

Boletim de Pesquisa 244

e Desenvolvimento

ISSN 1676 - 340
Dezembro, 2008



Exposição do predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) à proteína Cry 1Ac em ensaio tritrófico

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 244

**Exposição do predador *Cycloneda
sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) à
proteína Cry 1Ac em ensaio tritrófico**

Vinícius Alves Ferreira
Thiara de Almeida Bernardes
Kelly Ramalho Cavalcante

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosamares Galvão Rocha*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Foto: esquerda: campo com algodoeiro; centro: *Aphis gossypii*, pulgão do algodoeiro, fonte de alimento para joaninhas; *Cycloneda sanguinea*, joaninha predadora de pulgões.

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

E96 Exposição do predador *Cycloneda sanguinea* (Coleóptera: Coccinellidae) à proteína Cry 1Ac em ensaio tritrófico / Vinícius Alves Ferreira... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 244).

1. *Aphis gossypii* - pulgão 2. Algodão – biossegurança. 3. Interação tritrófica. I. Ferreira, V. F. II. Série.

633.51 – CDD 21

Sumário

Resumo	5
Introdução	6
Material e Métodos	8
Referências	19
Resultados	12

Exposição do predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) à proteína Cry 1Ac em ensaio tritrófico

Resumo

Vinícius Alves Ferreira¹
Thiara de Almeida Bernardes²
Kelly Ramalho Cavalcante²
Paulina de Araújo Ribeiro²
Débora Pires Paula³
Edison Ryoiti Sujii³
Eliana Maria Gouveia Fontes⁴
Carmen Sílvia Soares Pires⁴

O algodoeiro resistente a insetos expressando a toxina Cry1ac, atua com especificidade no controle de insetos-alvo da ordem Lepidoptera. Todavia, pode afetar de forma inesperada insetos não-alvo como os predadores. Estudos anteriores indicam que a fecundidade de *Cycloneda sanguinea* pode ser alterada quando a toxina Cry1ac está presente na sua dieta em altas concentrações. Com o objetivo de avaliar o efeito da exposição de *C. sanguinea* à proteína Cry1Ac expressa no algodoeiro *Bt* através da alimentação em presas desenvolvido um bioensaio tritrófico com algodoeiro *Bt* e sua isolínea, o pulgão *Aphis gossypii* e o predador *C. sanguinea*. Larvas neonatas foram criadas individualmente em gaiolas plásticas contendo algodoeiro Bt (tratamento teste) e não-Bt (tratamento controle). Os indivíduos foram acompanhados diariamente até a fase adulta para avaliação de sua bionomia. Para confirmação da exposição, a proteína Cry1Ac foi quantificada no tecido foliar, floema e pulgão do tratamento-teste usando técnica de ELISA. Foram detectadas $0,49 \pm 0,14 \mu\text{g}$ de Cry1Ac nas folhas e traços da toxina nos pulgões e floema. Não houve diferença significativa nas variáveis analisadas para os tratamentos teste (tt) e controle (tc). O peso médio dos adultos foi semelhante entre os tratamentos; a duração média do estágio larval foi de $12 \pm 2,97$ dias no tt e $11,67 \pm 1,84$ dias no tc. O número médio de ovos por fêmea foi $103,18 \pm 60,63$ no tt e $82,40 \pm 67,14$ no tc. A viabilidade média dos ovos foi de $48,21 \pm 25,63\%$ no tt e $60,69 \pm 27,03\%$ no tc. Observamos que a primeira geração de *C. sanguinea* não é afetada pela proteína expressa no algodoeiro bt através da exposição tritrófica.

Palavras-Chave: **Biossegurança, algodoeiro Bt, *Aphis gossypii*, interação tritrófica**

¹ Biólogo, Mestrando, Universidade Federal de Viçosa

² Biólogo, Centro Universitário de Brasília

³ Eng. Agr., Dr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga, Dr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Introdução

O cultivo do algodoeiro (*Gossypium* spp.) é responsável pela maior parte da produção de fibras no mundo, sendo uma das culturas mais importantes para economia do Brasil. No país, destaca-se pela extensão de área plantada com cerca de 1,02 milhões de hectares em 2008, o que pode resultar na produção de cerca de 3,70 milhões de toneladas de algodão em caroço (CONAB, 2008).

Associadas à cultura do algodoeiro, diversas pragas causam danos em diferentes estágios da produção, dentre as mais relatadas, trinta pertencem à ordem Insecta. Essas pragas causam perdas na produção e o gasto com o controle convencional para cada uma delas pode representar 25% do custo da produção (GALLO et al, 2002)

A composição das pragas pode variar conforme a região, sendo, de um modo geral, constituída por sugadores como os pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*) e o tripses (*Frankliniella* spp.), estando relacionadas a fase inicial do cultivo. O ataque dessas pragas retarda o crescimento e transmite viroses a planta. Na fase vegetativa as principais pragas encontradas são os lepidópteros desfolhadores como o curuquerê (*Alabama argilacea*) e a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Na fase reprodutiva, o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), a lagarta da maçã (*Heliothis virescens*) e a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) são as pragas mais abundantes são as principais pragas e suas infestações podem causar danos de até 100% na produção. Essas pragas são comumente encontradas em plantios de algodão no Cerrado (GALLO et al., 2002; GONDIM et al., 2001).

A utilização de produtos químicos para o controle de pragas vem causando dano ao meio ambiente e à saúde humana. Em 2008 houve uma redução da área plantada de algodão no Brasil, e dentre os diversos fatores que influenciaram, destaca-se o alto preço dos insumos derivados de petróleo, que interfere diretamente no custo da produção (CONAB, 2008). Desse modo, vem aumentando o interesse em métodos de controle de pragas mais eficientes, que causem menos danos ao meio-ambiente e diminuam o custo de produção são importantes.

Com isso os agentes de controle biológico, principalmente bactérias de solo aparecem como uma alternativa econômica e ecologicamente viável, para o controle de insetos-praga (PRAÇA et al., 2007; SUJII et al., 2003). Inseticidas microbianos contendo endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) vêm sendo utilizados como métodos alternativos aos convencionais de controle químico por cerca de 60 anos, conferindo proteção contra diferentes grupos de insetos (ROMEIS et al., 2006).

