

MAURICÉLIA FERREIRA ALMEIDA LARANJEIRAS

**COMPORTAMENTO ALIMENTAR E CRESCIMENTO POPULACIONAL  
DE FITOSSUCCÍVOROS EM PLANTAS Bt OU SUBMETIDAS A  
HERBIVORIA POR LAGARTA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A447c  
2016

Laranjeiras, Mauricélia Ferreira Almeida, 1981-  
Comportamento alimentar e crescimento populacional de  
fitossuccívoros em plantas Bt ou submetidas a herbivoria por  
lagarta / Mauricélia Ferreira Almeida Laranjeiras. – Viçosa, MG,  
2016.

x, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Inseto - Comportamento. 2. Inseto - Alimentos. 3. Plantas  
transgênicas. 4. Relação inseto-planta. 5. *Rhopalosiphum padi*.  
6. *Bemisia tabaci*. 7. *Spodoptera frugiperda*. 8. *Rhopalosiphum*  
*maidis*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.7

MAURICÉLIA FERREIRA ALMEIDA LARANJEIRAS

**COMPORTAMENTO ALIMENTAR E CRESCIMENTO POPULACIONAL  
DE FITOSSUCCÍVOROS EM PLANTAS Bt OU SUBMETIDAS A  
HERBIVORIA POR LAGARTA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de Fevereiro de 2016.

---

Haddi Khalid

---

Raul Narciso Carvalho Guedes

---

Alberto Fereres Castiel

---

Eugênio Eduardo de Oliveira  
(Coorientador)

---

Eliseu José Guedes Pereira  
(Orientador)

A meu esposo Rafael por todo incentivo, carinho e companheirismo. A meus pais Osmar e Neci pelos ensinamentos, exemplo de vida e apoio incondicional.

A meus irmãos Giniomar, Gilmária, Mauridéia, Marcelle e Mariana, por sempre torcerem por mim e se alegrarem com minhas vitórias.

Dedico.

**“Graças, porém, a Deus que em Cristo  
sempre nos conduz em triunfo, e, por meio de  
nós, manifesta em todo lugar a fragrância do  
seu conhecimento”**

*(II Coríntios 2:14)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui, por tudo o que tens feito e por tudo que vais fazer, pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

A minha família que é a base da minha vida.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realizar o doutorado neste programa de pós-graduação.

A Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela liberação para realizar o curso de doutorado.

Ao Prof. Eliseu por ter aceito me orientar durante estes quatro anos.

Ao Prof. Eugênio pela co-orientação, apoio e ajuda nesta jornada.

Ao Dr. Alberto por todo ensinamento e atenção durante o período que estive colaborando com sua equipe de trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Interação Inseto-Planta pela amizade e excelente convivência durante esse período.

Aos colegas do Laboratório de Insetos Vetores de Patógenos de Plantas pela amizade, ensinamentos, paciência e ótima convivência.

Aos amigos da Primeira Igreja Batista de Viçosa (PIBV), em especial ao pastor Sérgio e sua esposa Ângela pela amizade e apoio em todos momentos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
Introdução geral .....	1
Objetivos da investigação .....	3
Objetivo geral .....	3
Objetivos específicos.....	3
REFERENCIAS.....	5
<b>Capítulo 1: Efeitos transgeracionais de milho Bt Cry1Ab e Cry1F no comportamento alimentar e desempenho demográfico do pulgão <i>Rhopalosiphum padi</i>.....</b>	<b>8</b>
RESUMO .....	8
INTRODUÇÃO .....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
Insetos e plantas .....	10
Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar .....	11
Efeito do milho Bt no desempenho demográfico de <i>R. padi</i> .....	13
Análises estatísticas.....	14
RESULTADOS .....	15
Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar .....	15
Efeito do milho Bt no desempenho demográfico de <i>R. padi</i> .....	16
DISCUSSÃO .....	17
Figuras de Resultados do Captítulo 1.....	21
REFERÊNCIAS.....	24
<b>Capítulo 2: Herbivoria por <i>Spodoptera frugiperda</i> em milho afeta o comportamento alimentar e desempenho demográfico do pulgão <i>Rhopalosiphum maidis</i>?.....</b>	<b>30</b>
RESUMO .....	30
INTRODUÇÃO .....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Insetos e plantas .....	33
Experimentos .....	33
Quantificação de Inibidores de Proteases.....	34
Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar.....	34
Desempenho de <i>R. maidis</i> em plantas de milho danificadas por <i>S. frugiperda</i> .....	36
Análises estatísticas.....	37
RESULTADOS .....	37
Quantificação de inibidores de proteases .....	37
Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar .....	37

Desempenho de <i>R. maidis</i> em plantas de milho danificadas por <i>S. frugiperda</i> .....	38
DISCUSSÃO .....	39
Tabelas e Figura de Resultados do Capítulo 2.....	41
REFERÊNCIAS.....	44
<b>Capítulo 3: Soja Bt Cry1Ac Favorece o Crescimento Populacional de <i>Bemisia tabaci</i></b> ..	49
RESUMO .....	49
INTRODUÇÃO .....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
Insetos e plantas .....	52
Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar .....	52
Efeito da soja Bt no desempenho de <i>B. tabaci</i> .....	54
Análise estatística.....	55
RESULTADOS .....	56
Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar .....	56
Efeito da soja Bt no desempenho de <i>B. tabaci</i> .....	56
DISCUSSÃO .....	57
Tabelas e Figura de Resultados do Capítulo 3.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	66

## RESUMO

LARANJEIRAS, Mauricélia Ferreira Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Comportamento alimentar e crescimento populacional de fitossuccívoros em plantas Bt ou submetidas a herbivoria por lagarta.** Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.

