correto de inseticidas devem ser investigados caso ocorram surtos populacionais do pulgão do algodoeiro em plantios comerciais. Além disso, a metodologia utilizada no bioensaio pode ser aplicada a outros herbívoros não-alvo em estudos de biossegurança de plantas Bt.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEGON, M; HARPER, J.L. ; TOWNSEND, C.R. **Ecology: individuals, populations and communities**. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 1996. 1068p.
- 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, n.1, p.1-5, 2003.
- FITT, G. P. ; WILSON, L.J.. Genetic engineering in IPM: Bt cotton. In: KENNEDY, G. G.; SUTTON, T. B. (Eds.). **Emerging technologies for integrated pest management**. St. Paul: APS Press, 2000.p. 108Ð125.
- FONTES, E.M.G.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R. ; PANIZZI, A.R. The Environmental Effects of Genetically Modified Crops Resistant to Insects. **Neotropical Entomology**, v.31, n.4, p.497-513, 2002.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES,S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S ; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002. 920p.
- LIU, X.D.; ZHAI, B.P.; ZHANG X.X. & ZONG, J.M. Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. **Ecological Entomology**, v. 30, p.307-315, 2005.
- SHARMA, H.C. ; ORTIZ, R.. Transgenics, pest management, and the environment. **Current Science**, v.79, n.4, p.421-437, 2000.
- 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. AND FONTES, E.M.G. (Eds) **Environmental risk assessment of genetically modified organisms**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2006. v.2, p. 133-154.
- XIU, J.Y.; VAN DER WERF, W. ; RABBINGE, R. Influence of temperature on bionomics of cotton aphid, *Aphis gossypii*, on cotton. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 90, n.1, p.25-35, 1999.
- WU, K. IPM in cotton. In: JIA, S. (Ed.). **Transgenic cotton**. Beijing: Science Press, 2001.p. 218-224.
- VENDRAMIN, J.D. **Aspectos biológicos e avaliação de danos de Aphis gossypii Glover 1877 (Homóptera: Aphididae) em algodoeiro**. 1980. 121f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/USP Piracicaba, São Paulo, SP.