A partir de avanços na biologia molecular foi possível a geração de plantas geneticamente modificadas contendo genes de *Bacillus thuringiensis* que codificam as proteínas tóxicas a insetos e conferem resistência a lagartas-pragas (PERLAK et al., 1993). Uma das possíveis vantagens da adoção de plantas transgênicas é a redução no uso de inseticidas sintéticos, além da especificidade

no controle de organismos-alvo o que, conseqüentemente, reduz os impactos no meio-ambiente e saúde humana (SHELTON et al., 2002; NARANJO, 2005; CATANNEO et al., 2006).

Embora essas toxinas tenham atuação específica no combate às pragas, estudos de impacto ambiental devem ser conduzidos, principalmente sobre efeitos inesperados em organismos não-alvo. Desse modo, testes e procedimentos científicos devem ser conduzidos com intuito de investigar tais efeitos em inimigos naturais, polinizadores, herbívoros não-alvo da tecnologia, e espécies de importância cultural e para a conservação.

Variedades de algodão transgênico resistente a insetos, contendo genes do *Bacillus thuringiensis* já são plantadas comercialmente na África do Sul, Argentina, Austrália, China, Índia, Indonésia, México, e Estados Unidos e foram responsáveis por uma redução significativa no uso de inseticidas e no custo de produção da cultura. Recentemente o algodão Bollgard da Monsanto, contendo a proteína Cry1Ac, foi liberado para plantio comercial no Brasil.

O algodão GM, expressando a proteína Cry1Ac, pode afetar diretamente os inimigos naturais, por meio da alimentação em tecidos que expressem toxinas e de modo indireto através da redução de presas suscetíveis, fontes alimentares para artrópodes predadores e parasitóides (MEN et al., 2003). Dentro do contexto das avaliações de risco das plantas GM, é fundamental a identificação das vias de exposição para a seleção adequada dos organismos não-alvo que serão usados nessas avaliações (HILBECK et al., 2006).

Dentre os inimigos naturais, *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) é um predador comumente encontrado em diferentes culturas no Brasil. Na cultura do algodoeiro, os coccinelídeos representam mais da metade composição de espécies de predadores, sendo *C. sanguinea* a espécie mais abundante (SUJII et al., 2007). A distribuição dessa espécie e de outros coccinelídeos no campo está relacionada com a distribuição das populações de afídeos, sendo agentes eficazes no controle biológico de pragas, principalmente no controle natural dos afídeos. (HAGEN, 1962) A diminuição nas populações de *C. sanguinea* pode favorecer o aparecimento de pragas secundárias à tecnologia, como o pulgão *A. gossypii*, elevando-as ao status de pragas primárias, causando danos à cultura e maior uso de agrotóxicos.

Com o cultivo extensivo do algodoeiro GM, insetos não-alvo, como *C. sanguinea*, passam a ser expostos as toxinas seja pela exposição direta à toxina Cry1Ac no campo através da alimentação de partes da planta como o néctar e pólen, e indiretamente sendo exposta por meio da predação em herbívoros que tenham se alimentado da planta (OBRIST et al., 2006).

Assim metodologias que avaliem possíveis riscos ambientais de organismos GM devem avaliar efeitos das entomotoxinas sobre inimigos naturais em curto e longo prazo. Testes de intoxicação aguda que exponham espécies não-alvo a condições piores que em campo para efeitos em curto

prazo e testes que investiguem a exposição em longo prazo, por meio de uma via de exposição tritrófica planta GM + praga + predador.

Nessa perspectiva o objetivo desse trabalho foi elaborar um protocolo experimental para avaliação de possíveis efeitos negativos no desenvolvimento larval e do adulto de *C. sanguinea*, através da via de exposição planta-herbívoro + predador. Tais efeitos são o retardo no desenvolvimento larval e de pupa, aumento da mortalidade larval e dos adultos e diminuição da oviposição e na viabilidade dos ovos. Trabalhamos com a hipótese de que *C. sanguinea* pode ter alguns desses aspectos da sua bionomia comprometidos, devido a essa via de exposição tritrófica

Material e Métodos

Local de realização e condições ambientais: O experimento foi realizado no período de março de 2007 a julho de 2008 no Laboratório de Ecologia, Semioquímicos e Biossegurança (LBS)/ Núcleo de Controle Biológico/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Todas as criações e repetições foram conduzidas em salas climatizadas com umidade e temperatura controladas ($T = 25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. = 70%), iluminadas com lâmpadas do tipo growlux e “luz do dia”, em fotofase de 12 horas.

Insetos utilizados: Foram utilizadas larvas neonatas do predador *Cycloneda sanguinea* e pulgões *Aphis gossypii* de estágios diferentes. Esses insetos foram provenientes de colônias mantidas no LBS desde 2006, que recebem periodicamente insetos coletados em campo para renovação dos indivíduos.

Os pulgões foram criados em plantas jovens de algodão, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de 70%. Essa criação foi mantida em estante revestida com filó, para evitar fuga dos pulgões e impedir a entrada de parasitóides ou outros insetos. Uma colônia alternativa foi também mantida sob condições similares, nela os pulgões foram criados em gaiolas plásticas de 3 litros, alimentados com folhas de algodoeiro coletadas no campo, imersas em solução nutriente.

A colônia de *C. sanguinea* foi mantida sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 70%. Casais foram separados em gaiolas plásticas de 500 ml e larvas individualizadas em gaiolas de 250 ml, ambos recebendo uma dieta variada, contendo pulgões, ovos de *Anagatha kulhniella*, mel e periodicamente pólen.

Plantio do algodoeiro em casa de vegetação. As plântulas utilizadas no experimento foram plantadas em vasos plásticos com capacidade de 500 gramas de solo. Semanalmente, 25 vasos de cada variedade, sendo a variedade NuOpal transgênica expressando a proteína Cry1Ac e a variedade

DeltaOpal, convencional não transformada. Após o plantio os vasos foram identificados com o código do experimento (TRI), do tratamento e data de plantio. Após a abertura dos cotilédones, as plântulas foram retiradas da casa de vegetação, para evitar a infestação por pragas, e levadas para uma estante de criação de insetos mantida em uma sala climatizada no LBS. Na estante, essas plantas recebiam adubação semanal (NPK 30.10.10 + micro nutrientes) e iluminação com lâmpadas do tipo *Growlux* e luz do dia, programadas com fotoperíodo de 12 horas. As plantas se desenvolviam na estante até atingir no mínimo 2 pares de folhas verdadeiras totalmente expandidas e posteriormente eram transportadas para a montagem das gaiolas de criação de insetos usados nos bioensaios.