Embora altas infestações por insetos fitossuccívoros em cultivos de plantas Bt ocorram com frequência, estudos sobre as possíveis causas do fenômeno tem recebido relativamente pouca atenção. Aqui foi avaliado o comportamento alimentar e o desempenho demográfico de insetos fitossuccívoros em milho e soja Bt, e em plantas de milho submetidas a herbivoria por lagarta. Em milho Bt, foi avaliado o efeito de plantas expressando as toxinas Cry1Ab ou Cry1F em dez gerações do pulgão *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphidae). Na interação entre herbívoros de guildas diferentes, mediada por uma cultivar de milho, testou-se a hipótese de que a herbivoria por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) afeta o pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphidae). Em soja Bt, *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) foi estudada em plantas expressando a toxina Cry1Ac. Variáveis do desempenho demográfico e comportamento alimentar de *R. padi* mostraram que o inseto foi negativamente afetado quando exposto ao milho Bt Cry1Ab ao longo do tempo. Por outro lado, em milho Cry1F o pulgão produziu maior número de ninfas ao longo do tempo, mas a taxa intrínseca de crescimento populacional foi inalterada ao longo das gerações e em relação ao milho não-Bt. Isto indica que os milhos Cry1Ab e Cry1F não devem facilitar os pulgões *R. padi* a tornarem-se pragas mais importantes economicamente por não aumentarem o crescimento populacional do inseto. O estudo da interação entre herbívoros de guildas diferentes em plantas de milho demonstrou que apesar de larvas de *S. frugiperda* induzirem inibidores de protease, a herbivoria prévia pelas lagartas não afetou negativamente o desempenho e comportamento alimentar de *R. maidis*. Para a mosca branca, as taxas de crescimento populacional ( $R_0$  e  $r_m$ ) deste inseto na soja Bt foram maiores do que na soja não-Bt, mostrando que a variedade de soja Cry1Ac favorece o crescimento populacional de *B. tabaci*. Além disso, registros de comportamento alimentar pelo *Electrical Penetration Graph* mostraram maior tempo de salivação e de ingestão do floema associados à alimentação de *B. tabaci* na soja

Bt, o que indicam maior probabilidade de *B. tabaci* alimentando-se na soja Bt transmitirem vírus fitopatogênico. Em conclusão, os resultados deste trabalho mostram que os milhos Cry1Ab e Cry1F não favorece o crescimento populacional nem o comportamento alimentar de *R. padi*, o que implica que não devem facilitar pulgões a tornarem-se pragas mais importantes economicamente em cultivos de milho de uma única toxina Bt. Por outro lado, a soja Cry1Ac testada aumentou as taxas de crescimento populacional de *B. tabaci* e o inseto apresentou maior tempo de salivacão e de ingestão do floema, o que pode levar a altas infestações e aumentar o risco de transmissão de fitovirose, mas isto deve ser testado em outras variedades de soja. Por fim, não houve interferência entre *S. frugiperda* e *R. maidis* quando a lagarta é primeiro fitófago na planta e este estudo é um primeiro passo para um melhor entendimento da interação entre herbívoros de guildas diferentes em milho, sendo que esta linha de pesquisa merece futuros esforços.

## ABSTRACT

LARANJEIRAS, Mauricélia Ferreira Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Feeding behavior and population growth of phytosuccivorous insects on Bt plants or subjected to caterpillar herbivory.** Advisor: Eliseu José Guedes Pereira. Co-Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira.

Although high infestations by sucking insects in some Bt crops often occurs, studies on mechanistic causes of the phenomenon has received relatively little attention. Here it was assessed the feeding behavior and demographic performance of sucking insects, on Bt maize and soybean, as well as on maize plants previously fed by caterpillars. On Bt maize, the effects of plants producing Cry1Ab or Cry1F toxins were studied over ten generations of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphidae). The interaction between herbivores of different guilds, mediated by a maize plant was also studied to test whether previous herbivory by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae indirectly affected the aphid *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphidae). On Bt soybean, the effect of a Cry1Ac-producing variety was studied on *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). Demographic performance and feeding behavior of *R. padi* aphids showed that this insect was adversely affected when exposed to Cry1Ab maize over time. Conversely, on the Cry1F maize, the aphids produced more nymphs over time, but the intrinsic rate of population increase was unchanged over the generations and in relation to non-Bt maize. This indicates that Cry1Ab and Cry1F maize should not facilitate the aphids *R. padi* to become more economically important pests by not increasing its population growth on the plants. The study of the interaction between herbivores of different guilds on maize plants showed that in spite of induction of protease inhibitors by *S. frugiperda* larvae, the prior herbivory by the caterpillars did not negatively affected the performance and feeding behavior of *R. maidis*. For the whitefly, population growth rates ( $R_o$  and  $rm$ ) of this insect were higher on Bt than on non-Bt soybeans, showing that the Bt soybean variety favors the population growth of *B. tabaci*. In addition, records of feeding behavior in *Electrical Penetration Graphs* showed increased salivation and ingestion of phloem associated with *B. tabaci* feeding on soybean Bt, which indicates a higher risk of *B. tabaci* feeding on soybean Bt to transmit phytopathogenic viruses. In conclusion, this study

shows that Cry1Ab or Cry1F maize did not favor the population growth or the feeding behavior of *R. padi*, which do not facilitate aphids to become more economically important pests in single-toxin Bt maize. On the other hand, the Cry1Ac soybean tested increased population growth rates of *B. tabaci* and the insect showed increased salivation and ingestion of phloem, which can lead to higher infestations and increased risk of fitovirus transmission, but this should be tested in other soybean varieties. Finally, there was no competition between *S. frugiperda* and *R. maidis* when the caterpillar was the first herbivore on the plant, and this study is a first step for a better understanding of the interaction between herbivores of different guilds in maize, which deserves future research efforts.

## Introdução geral

Culturas geneticamente modificadas expressando genes Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) são amplamente utilizadas para controlar os principais insetos-praga e são um importante componente do manejo integrado de pragas (Romeis et al., 2006; Romeis et al., 2008) apresentando grande destaque no cenário agrícola mundial. A área cultivada global com variedades transgênicas tem aumentado mais de cem vezes, de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 181,5 milhões de hectares em 2014, isto torna as cultivares transgênicas a tecnologia agrícola mais adotada nos últimos tempos (James, 2014). Em 2014, o Brasil ficou em segundo lugar, perdendo somente para os Estados Unidos em área cultivada com transgênicos no mundo, com 42,2 milhões de hectares.

Em geral, as culturas Bt apresentam boa eficácia contra suas pragas-alvo pelo menos inicialmente (Carrière et al., 2010; Pinto et al., 2014; Carrière et al., 2015). O uso de cultivos transgênicos que expressam proteínas inseticidas Bt tornou-se o principal método de controle de algumas pragas (Sanahuja et al., 2011), que beneficiou tanto os produtores na proteção das culturas quanto o ambiente pela redução no uso de inseticidas de amplo espectro de ação (Stokstad & Grullon, 2013). Porém, mesmo em plantas modificadas geneticamente, alguns artrópodes continuam a ser uma ameaça constante para a produção agrícola.

Apesar da ocorrência de altas infestações por insetos fitossuccívoros em alguns cultivos de plantas Bt, geralmente eles têm sido negligenciados na investigação. Mudanças na qualidade nutricional devido aos efeitos indesejados da transgenia pode resultar em efeitos imprevisíveis. Assim, plantas Bt podem não afetar, favorecer ou afetar negativamente densidades populacionais de insetos fitófagos não-alvo (Kim et al., 2012). Herbívoros secundários, que antes eram pouco importantes, podem agora encontrar condições favoráveis nas plantas Bt e se tornarem grandes pragas (Lu et al., 2010), minando alguns dos benefícios econômicos e ecológicos de plantas Bt.

Insetos fitossuccívoros como pulgões e moscas brancas têm sido relatados causando problemas consideráveis em lavouras de milho e soja, respectivamente (Marubayashi et al., 2010; Dedryver et al., 2010; Suekane et al., 2013; Hooks &

Fereres, 2006). Estes insetos causam danos diretos e indiretos nas plantas por sugarem nutrientes da seiva do floema e serem vetores de viroses (Fernandes & Cruz, 2009; Ragsdale et al., 2011; De Barro et al., 2011, Inoue-Nagata et al., 2016). Um total de 227 espécies de afídeos, dos 288 testados, podem transmitir vírus as plantas. A maior parte dessas espécies de vetores pertence à subfamília Aphidinae, que inclui os gêneros *Aphis*, *Myzus* e *Macrosiphum* (Eastop, 1983). No caso de moscas brancas, 1300 espécies têm sido descritas, mas somente quatro espécies (*Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *T. abutilonea* e *T. ricini*) foram encontradas transmitindo vírus às plantas (Jones, 2003).

Além dos efeitos de plantas Bt em insetos fitossuccívoros, outro fator importante a ser considerado são as interações mediadas por plantas entre insetos herbívoros, especialmente aqueles de guildas diferentes. Os insetos mastigadores causam grandes danos mecânicos aos tecidos das plantas e induzem o sistema de defesa de forma diferente dos insetos sugadores de seiva, que geralmente se alimentam de uma forma mais delicada (Walling, 2000). Isto pode resultar em interação negativa (competição) ou positiva (facilitação) entre esses insetos (Ali & Agrawal, 2014). Em milho permanece pouco explorado como a resposta de um inseto mastigador impacta fitófagos de outra guilda, por exemplo, um inseto sugador.

Para estudar o comportamento alimentar de insetos sugadores, a técnica do EPG (*Electrical Penetration Graph*) tem sido bastante empregada. Esta técnica foi originalmente idealizada em 1964 nos Estados Unidos por McLean e Kinsey, para detectar quando, onde e como um hemíptero insere seus estiletos em tecidos vegetais e como executa o comportamento dentro deles. Pela primeira vez os cientistas puderam objetivamente observar a localização e comportamento alimentar desses insetos, independente das bainhas salivares ou danos na planta. O princípio e método são simples e têm sido extensivamente revisado (Backus & Bennett, 2009; Adasme-Carreño et al., 2015). A técnica consiste em incorporar o inseto e a planta em um circuito elétrico acoplado a um sistema de medição e um computador, assemelhando-se a um eletrocardiograma. No momento em que o inseto insere os estiletos dentro do tecido vegetal, o circuito é fechado e ocorre uma variação de voltagem que produz tipos de ondas e padrões que correspondem à localização e atividade dos estiletos (ingestão ou salivação) dentro da planta.

Dessa forma, este trabalho de tese visou estudar o comportamento alimentar, por meio da técnica do EPG, e o desempenho demográfico de fitossuccívoros em plantas Bt ou submetidas a herbivoria por lagarta. Os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento do comportamento alimentar e desempenho de insetos sugadores (pulgão e mosca branca), em plantas expressando toxinas Bt. Além disso, contribui para o entendimento da interação mediada por uma cultivar de milho entre herbívoros de guildas diferentes (*Spodoptera frugiperda* e *Rhopalosiphum maidis*).