Tratamentos testados: Utilizamos dois tratamentos para testar se *C. sanguinea* é afetada pela proteína Cry1Ac, através da predação de *A. gossypii* em plântulas de algodão. No tratamento teste criamos nas gaiolas de bioensaio o predador *C. sanguinea*, alimentado com o pulgão *A. gossypii* em plântulas de algodão expressando a proteína Cry1Ac (var. NuOpal). Simultaneamente ao teste foram conduzidas as repetições do controle, em que o predador não foi exposto à toxina Cry1Ac, devido a utilização da variedade convencional DeltaOpal.

Deteção e quantificação da toxina Cry1Ac nas plantas de algodão Bt e na presa (pulgão)

Extração e preparação das amostras: Foram selecionadas aleatoriamente 10 plantas de algodoeiro de ambos os tratamentos (Bt e Isolínea Controle) com a mesma idade (aspecto morfológico até estágio vegetativo 5 - V5) infestadas com pulgões por no mínimo 24 h para coleta de 100 pulgões de cada par de folha repetição/tratamento, as mesmas de onde foram coletados os pulgões para extração do floema e do extrato foliar total.

Os pulgões foram coletados com pincel seco e pesados (mg) [10 mg/repetição] e transferidos para microtubo de 1,5 mL para maceração com bastão de vidro esmerilado em 500 µL de PBST 1X [tampão fosfato salino contendo Tween 0,05%] e inibidor de protease PMSF a 1mM. Incubou-se em gelo por 30 min e centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e utilizados para análise por ELISA.

Foram utilizadas as mesmas plantas de onde foram coletados os pulgões de cada tratamento (Bt e isogênico não-Bt) para a extração do floema e quantificação foliar de Cry1Ac por ELISA. Foram cortadas as folhas (1 par) com talo completo e imediatamente recortadas sob solução EDTA 20 mM pH 7 para prevenir formação de bolha de ar dentro do sistema vascular da planta. As folhas foram acomodadas em tubos de vidro (4 cm comprimento x 2 cm largura x 7 cm altura) identificado preenchido com 2 mL de solução EDTA 20 mM pH 7 (aproximadamente 0,5 cm da parte basal das folhas imersas em solução). Os tubos foram transferidos para uma caixa plástica (22 cm comprimento x 10 cm largura x 8 cm de altura) e recoberta com tampa umedecida com papel filtro.

O sistema foi incubado em shaker a 50 rpm por 3 h a 25°C para exsudação. A metodologia se baseou na técnica padrão de extração via quelação exsudativa da seiva elaborada (KING e ZEEWAART, 1974). As amostras de exsudação do floema foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas por 16h. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em 350 µL de PBST 1X e inibidor de protease PMSF a 1mM.

Após a exsudação do floema cortou-se discos de 500 mg/folha de cada repetição/tratamento com a tampa de um tubo falcon de 50 mL e macerou-se em cadinho e pistilo com nitrogênio líquido até formar um pó fino. Adicionou-se ao pó obtido 2 mL de tampão de extração [NaHPO₄ 50mM, ácido ascórbico 25 mM, PEG 1% (m/v), glicerol 10% (m/v), DTT 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM] gaseificado com nitrogênio por 5 min logo antes de usar, deixando sob leve agitação durante 1 h a 4°C (câmara-fria). Centrifugou-se o extrato por 20 min a 10.000 rpm a 4°C e coletou-se o sobrenadante filtrando-o em membrana de 0,45 µm antes de transferir para microtubos de 1,5 mL.

Imunodeteção por ELISA-Indireta: A fração protéica total de todas as amostras frescas (pulgões, floema e material foliar) foi quantificada pelo método de Bradford (1976) antes de serem analisadas pela ELISA. Preliminarmente às quantificações por ELISA nas amostras dos experimentos mencionados acima, procedeu-se um experimento para avaliar a quantidade ideal de cada amostra a ser aplicada na placa de ELISA, bem como a quantidade ideal de anticorpo monoclonal anti-Cry1Ac. O teste foi realizado pela diluição serial do antígeno nas colunas simultaneamente à diluição serial do anticorpo anti-Cry1Ac nas linhas, de acordo com Crowther (1995).

Aplicou-se 100 µl/poço de *coating buffer* em toda a placa e utilizou-se proteína Cry1Ac tripsinizada (66 kDa) purificada como padrão para a curva de calibração, produzida pela Dra. Marianne Pusztai-Carey (*Case Western Reserve University SOM, Department of Biochemistry, Cleveland - OH/USA*). Os padrões foram utilizados nas seguintes faixas de acordo o tipo de amostra a ser avaliada: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 ng para as amostras de floema e pulgão; e de 0, 15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 ng para as amostras foliares. O extrato protéico das amostras de ambos os tratamentos (teste e controle) também foram aplicados em triplicata a 100 µl/poço. Após a aplicação de todos os antígenos (padrões e amostras), incubou-se a placa por 2 h a temperatura ambiente sobre mesa agitadora a 50 r.p.m. Os poços foram lavados três vezes com 200 µl/poço de PBS 1X por 5 min e os sítios residuais de ligação foram bloqueados adicionando-se 200 µl/poço de PBSTO 1X [PBS contendo Tween 0,05% e BSA 1%]. Deixou-se em agitação por 30 min à temperatura ambiente. Procedeu-se nova etapa de lavagem e então colocou-se 100 µl/poço de PBSTO 1X antes de transferir 100 µl/poço anticorpo monoclonal anti-Cry1Ac 1:5.000 em PBSTO 1X. Seguiu-se nova incubação sob agitação por 1 h à temperatura ambiente e lavagem. Adicionou-se 200 µl/poço do anticorpo secundário conjugado à peroxidase [*Goat Anti-Mouse IgG (H + L) - HRP*

Conjugate] diluído 1:1000 em PBSTO 1X. Incubou-se sob agitação leve por 1 h à temperatura ambiente. Após a última etapa de lavagem e adicionou-se 200 µl/poço de cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) e incubou-se sob agitação por 20 min à temperatura ambiente. A reação foi parada com 100 µl/poço de ácido Sulfúrico 1 N para leitura da absorbância a 450 nm. A utilização de amostras do controle, ou seja, não modificadas geneticamente ou que não continham Cry1Ac, foram utilizadas como “branco” na estimativa de Cry1Ac amostral, ou seja, seus valores de absorbância foram subtraídos dos do tratamento-teste antes do cálculo protéico residual.