## **Objetivos da investigação**

### **Objetivo geral**

Avaliar o comportamento alimentar e o desempenho demográfico de fitossuccívoros em plantas Bt ou submetidas a herbivoria por lagarta.

### **Objetivos específicos**

- 1) Avaliar o comportamento alimentar e o desempenho demográfico de *Rhopalosiphum padi* em plantas de milho Bt, expressando as proteínas Cry1Ab e Cry1F.
- 2) Verificar se a alimentação por *Spodoptera frugiperda* em uma cultivar de milho altera o comportamento alimentar e o desempenho demográfico do pulgão *Rhopalosiphum maidis*.
- 3) Avaliar o comportamento alimentar e o desempenho demográfico de *Bemisia tabaci* Biótipo B em plantas de soja Bt, expressando a toxina Cry1Ac.

Para facilitar o entendimento, o presente trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro, intitulado “Efeitos transgeracionais no comportamento alimentar e desempenho demográfico do pulgão *Rhopalosiphum padi* em milho Bt Cry1Ab e Cry1F” foi estudado o comportamento alimentar do pulgão *R. padi*, por meio da

técnica do EPG (Electrical Penetration Graph), nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>5</sub> e F<sub>10</sub>, e o desempenho populacional deste pulgão medido nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>10</sub> para verificar se houve adaptação do pulgão às plantas ao longo das gerações. No segundo capítulo, “Herbivoria por *Spodoptera frugiperda* em milho afeta o comportamento alimentar e desempenho demográfico do pulgão *Rhopalosiphum maidis*?” foi estudada a interação entre esses herbívoros de guildas diferentes, mediada por uma cultivar de milho, para verificar se a herbivoria por *Spodoptera frugiperda* afeta negativamente o pulgão *Rhopalosiphum maidis*. No terceiro capítulo “Soja Bt Cry1Ac favorece o crescimento populacional de *Bemisia tabaci*” foi analisado o desempenho demográfico e o comportamento alimentar da mosca branca *Bemisia tabaci* Biótipo B na soja Bt Cry1Ac, utilizando a técnica do EPG, para verificar se essa variedade transgênica favorece o crescimento populacional de *B. tabaci* aumentando a probabilidade de transmissão de vírus fitopatogênico. Por fim, há uma seção com as considerações finais (conclusões) da tese.

## REFERENCIAS

- Adasme-Carreño, F.; Muñoz-Gutiérrez, C.; Salinas-Cornejo, J.; Ramírez, C.C. A2EPG: A new software for the analysis of electrical penetration graphs to study plant probing behaviour of hemipteran insects. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.113, p.128-135, 2015.
- Ali, J.G.; Agrawal, A.A. Asymmetry of plant-mediated interactions between specialist aphids and caterpillars on two milkweeds. **Functional Ecology**, p.1-9, 2014.
- Backus, E.A.; Bennett, W.H. The AC–DC Correlation Monitor: New EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing–sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, v.55, p.869-884, 2009.
- Carrière, Y.; Crowder, D.W.; Tabashnik, B.E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, v.3(5-6), p. 561–573. 2010.
- Carrière, Y.; Crickmore, N.; Tabashnik, B.E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v.33, p.161-168, 2015.
- Dicke, M.; van Loon, J.J.A.; Soler, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology**, v.5, p.317-324, 2009.
- De Barro, P.J.; Liu, S-S.; Boykin, L.M.; Dinsdale, A.B. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v.56, p.1-19, 2011.
- Dedryver, C-A.; Rale, A.L.; Fabre, F. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, p. 539–553, 2010.
- Eastop, V.F., 1983. The biology of the principal aphid virus vectors. In: Plumb, R.T., Thresh, J.M. (Eds.), *Plant Virus Epidemiology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 115–132.
- Fernandes, F.R.; Cruz, A.R.R. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, v.154, p.1567–1570, 2009.
- Hooks, C.R.R.; Fereres, A. Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses: A review on the use of barrier plants as a management tool. **Virus Research**, v.120, p.1-16, 2006.
- Inoue-Nagata, A.K.; Lima, M.F.; Gilberts, R.L. A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34(1), 2016.
- James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY. 2014

- Jones, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p: 195–219, 2003.
- Kim, Y.H.; Hwang, C.E.; Kim, T-S.; Lee, J-H.; Lee, S.H. Assessment of potential impacts due to unintentionally released Bt maize plants on non-target aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15(3), p. 443-446, 2012.
- Lu, Y.; Wu, K.; Jiang, Y.; Xia, B.; Li, P.; Feng, H.; Wyckhuys, K.A.G.; Guo, Y. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. **Science**, v.328, p.1151–1154, 2010.
- Marubayashi, J. M.; Yuki, V.A.; Wutke, E.B. Transmissão do *Cowpea mild mottle virus* pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B para plantas de feijão e soja. **Summa Phytopathology**, v.36(2), p.158-160, 2010.
- Ragsdale, D.W.; Landis, D.A.; Brodeur, J.; Heimpel, G.E.; Desneux, N. Ecology and management of the soybean aphid in North America. **Annual Review of Entomology**, v.56, p.375-399, 2011.
- Romeis, J.; Meissle, M.; Bigler, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, p.63–71, 2006.
- Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG. Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. **Spring Science+Business Media B.V.**, v.429, 2008.
- Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.M.; Capell, T.; Christou, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p.283–300, 2011.
- Stokstad, E.; Grullon, G. Infographic: pesticide planet. **Science**, v.341, p. 730–731, 2013.
- Suekane,R.; Degrande, P.E.; Lima Junior I.S.; Queiroz, M.V.B.M.; Rigoni, E.R. Danos da mosca-branca *Bemisia tabaci* (genn.) e distribuição vertical das ninfas em cultivares de soja em casa de vegetação. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.80(2), p.151-158, 2013.
- Pinto, L.M.N.; Ziegler, D.R.; Fiuza, L.M. 2014. The use of transgenic plants in insect control, pp. 319-329. In K. Sahayaraj [ed.], Basic and Applied Aspects of Biopesticides. DOI 10.1007/978-81-322-1877-7\_18, Springer India.
- Tabashnik, B.E.; Gassmann, A.J.; Crowder, D.W.; Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, p.199–202. 2008.
- Walling, L.L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.19, p.195–216, 2000.