Montagem do Bioensaio Tritrófico: Os pulgões, *A. gossypii* foram transferidos para as plantas de algodoeiro com no mínimo 24 horas de antecedência a montagem dos tratamentos. A infestação prévia foi imprescindível para assegurar que os afídeos tenham sido expostos à toxina Cry 1Ac antes de serem oferecidos para as joaninhas no tratamento teste. Nesse experimento, os pulgões oferecidos constituíram uma população mista com adultos, ninfas de todos os estágios e formas aladas.

As larvas de *C. sanguinea* foram retiradas da criação após 24 horas da eclosão e individualizadas em gaiolas contendo de uma a duas plantas de algodoeiros infestados com pulgões no mínimo 24 horas antes da transferência das larvas. Larvas de primeiro ínstar que morriam no período de 24 horas após a montagem da gaiola foram substituídas por outras de mesma idade, nesse período a morte da larva poderia estar relacionada com a manipulação e não pela exposição à toxina. Diariamente, as larvas foram transferidas para plantas previamente infestadas com pulgões em número suficiente para o desenvolvimento das joaninhas em cada estágio larval, sendo quantificado o número de pulgões consumidos. A partir de estudos anteriores foram realizadas estimativas de desenvolvimento e capacidade predatória de *C. sanguinea* sobre afídeos e dessa forma, foram calculadas as quantidades diárias de pulgões necessários para o desenvolvimento das larvas até a fase adulta (NAKASU et al., 2006) (anexo 1).

Nesse experimento, para cada repetição montada no tratamento teste, simultaneamente montamos um controle, sendo que o número de repetições por data dependia da disponibilidade de pulgões e plantas.

Parâmetros avaliados: Os parâmetros biológicos avaliados de *C. sanguinea* foram duração do período larval e pupal, peso os adultos após emergência, tempo de vida e para as fêmeas também avaliamos fecundidade e fertilidade. Cada um dos parâmetros foi comparado entre indivíduos dos dois tratamentos.

Análise dos dados: Os dados foram analisados pelo software PAST versão 1.81, sendo realizado testes de Mann-Whitney para comparação dos parâmetros avaliados entre os tratamentos (BROWN e ROTHERY, 1993; HAMMER, 1999-2009).

Resultados

Detecção e quantificação da toxina Cry1Ac: Foram coletadas amostras de pulgões, floema e folhas do mesmo nóculo nas plantas de todas as repetições dos tratamentos. Verificou-se que não houve diferença significativa no nível da toxina Cry1Ac entre os quatro nóculos do extrato vertical foliar do algodoeiro Bt (ANOVA: $F = 3,98$; $Valor-p = 0,11$): primeiro par $0,59 \pm 0,13$ $\mu\text{g/g}$ de peso fresco; segundo par $0,56 \pm 0,08$ $\mu\text{g/g}$ de peso fresco; terceiro par $0,52 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$ de peso fresco e quarto par $0,30 \pm 0,14$ $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.

Foram detectados traços de toxina Cry1Ac nos pulgões ($7,6 \pm 4,5$ ng/mg de peso fresco) e no floema ($1,12 \pm 0,68$ ng/mg de peso fresco). Já no mesmo tecido foliar de coleta dessas amostras detectou-se a toxina Cry1Ac em $0,49 \pm 0,14$ $\mu\text{g/g}$ de peso fresco, quantidade superior ao detectado no floema.

Bioensaio Tritrófico: Exposição via alimentação em pulgões

Não foi observado nenhum efeito negativo significativo para os parâmetros biológicos avaliados, *C. sanguinea* não apresentou retardo no desenvolvimento larval e de pupa, aumento da mortalidade larval e dos adultos e diminuição da oviposição e na viabilidade dos ovos devido a exposição tritrófica à Cry 1Ac.

Larvas *C. sanguinea* criadas desde o primeiro dia após a eclosão com pulgões alimentados em plantas de algodão, foram avaliadas diariamente nos dois tratamentos. No tratamento teste 55 larvas foram criadas em algodoeiro Bt, expressando a toxina Cry1Ac (var. NuOpal) e no tratamento controle 53 larvas foram criadas em plantas de algodão não modificado (var. DeltaOpal).

O período larval, número de dias do 1º instar ao estágio de pupa, nas larvas expostas à Cry1Ac foi de $12 \pm 2,67$ dias e nos indivíduos do controle desenvolveram-se em $11,67 \pm 1,84$ dias, não diferindo significativamente (Mann - Whitney $T = 907,5$; $n(\text{controle}) = 43$ e $n(\text{teste}) = 45$; $P = 0.619$). A duração do período de pupa foi, em média, $5,12 \pm 1,25$ dias nos indivíduos expostos a proteína Cry1Ac e $4,90 \pm 1,44$ dias nas larvas não expostas, não diferindo significativamente entre si (Mann - Whitney $T = 786,5$ $n(\text{controle}) = 42$ $n(\text{teste}) = 42$, $P = 0.395$) (Tabela 2).