Zarate, S.I.; Kempema, L.A.; Walling L.L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology**, v. 143, p.866–875, 2007.

# Capítulo 1: Efeitos transgeracionais de milho Bt Cry1Ab e Cry1F no comportamento alimentar e desempenho demográfico do pulgão

## *Rhopalosiphum padi*

### RESUMO

O uso de cultivos transgênicos expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tornou-se a principal ferramenta no manejo de alguns insetos-praga, porém a produção contínua de toxinas Bt em diversos tecidos vegetais pode afetar outros insetos fitófagos com consequências em seus níveis populacionais. Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento alimentar de *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) em plantas de milho Bt Cry1Ab e Cry1F, bem como verificar o efeito dessas plantas sobre a história de vida de *R. padi* ao longo de dez gerações. Usando a técnica *Electrical Penetration Graph* (EPG), o comportamento alimentar foi caracterizado em pulgões das gerações um (F<sub>1</sub>), cinco (F<sub>5</sub>) e dez (F<sub>10</sub>), sendo o desempenho populacional deles também medido nas gerações F<sub>1</sub> e F<sub>10</sub> para verificar se houve adaptação do pulgão às plantas ao longo das gerações. Não foi observada diferença significativa nos parâmetros demográficos e tempo de desenvolvimento de pulgões na geração F<sub>1</sub> entre as diferentes plantas testadas. Entretanto, os pulgões que permaneceram 10 gerações em milho Cry1Ab foram afetados negativamente em todos os parâmetros de desenvolvimento e reprodução com consequências nas taxas de crescimento populacional. Para o milho Cry1F, nenhuma diferença foi observada entre os pulgões da geração F<sub>10</sub> quando comparados ao controle, porém o número de ninfas produzidas foi maior no milho Bt Cry1F do que naquele que expressa Cry1Ab ao longo do tempo, mas a taxa intrínseca de crescimento populacional foi inalterada. No milho Cry1Ab, os registros de EPG demonstraram que *R. padi* na geração F<sub>1</sub> permaneceu por mais tempo alimentando-se no floema, sendo que resultado oposto foi observado na geração F<sub>10</sub>. No milho Cry1F foi observado comportamento alimentar similar aos pulgões mantidos no milho controle. Portanto, *R. padi* parece não ser beneficiado pela alimentação nos milhos Cry1Ab e Cry1F e cultivares com estes eventos transgênicos não devem estar contribuindo para ocorrência dos surtos populacionais deste inseto.

**Palavras-chave:** Sugador, praga secundária, monitoramento eletrônico.

## INTRODUÇÃO

O uso de variedades transgênicas na agricultura tornou-se a tecnologia agrícola mais rapidamente adotada nos últimos tempos. O número de países que cultivam plantas transgênicas passou de 6, em 1996, para 28, em 2014 (James, 2014). Os hectares plantados com transgênicos aumentaram em mais de 100 vezes, de 1,7 milhões de hectares em 1996, para mais de 181,5 milhões de hectares em 2014, com uma taxa anual de crescimento entre 3 a 4% (James, 2014).

A princípio as culturas Bt apresentam boa eficácia de controle de pragas-alvo (Carrière et al., 2010; Pinto et al., 2014; Carrière et al., 2015). Além disso, devido à toxicidade específica das toxinas Bt Cry, é geralmente aceito que qualquer eventual impacto prejudicial aos organismos não-alvos é menor do que aquele causado por inseticidas de largo espectro de ação (Cattaneo et al., 2006; Marvier et al., 2007; Areal & Riesgo, 2015). No entanto, é preciso ressaltar que a maioria dos trabalhos que investigaram os efeitos de plantas Bt em organismos não alvos tinham como foco os predadores ou parasitoides de herbívoros que se alimentavam das plantas transgênicas e somente alguns estudos mais recentes (Kim et al., 2012; Habustová et al., 2014; Catarino et al., 2015) tem investigado eventuais impactos desta tecnologia em pragas não-alvo.

Na cultura do milho, o benefício econômico associado à supressão da população de pragas chave, devido à utilização do milho Bt, é bastante significativa (Riesgo et al., 2012; Areal et al., 2013). Porém, pragas secundárias, que anteriormente tinham pouca importância relativa, podem agora encontrar condições favoráveis e se tornarem pragas mais importantes (Lu et al., 2010). Pulgões são insetos fitossuccívoros de ocorrência comum, e espécies do gênero *Rhopalosiphum* têm causado consideráveis perdas em lavouras de milho na Europa (Asín & Pons, 2001; Meissle et al., 2011) e também no Brasil (Pitta et al., 2007; Auad et al., 2009), sendo um problema fitossanitário cada vez maior (Krawczyk et al., 2006; Strażyński, 2008; Beres, 2011). *Rhopalosiphum padi* é uma espécie polífaga com distribuição em quase todo o mundo (Blackman & Eastop, 1984). Na Europa esta é a uma das espécies mais importantes nas plantações de cereais que afeta severamente a produção de milho. Nas plantas monocotiledôneas, eles sugam a seiva do tecido

foliar, e também são vetores de algumas viroses, tais como Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) (Gray & Gildow, 2003; Schliephake et al., 2013; Parizoto et al., 2013).

Algumas investigações prévias sugerem que pulgões podem apresentar melhor desempenho sobre plantas Bt do que em plantas não Bt (Kim et al. 2012; Pons et al. 2005; Faria et al. 2007), embora as razões disto ainda não são completamente compreendidas. Algumas hipóteses explicativas têm sido propostas: (i) redução na aplicação de inseticidas de amplo espectro; (ii) redução nas populações de inimigos naturais; e (iii) diminuição na competição interespecífica com pragas-alvo das plantas Bt (Catarino et al 2015). Lumbierres et al., (2004) propõe que os potenciais impactos de milho Bt nos insetos fitófagos não-alvo podem ser diretos (pela toxina Bt), indiretos (pela redução da competição com os insetos alvo), ou ambos (isto é, mudanças na qualidade nutricional devido aos efeitos pleiotrópicos de expressão do transgene). Além disto, os efeitos das plantas Bt sobre as populações de pulgões podem ser diferentes ao longo do tempo, sendo que eles podem adaptar-se às plantas Bt após várias gerações em contato com elas (Xue et al. 2009).

Embora existam evidências de que pulgões podem ser favorecidos em plantas Bt ao longo do tempo, a grande maioria dos estudos realizados não consideram os efeitos de longo prazo da tecnologia Bt sobre esses insetos. No presente trabalho comparamos o comportamento alimentar do pulgão *R. padi* sobre plantas de milho Bt e não-Bt usando a técnica do monitoramento eletrônico (*Electrical Penetration Graph* – EPG) e verificamos se o crescimento, desenvolvimento e desempenho demográfico do pulgão muda ao longo de 10 gerações alimentando-se das plantas Bt.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Insetos e plantas

Pulgões ápteros adultos de *R. padi* foram obtidos da criação do laboratório, originadas a partir de indivíduos coletados em plantas de milho de Poveda-Madrid/Espanha e mantidos em plantas de cevada. Para o tratamento com milho Bt, usou-se os eventos MON810 (Cry1Ab) e TC1507 (Cry1F) e para o tratamento não-

Bt usou-se a cultivar convencional P30F35 (isogênica das cultivares que continham os eventos MON810 e TC1507) (Dupont Pioneer, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil). Os experimentos foram conduzidos quando as plantas apresentavam 5-6 folhas.

Sementes de milho foram plantadas em vasos de 13 cm de diâmetro utilizando uma mistura de partes iguais de vermiculita (Nº 3, Asfaltex SA, Barcelona, Espanha) e substrato de solo (Kekilla Iberica, Almería, Espanha). As plantas foram regadas três vezes por semana, e um complexo nutricional 20-20-20 (N:P:K) de fertilizante Nutrichem 60 (Miller Chemical & Fertilizante Corp., PE, EUA) foi adicionado a água da irrigação, numa proporção de dosagem 0,25g/l. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento climatizada a temperatura de 24:20°C (dia: noite), fotoperíodo de 16:8h (luz: escuro) e 60–80% de umidade relativa.

As plantas ofertadas aos insetos, em cada geração, foram submetidas ao teste de imunodeteção de Cry1F e Cry1Ab usando tiras ImmunoStrip STX 10301/0050 e STX 06200/0050, respectivamente, (Agdia Inc., Elkhart, IN, EUA) conforme instruções do fabricante. Todos os testes foram normais para presença ou ausência de toxina nas plantas.

Para os experimentos, colônias de *R. padi* foram mantidas por 10 gerações nas plantas de milho Bt e não-Bt, cobertas com um cilindro plástico transparente de 50cm de altura e 15cm de diâmetro fechado na parte superior com um tecido de nylon e acondicionadas em câmara climatizada com temperatura 23:20°C (dia: noite) e fotoperíodo 14:10h (luz: escuro). A cada geração, adultos dos pulgões eram transferidos para as respectivas plantas em idade V5-V6 e deixados produzir ninfas, que eram mantidas na mesma planta até adulto. Este processo era repetido a cada geração até obter o número de gerações desejado para execução dos experimentos, conforme descrito abaixo.

### **Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar**

Foi usada a técnica *Electrical Penetration Graph* (EPG) para registro de variáveis que descrevem o comportamento alimentar nas plantas em estudo, isto, é milho Cry1Ab, Cry1F e não-Bt. Registros foram obtidos nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>5</sub> e F<sub>10</sub> do pulgão, usando os amplificadores Giga-4 e Giga-8 (Sistemas de EPG, Wageningen,

Holanda) (Tjallingii, 1978, 1988). Essas gravações foram realizadas em diferentes gerações para testar se havia adaptação do inseto às plantas ao longo do tempo.

Pulgões ápteros adultos foram imobilizados individualmente usando uma placa operada a vácuo (Eyela Aspirator A3S, Todyo Rikakikai Co. Ltd., Japan). Em seguida, um fio de ouro fino (18 $\mu$ m de diâmetro) foi ligado ao dorso do pulgão com uma pequena gota de cola prata (16034 Pelco Colloidal Silver, TedPella Inc., Redding CA, EUA). A extremidade oposta do fio de ouro foi ligada a um eletrodo de cobre (3 cm de comprimento - 1 mm de diâmetro), que representa o eletrodo de entrada. Outro eletrodo de cobre (de saída) (10 cm de comprimento - 2 mm de diâmetro) foi inserido no vaso da planta.