A duração dos quatro estágios larvais de *C. sanguinea* foi semelhante quando comparados machos e fêmeas expostos e não expostos à toxina Cry1Ac via alimentação em pulgões (Tabela 3). A duração média do 1º instar foi de $2,91 \pm 0,78$ dias (média \pm desvio padrão) no tratamento com exposição à proteína Cry1Ac e $2,70 \pm 1,06$ dias no tratamento controle (algodoeiro não Bt) (Mann – Whitney; T = 1032 n(controle) = 47 e n(teste) = 54; P = 0.106). As larvas *C. sanguinea* de 2º instar do tratamento com exposição à Cry1Ac apresentaram duração média de $1,98 \pm 0,73$ dias e no controle o valor encontrados para a duração foi $2,32 \pm 0,76$ dias (Mann – Whitney T = 210,5; n(controle) = 46 e n(teste) = 50 24; P = 0.112). A duração do 3º instar nas larvas expostas foi de $2,57 \pm 1,48$ dias e nos indivíduos sem exposição foi de $2,07 \pm 0,71$ dias, não diferindo significativamente quando comparados entre si (Mann – Whitney T = 949,5 n(controle) = 46 n(teste) = 49 , P = 0.187). Observou-se que o 4º instar foi o de maior duração, sendo de $4,73 \pm 1,74$ dias no tratamento com exposição a Cry1Ac e $4,60 \pm 1,6$ dias no controle, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos (Mann – Whitney T = 874,5; n(controle) = 43 e n(teste) = 44; P = 0.546).

Tabela 2. Duração do estágio larval e pupal de *C. sanguinea* alimentadas com o pulgão *A. gossypii* criados em algodoeiro GM expressando a toxina Cry1Ac e algodoeiro não GM.

	Tratamentos	
	Exposição à Cry1Ac via consumo de pulgões criados em algodoeiro GM	Não exposição à Cry1Ac via consumo de pulgões criados em algodoeiro não- GM
Período Larval ¹	12 \pm 2,67 a	11,67 \pm 1,84 a
Período Pupal ²	5,12 \pm 1,25 a	4,90 \pm 1,44 a

Valores expressos em média \pm desvio padrão, letras iguais na mesma linha representam diferença não significativa entre os tratamentos.

¹ Mann – Whitney, (Mann – Whitney T = 907,5; n(controle) = 43 e n(teste) = 45; P = 0.619).

² Mann – Whitney, (Mann – Whitney T = 786,5; n(controle) = 42 e n(teste) = 42; P = 0.395).

O período pupal dos machos e das fêmeas não diferiram significativamente entre os tratamentos. Os machos de *C. sanguinea* expostos à Cry1Ac desenvolveram de pupa até a fase adulta em $5,00 \pm 0,83$ dias enquanto os machos não expostos em $5,08 \pm 1,21$ dias (Mann-Whitney T = 296; n(controle) = 24 e n(teste) = 25; P = 0,944). O período pupal das fêmeas foi semelhante entre os tratamentos, sendo $4,66 \pm 1,71$ dias no controle e $5,27 \pm 1,67$ dias nas fêmeas expostas (Mann-Whitney T = 121; n(controle) = 18, n(teste) = 18; P = 0,200) (Tabela03).

Tabela 3: Duração dos estágios larvais e de pupa em machos e fêmeas de *C. sanguinea* alimentadas com o pulgão *A. gossypii* criados em algodoeiro GM expressando a toxina Cry1Ac e algodoeiro não GM.

Estágios	Tratamentos			
	Exposição à Cry1Ac via consumo de pulgões criados em algodoeiro GM		Não exposição à Cry1Ac via consumo de pulgões criados em algodoeiro não-GM	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
1°	2,91 ± 0,70a	2,63 ± 0,48a	2,62 ± 1,07a	2,94 ± 1,02a
2°	1,96 ± 0,6a	2,15 ± 0,74a	2,29 ± 0,73a	2,27 ± 0,65a
3°	2,79 ± 1,65a	2,31 ± 1,21a	2,07 ± 0,78a	2,11 ± 0,56a
4°	4,83 ± 1,54a	4,26 ± 1,64a	4,83 ± 1,37a	4,38 ± 1,73a
Pupa	5,00 ± 0,83a	5,27 ± 1,67a	5,08 ± 1,21a	4,66 ± 1,71a

A análise estatística foi feita para cada ínstar separadamente comparando-se indivíduos do mesmo sexo de tratamentos distintos. Valores expressos em média ± desvio padrão, letras iguais na mesma linha representam diferença não significativa entre os tratamentos comparados.

1° ínstar (Machos): Mann – Whitney T = 207; n(controle) = 24, n(teste) = 24, P = 0.096;

2° ínstar (Machos): Mann – Whitney T = 210,5; n(controle) = 24, n(teste) = 24, P = 0.112;

3° ínstar (Machos): Mann – Whitney T = 229,5; n(controle) = 24, n(teste) = 24, P = 0.111;

4° ínstar (Machos): Mann – Whitney T = 786,5; n(controle) = 24, n(teste) = 24, P = 0.950;

1° ínstar (Fêmeas): Mann – Whitney T = 150,5; n(controle) = 18, n(teste) = 19, P = 0.534;

2° ínstar (Fêmeas): Mann – Whitney T = 143,5; n(controle) = 18, n(teste) = 19, P = 0.412;

3° ínstar (Fêmeas): Mann – Whitney T = 167,5; n(controle) = 18, n(teste) = 19, P = 0.927;

4° ínstar (Fêmeas): Mann – Whitney T = 786,5; n(controle) = 18, n(teste) = 19, P = 0.932

Mortalidade larval, pupal e curva de sobrevivência: Não houve diferença nas taxas de mortalidade entre os tratamentos. Larvas criadas em pulgões alimentados em plantas de algodoeiro Bt apresentaram uma taxa de mortalidade de 18,11%, enquanto que as larvas criadas no controle (pulgões alimentados em algodoeiro não Bt) tiveram uma taxa de mortalidade de 15,09%.

As curvas de sobrevivência encontradas para as duas populações de *C. sanguinea* apresentaram com formato de curva Tipo II (Figura 1).

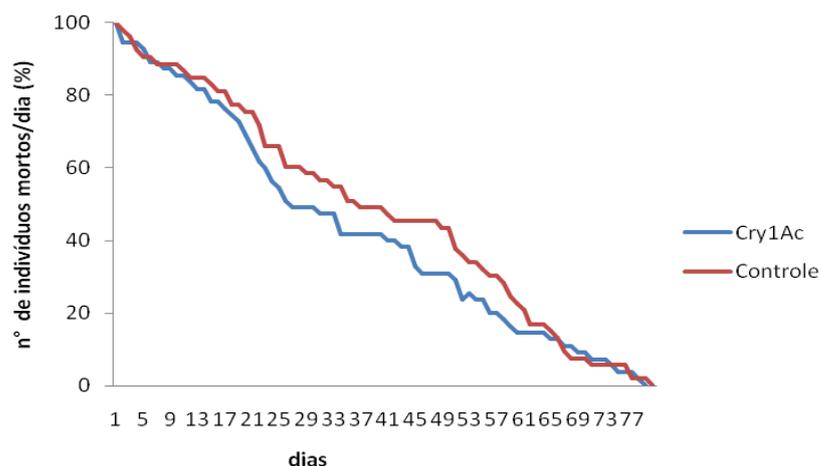


Figura 1: Curva de sobrevivência de larvas de *C. sanguinea* expostas à toxina Cry1Ac do *B. thuringiensis* via consumo de pulgões criados em algodoeiro GM (linha azul) e de larvas de *C. sanguinea* não expostas à Cry1Ac via consumo de pulgões criados em algodoeiro não-GM (linha vermelha).

Consumo Larval: O consumo médio diário de pulgões por larvas de *C. sanguinea* foi semelhante nos dois tratamentos, não apresentando diferença significativa no total de presas ingeridas, 646 ± 21 (média \pm erro padrão) pulgões ingeridos por larvas expostas a Cry1Ac e 621 ± 27 pulgões ingeridos no controle. (Mann – Whitney T = 54; n(controle) = 12, n(teste) = 11; P = 0.479).

O número de pulgões consumidos diariamente por *C. sanguinea* foi similar entre os indivíduos expostos à toxina Cry1Ac do *B. thuringiensis* via consumo de pulgões criados em algodoeiro GM e de larvas de *C. sanguinea* não expostas à Cry1Ac via consumo de pulgões criados em algodoeiro não-GM (Figura X).

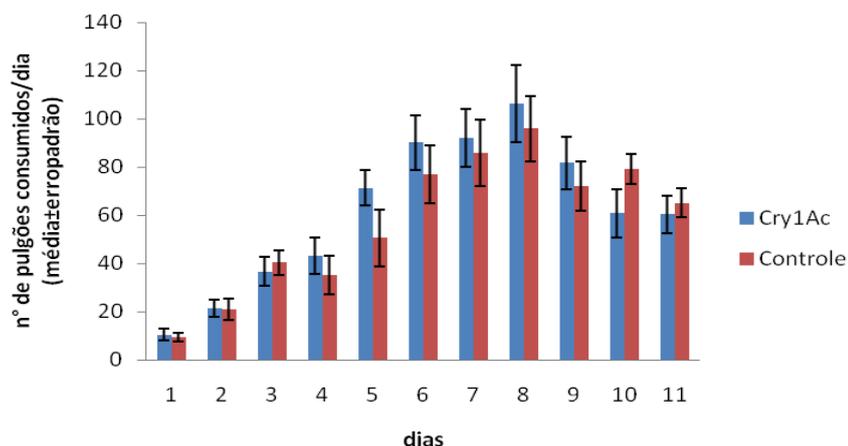


Figura 2: Quantidade de pulgões consumidos diariamente por *C. sanguinea* durante os primeiros onze dias do ciclo larval nos tratamentos controle e com exposição à toxina Cry1Ac. Valores expressos em média \pm erro padrão

Tamanho dos adultos: *C. sanguinea* após a emergência apresentou em média uma massa corporal de $10,5 \pm 4,6$ mg no tratamento com exposição a Cry1Ac e $11 \pm 4,8$ mg quando não expostas, não havendo diferença significativa entre os pesos (Mann-Whitney, $T = 2519,000$; $P = 0,304$).

Longevidade dos Adultos: A longevidade média dos adultos de *C. sanguinea* no controle foi $33,60 \pm 21,35$ dias. Quando expostas à Cry1Ac via alimentação em pulgões criados em algodoeiro Bt os adultos apresentaram longevidade média de $26,78 \pm 16,67$ dias, não diferindo significativamente do tratamento controle (Mann-Whitney, $T = 678,5$; $n(\text{controle}) = 43$ $n(\text{teste}) = 39$, $P = 0,090$).

Fecundidade e Fertilidade: O número médio de ovos por fêmea, bem como a fertilidade dos ovos não diferiu significativamente entre as fêmeas expostas à toxina Cry1Ac e as não expostas (Tabela 4). As fêmeas não expostas à toxina apresentaram $60,69 \pm 27,03\%$ de ovos eclodidos, enquanto que para as fêmeas expostas à Cry1Ac foi observado $48,21 \pm 25,63\%$ de ovos férteis. No entanto esses valores não diferiram significativamente quando comparados estatisticamente (Tabela 4).

Tabela 4: Fecundidade e viabilidade dos ovos de *C. sanguinea* alimentada durante a fase larval e adulta com o pulgão *A. gossypii* criados em algodoeiro GM expressando a toxina Cry1Ac e algodoeiro não GM.

	Nº médio de ovos/fêmeas ¹	Nº médio de ovos eclodidos ²	Viabilidade (%)
Exposição à Cry1Ac	$103,18 \pm 60,63a$	$57,01 \pm 49,13a$	$48,21 \pm 25,63$
Sem exposição à Cry1Ac	$82,40 \pm 67,14a$	$54,40 \pm 48,93a$	$60,69 \pm 27,03$

Valores expressos em média \pm desvio padrão, letras iguais na mesma linha representam diferença não significativa entre os tratamentos comparados.

¹ Mann-Whitney $T = 63,5$; $n(\text{controle}) = 12$ e $n(\text{teste}) = 14$; $P = 0,30$.

² Mann-Whitney $T = 176,0$; $n(\text{controle}) = 12$ e $n(\text{teste}) = 14$; $P = 0,714$

Discussão

Protocolo de Bioensaio Tritrófico

O protocolo experimental desenvolvido para avaliar efeitos da toxina Cr1Ac sobre o predador *C. sanguinea* via interação tritrófica (planta-presa-predador), mostrou-se satisfatório para esse tipo de teste, permitindo que mais de 70% dos indivíduos criados chegassem à fase adulta.