Pulgões com o fio de ouro anexado foram colocados na folha de uma planta de milho e conectados ao dispositivo DC-EPG (Giga-8 e Giga-4). O procedimento de aquisição de ondas do EPG foi realizado dentro de uma gaiola Faraday para evitar interferências elétricas. Para a aquisição de dados do EPG foi usado Stylet+Software para Windows (EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). Os registros foram obtidos durante 8 h em condições de laboratório (22-24°C) imediatamente após os pulgões terem sido colocados sobre a folha de milho. Formas de ondas do EPG anteriormente descrito para pulgões (Tjallingii, 1988) foram identificadas como segue: não-prova (NP), caminhar estilete intercelular apoplástico (C), punctura estilete intracelular (PD), salivagem na seiva do floema, iniciando a fase do floema (E1), absorção passiva da seiva do floema (E2), consumo ativo da seiva do xilema (água + nutrientes) (G) e trabalho mecânico associado a dificuldades de inserção do estilete (F).

Neste experimento, conduzido em delineamento inteiramente casualizado, cada repetição constitui-se da combinação de uma planta e um pulgão e, portanto, cada pulgão e planta só foram utilizados uma única vez para registros de gravação de EPG. As variáveis comportamentais foram processadas usando o MS Excel Workbook para o cálculo automático dos dados do EPG, desenvolvido por Sarria et al., (2009).

As variáveis selecionadas do EPG (Tabela 1) e calculadas como descrito em Backus et al. (2007) foram: PPW, proporção de indivíduos que produziram o tipo de forma de onda; NWEI, número de eventos de forma de onda por inseto; WDI,

duração da forma de onda (min) por inseto; e WDE, duração da forma de onda (min) por evento.

Tabela 1. Variáveis não-sequenciais e sequenciais do EPG para comparar o comportamento alimentar do pulgão *R. padi* sobre plantas de milho Bt e não-Bt.

<b>Variáveis não-sequenciais</b>	<b>Variáveis sequenciais</b>
Número de não-prova	Tempo para a 1ª prova desde o início do EPG
Número de prova	Tempo da 1ª prova para a 1ª E
Número de C	Tempo desde o início do registro para a 1ª E
Número de pd	Duração da 1ª prova
Número de E1	Duração da 2ª prova
Número de E2	Duração total de E1 seguida por E2
Número de E2 maior que 10min	Duração total de E1 seguida por E2 maior que 10min
Duração total de não-prova	Número de provas curtas menores que 3min (C < 3min)
Tempo total de prova	Número de provas até a 1ª E
Duração total de C	Número de provas após a 1ª E
Duração total de pd	Número de provas curtas (< 3 min) após a 1ª E
Duração total de E1	
Duração total de E2	

### **Efeito do milho Bt no desempenho demográfico de *R. padi***

Foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado com um número de repetições que variou conforme a disponibilidade de plantas e insetos em idade adequada para os testes (n = 16 a 25). Insetos das gerações 1 e 10, que haviam sido mantidos nas plantas de milho Bt e não-Bt (descrito acima) foram transferidos para plantas de milho Cry1Ab, Cry1F ou não-Bt e acompanhados para observar o crescimento, desenvolvimento e crescimento populacional. Para pulgões da 1ª geração foi usado um total de 21, 20 e 25 unidades experimentais (i.e., uma ninfa em cada planta) respectivamente para plantas Cry1Ab, Cry1F e não-Bt. Para os experimentos com pulgões da décima geração foi utilizado um total de 17 para as plantas Bt e 16 para as não-Bt.

Adultos ápteros foram individualizados em folhas de milho Bt e não-Bt confinados usando uma *clipcage*. Após 24 h, os adultos foram removidos deixando

uma ninfa por clipage. As ninfas foram observadas diariamente para registrar a duração do período ninfal, compreendido desde o nascimento até a última muda que deu origem ao adulto (considerado como período pré-reprodutivo - PPR). Após a emergência os adultos foram observados diariamente registrando-se o número diário de ninfas.

Para cada combinação de planta e geração do pulgão foram determinadas a fecundidade efetiva ( $M_d$ ), isto é, o número de ninfas produzidas num período equivalente ao período pré-reprodutivo e o tempo de desenvolvimento ( $T$ ), que corresponde ao tempo médio de geração. A taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) foi calculada de acordo com Wyatt & White (1977), pela equação  $r_m = 0,738(\log M_d)/T_d$ .

Os experimentos foram realizados em câmara climatizada com temperatura 23:20° (dia: noite) e fotoperíodo 14:10h (luz: escuro).

### **Análises estatísticas**

Todas as análises foram realizadas usando o programa SAS Inc. (2011). As variáveis de desenvolvimento, reprodução, desempenho demográfico e comportamento alimentar pelo EPG foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas (Proc Mixed) para testar a hipótese nulidade de falta de diferenças entre as plantas ao longo do tempo (i.e. geração) para as variáveis estudadas. O modelo estatístico incluiu os efeitos principais de geração (i.e., 1, 5 e 10 para as variáveis do EPG; 1 e 10 para a demais variáveis) e planta (i.e., Cry1Ab, Cry1F, e não-Bt) e a interação planta × geração do pulgão. Para cada variável dependente, a estrutura de covariância usada foi a que apresentou *Akaike information criterion* (AIC) menor ( $P < 0,05$ ) pelo teste razão de verossimilhança em relação à estrutura de covariância de simetria composta (i.e., a mais simples) (Littell et al., 2006). Quando a interação planta × geração foi significativa, as médias foram separadas pelo teste t ou teste F da análise de variância quando pertinente.

Foi empregada análise de resíduo antes de realização das análises para verificar se os pressupostos de homogeneidade de variância e normalidade foram atendidos (Proc Mixed, Proc Univariate, Proc GPlot) e nenhuma transformação foi realizada.