Para realização desse experimento foi necessário um elevado número de pulgões, seja para detecção da toxina ou para alimentação das larvas e adultos nas colônias e no próprio experimento. Manipulação diária das colônias de joaninhas e pulgões (limpeza de gaiolas e troca de alimento) é necessária para a obtenção freqüente de predadores e presas com a mesma idade. Sendo assim, é importante a otimização dos métodos de criação para manter alta a produção de insetos e dessa maneira tornar possível a montagem de um número maior de repetições na mesma data.

Quanto à manutenção das repetições é importante ter cuidados especiais com a manipulação dos predadores a fim de evitar fugas e perda de dados. As pupas e as posturas devem receber tratamento diferencial porque não podem ser transferidas do local, são geralmente de difícil visualização e são mais frágeis que os demais estágios.

Nesse trabalho buscamos aproximar as condições dos bioensaios àquelas que os organismos encontrariam em campo, ou seja, criamos o predador *C. sanguinea* com a presa (*Aphis gossypii*) alimentando-se em plantas de algodoeiro contendo até 6 folhas verdadeiras. Isso porque o pulgão *A. gossypii* é uma das presas de *C. sanguinea* mais freqüente em algodoeiros no início do ciclo da cultura (FARIA et al., 2006). Dessa maneira, as condições de exposição da joaninha às toxinas expressas nas folhas do algodoeiro Bt foram repetidas em laboratório.

Nesse tipo de bioensaio (exposição tritrófica), é muito importante a quantificação da toxina nas plantas e nas presas para confirmação das rotas de exposição (HILBECK et al., 2006). A quantidade de toxina Cry1Ac detectada no tecido foliar dos diferentes nódulos do extrato vertical condiz com os valores detectados em algodoeiro Bt por outros autores na literatura científica. (TORRES e RUBERSON, 2007; ZHANG et al., 2006). A partir da detecção, constatou-se que não há diferença significativa no nível da toxina entre os quatro nódulos do extrato vertical foliar do algodoeiro GM. Além disso, para confirmar a exposição, a proteína Cry1Ac foi quantificada também no pulgão, sendo detectados traços da toxina nos pulgões e floema. Desse modo é possível inferir que a toxina Cry1Ac se move através de níveis tróficos no sistema algodoeiro GM, pulgão e joaninha, e que *C. sanguinea* esteve exposta à toxina durante todo o período de realização do experimento via predação em pulgões alimentados em qualquer extrato da planta de algodão.

Efeito da proteína Cry1Ac sobre o predador C. sanguinea

Não foi observado nenhum efeito direto da Cry1Ac na bionomia de *C. sanguinea*. Não houve retardo no desenvolvimento larval e de pupa entre as larvas criadas em algodoeiro GM e convencional, no entanto o tempo de desenvolvimento larval em ambos tratamentos foi maior ($12 \pm 2,67$ dias com exposição a Cr1Ac e $11,67 \pm 1,84$ dias) quando comparado com *C. sanguinea* alimentada com *Schizaphis graminum* e *Cinara atlantica*, em que a duração do estágio larval foi de 8,4 e $9,04 \pm 0,08$ dias respectivamente (SANTA CECILIA et al., 2001, OLIVEIRA et al., 2004). Para o período de pupa o tempo de desenvolvimento foi semelhante a estudos com outras espécies de afídeos (MICHAUD, 2000.)

A explicação para tais valores na duração larval pode está ligada a dieta composta por apenas um item alimentar, já que nas condições de campo os coccinelídeos consomem uma dieta variada, que é constituída principalmente de afídeos, mas também podem consumir ácaros, ovos e estágios iniciais de algumas larvas de Lepidoptera e Coleoptera. Além disso, esses predadores apresentam hábito fitófago, se alimentando de pólen e néctar (HODEK,1996).

No entanto o consumo de pulgões por dia foi semelhante entre os indivíduos criados em algodoeiro GM e convencional. O número total de pulgões consumidos foi semelhante aquele registrado para os indivíduos de *C. sanguinea* alimentados com o pulgão-verde, *S. graminum*, que predaram em média $609,4 \pm 4,1$ pulgões durante a fase larval (SANTA CECÍLIA et al., 2001).

Na reprodução não foi observado nenhum efeito negativo da alimentação em algodoeiro GM. Nakasu et al. (2006) verificaram que 30% das fêmeas expostas a alta concentração de Cry1Ac não realizaram oviposição. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhang et al. (2006), os autores observaram que *P. japonica* diminui o número de oviposições quando alimentada com *A. gossypii* em algodoeiro GM (GK-12 e NuCOTN 33B).

Em geral, não foi observado nenhum efeito tóxico significativo em *C. sanguinea* via exposição tritrófica. Porém, foi verificado que os indivíduos criados no sistema com algodoeiro GM apresentaram viabilidade de ovos 12 % menor que os indivíduos criados no algodoeiro convencional. A ausência de diferenças significativas para esses resultados podem estar relacionada com o baixo número de repetições ou ainda a uma variabilidade natural do predador *C. sanguinea*.

Efetitos diretos de organismos GM não têm sido encontrados em Coccinellidae, mesmo quando expostos em vias de exposição tritrófica. Para *Coleomegila maculata* (Coleoptera:Coccinellidae) também não foi encontrado nenhum efeito sobre a reprodução, quando o predador foi criado com o pulgão do milho alimentando-se em plantas expressando a toxina Cry3Bb1.(LUNDGREN e WIEDENMANN, 2005).

Portanto não se conhece ao certo quais os possíveis efeitos sobre a população de *C. sanguinea* em campo, conseqüentemente avaliações em escala maior devem ser realizadas e também

exposições através de bioensaios onde gerações sucessivas do predador sejam criadas em presas sobre plantas Bt para verificar os possíveis efeitos dessas toxinas em longo prazo.

Referências

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BROWN, D.; ROTHERY, P. **Models in biology: mathematics, statistics and computing**. New York: John Wiley & Sons, 1993.

CATTANEO, M. G.; YAFUSO, C.; SCHMIDT, C.; HUANG, C. Y.; RAHMAN, M.; OLSON, C.; ELLERS-KIRK, C.; ORR, B. J.; MARSH, S. E.; ANTILLA, L.; DUTILLEUL, P.; CARRIÈRE, Y. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 20, p. 7571-7576, 2006.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf. Acesso em: 23 out. 2008.

CROWTHER, J. R. **ELISA theory and practice**. New Jersey: Humana Press, 1995. (Methods in Molecular Biology, 42).

FARIA, M. R. de; LUNDGREN, J. G.; FONTES, E. M. G.; FERNANDES, O. A.; SCHMIDT, F.; VAN TUAT, N.; ANDOW, D. Assessing the effects of *Bt* cotton on generalist arthropod predators In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G.; KAPUSCISKI, A. R.; SCHEI, P. J. (Ed.). **Methodologies for assessing *Bt* cotton in Brazil**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2006. p. 175-199. (Environmental risk assessment of genetically modified organisms series, 2).

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATIST, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCHINI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Ceres, 2002. 486p.

GONDIM, D. M. C; BELOT, J. L.; SILVIE, P.; PETIT, N. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. 3. ed. Cascavel, PR: COODETEC, 2001. 120p.

HAGEN, K. S. Biology and ecology of Predaceous Coccinellidae. **Annual Reviews of Entomology**, Stanford, US, v. 7, p. 289-326, 1962.

HAMMER, O. **PAST: Paleontological Statistics: reference manual**. Version 1.92. Oslo: University of Oslo, 1999-2009.

HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; ARPAIA, S.; BIRCH, A. N. E.; FONTES, E. M. G.; LÖVEI, G. L.; SUJII, E. R.; WHEATLEY, R. E.; UNDERWOOD, E. Methodology to support non-target and biodiversity risk assessment. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G.; KAPUSCISKI, A. R.; SCHEI, P. J. (Ed.). **Methodologies for assessing *Bt* cotton in Brazil**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2006. p. 108-132. (Environmental risk assessment of genetically modified organisms series, 2)

HODEK, I.; HONEK, A. **Ecology of *Coccinellidae***. Dordrecht, Holanda: Kluwer: Academics, 1996. 464 p.

- KING, R. W.; ZEEVAART, J. A. D. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. **Plant Physiology**, Minneapolis, US, v. 53, p. 96-103, 1974.
- LUNDGREN, J. G.; WIEDENMANN, R. N. Tritrophic interactions among *Bt* (Cry3Bb1) corn, aphid prey, and the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 34, n. 6, p. 1621-1625, 2005.
- MEN, X.; GE, F.; LIU, X.; YARDIM, E. N. Diversity of arthropod communities in transgenic *Bt* cotton and nontransgenic cotton agroecosystems. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 32, n. 2, p. 270-275, 2003.
- MICHAUD, J. P. Development and reproduction of Ladybeetles (Coleoptera: Coccinellidae) on the Citrus Aphids *Aphis spiraecola* Patch and *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Biological Control**, Orlando, US, v. 18, p. 287-297, 2000.
- NAKASU, E. Y. T.; DIAS, S. C.; PIRES, C. S. S.; TOGNI, P. H. B.; AYRES, K. F.; SILVA, I. S.; MACEDO, T. R.; GROSSI DE SÁ, M. F.; SUJII, E. R.; FONTES, E. M. G. **Protocolo para avaliação dos efeitos de proteínas tóxicas a insetos-praga sobre o predador *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 1676-1340. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 155).
- NARANJO, S. E. Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 34, n. 5, p. 1193-1210, 2005.
- OBRIST, L. B.; DUTTON, A.; ALBAJES, R.; BIGLER, F. Exposure of arthropod predators to Cry1Ab toxin in *Bt* maize fields. **Ecological Entomology**, London, GB, v. 31, p. 143-154, 2006.
- OLIVEIRA, N. C.; WILCKEN, C. F.; MATOS, C. A. O. ciclo biológico e predação de três espécies de Coccinélídeos (Coleóptera, Coccinellidae) sobre o pulgão-gigante-do-pinho *Cinara atlantica* (Wilson) (Hemiptera, Aphididae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 529-533, 2004.
- PERLAK, F. J.; STONE, T. B.; MUSKOPF, L. J.; PETERSEN, G. B.; PARKER, S. A.; MCPHERSON, J. W.; LOVE, G.; REED, G.; BIEVER, D.; FISCHHOFF. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, NL, v. 22, p. 313-321, 1993.
- PRAÇA, L. B.; RAMOS, F. R.; OLIVEIRA, F. W. de; SOARES, C. M.; SUJII, E. R.; MONNERAT, R. G. **Avaliação da susceptibilidade da *Plutella xylostella* (traça das crucíferas) a produtos a base de *Bacillus thuringiensis* e deltametrina em cultivo de repolho no Distrito Federal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 176).
- ROMEIS, J.; MEISSE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, US, v. 24, n. 1, p. 63-71, 2006.
- SANTA CECÍLIA, L. V. C.; GONÇALVES, G. R. C. R.; TÔRRES, R. M. S.; NASCIMENTO, F. R. Aspectos biológicos e consumo alimentar de larvas de *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) alimentadas com *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 25, n. 6, p. 1273-1278, 2001.
- SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. **Annual Reviews of Entomology**, Stanford, US, v. 47, p. 845-881, 2002.

SUJII, E. R.; BESERRA, V. A.; RIBEIRO, P.H.; SILVA SANTOS, P. V. da; PIRES, C. S. S.; SCHMIDT, F. G. V.; FONTES, E. M. G.; LAUMANN, R. A. Comunidade de inimigos naturais e controle biológico natural do pulgão, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) e do Curuquerê, *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodoeiro no Distrito Federal. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 329-336, 2007.

SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; ONOYAMA, F. F.; ÁVILA, D.; PINHEIRO, E. M.; PORTILHO, T.; SCHMIDT, F. G. V.; FARIAS, M. R. Impacto da aplicação de inseticidas na ocorrência de insetos naturais em plantio de algodão, na região do Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Algodão: um mercado em evolução: anais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Embrapa Algodão. Documentos, 118).

TORRES, J. B.; RUBERSON, J. R. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. **Transgenic Research**, London, GB, v. 17, n. 3, p. 345-354, 2007.

ZHANG, G. F.; WAN, F. H.; LÖVEI, G. L.; LIU, W. X.; GUO, J. Y. Transmission of *Bt* toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feedins on transgenic *Bt* cotton. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 35, n. 1, p. 143-150, 2006.