## RESULTADOS

### Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar

Resultados das variáveis obtidas para a atividade estiletar de *R. padi* demonstram que pulgões criados por dez gerações no milho Cry1Ab gastaram menos tempo em atividade de prova, diferindo significativamente do milho não-Bt ( $F_{2, 124} = 5,65$ ;  $P = 0,004$ ) (Figura 1a). Por outro lado, os pulgões gastaram mais tempo em não-prova (i.e., sem contato do estilete com o tecido da planta), em todas gerações, diferindo significativamente do milho controle ( $F_{2, 124} = 5,56$ ;  $P = 0,004$ ) (Figura 1b). No milho Cry1F, os pulgões apresentaram comportamento similar àqueles mantidos no milho controle.

Diferenças significativas não foram evidenciadas no número de vezes em que se registrou ingestão de floema (número de E2/inseto) para os pulgões expostos aos diferentes milhos na primeira e quinta gerações, porém, quando mantidos por dez gerações, os milhos expressando as proteínas Cry1Ab e Cry1F apresentaram diferenças significativas quando comparados ao milho não-Bt. Na geração 10 os pulgões mantidos em milho Bt apresentaram menor número de E2 comparado ao milho não-Bt ( $F_{2, 103} = 2,67$ ;  $P = 0,044$ ) (Figura 1c). Diferenças no comportamento alimentar de pulgões expostos ao milho Cry1Ab também foram observadas na duração do tempo total de ingestão do floema (E2) entre as gerações do inseto. Nesta variável o pulgão gastou mais tempo alimentando-se do floema na primeira geração e menos tempo na geração F<sub>10</sub> ( $F_{2, 120} = 3,21$ ;  $P = 0,044$ ) (Figura 1d).

A duração média de caminhamento estiletar intercelular (onda C/evento) foi significativamente reduzida em pulgões mantidos por dez gerações em milho Bt Cry1Ab (Figura 2a) em comparação a geração F<sub>1</sub> ( $F_{2, 1480} = 4,16$ ;  $P = 0,015$ ). Contrariamente, a duração média de provas intracelulares (picada de prova) (Pds) foi maior na F<sub>10</sub> comparada a primeira geração do inseto em todos os tratamentos ( $F_{2,4019} = 7,82$ ;  $P = 0,0004$ ) (Figura 2b).

### **Efeito do milho Bt no desempenho demográfico de *R. padi***

O desempenho dos pulgões nas plantas Bt e não Bt variou nas gerações estudadas, sendo significativa a interação entre a geração do pulgão e tipo de planta para as variáveis em estudo, incluindo o período pré-reprodutivo ( $F_{2, 75} = 9,57, P = 0,0002$ ); ninfas totais produzidas ( $F_{2, 50} = 35,73, P < 0,0001$ ); taxa intrínseca de crescimento populacional ( $F_{2, 50} = 25,58, P < 0,0001$ ) e tempo de geração ( $F_{2, 75} = 9,59, P = 0,002$ ) (Figura 3). Entretanto, não existiram diferenças significativas ( $P > 0.05$ ) entre os pulgões mantidos por somente uma geração nas diferentes plantas de milho ao contrário daqueles criados por dez gerações nos milhos Bt e não-Bt. Os pulgões mantidos por dez gerações apresentaram melhor desempenho nos milhos Cry1F e não-Bt do que em milho Cry1Ab para todos os parâmetros analisados (Figura 3). Em milho Cry1F e não-Bt na décima geração, a duração do período pré-reprodutivo foi mais curta em relação ao milho Cry1Ab; também houve um aumento no  $r_m$  com uma consecutiva diminuição no tempo de geração, que não diferiu significativamente do milho não-Bt. Além disso, o número de ninfas totais (NT) produzidas por pulgões da décima geração foi significativamente maior quando mantidos em milho com a proteína Cry1F e sem a proteína (Figura 3d).

Entre as gerações, diferenças foram evidenciadas nos períodos de desenvolvimento dos pulgões em milho Bt Cry1Ab e não-Bt. Nestes milhos os pulgões apresentaram aumento no período pré-reprodutivo e tempo médio de geração (Figura 3a, b). Não foram evidenciadas diferenças significativas, entre as gerações do pulgão, para os períodos de desenvolvimento e parâmetros demográficos quando criados no milho Cry1F (Figura 3). No entanto, o número de ninfas totais neste milho foi significativamente maior na décima do que na primeira geração de *R. padi*, assim como no milho não-Bt (Figura 3d).

Pulgões mantidos no milho Bt Cry1Ab até a décima geração tiveram todos os parâmetros da tabela de vida negativamente afetados quando comparados aos pulgões da primeira geração. Observa-se que na geração 10 pulgões no milho Cry1Ab apresentam maiores períodos de desenvolvimento, reduzida taxa de crescimento demográfico e menor produção de ninfas totais (Figura 3).

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que existe efeito negativo do milho Bt expressando a toxina Cry1Ab (evento MON810) no desempenho demográfico e comportamento alimentar de *R. padi* ao longo de dez gerações. Contudo, no milho Cry1F os pulgões não apresentaram alterações no comportamento alimentar e nem no crescimento populacional em relação ao milho não-Bt apesar dos insetos terem apresentado algumas alterações em sua história de vida.

Embora alguns trabalhos prévios não reportem impacto sobre a taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) do pulgão *R. padi* no milho Bt Cry1Ab (MON810) (Lewandowski & Górecka, 2008), alguns autores observaram efeitos negativos do milho Bt Cry1Ab (evento 176) neste pulgão dependendo da forma alada ou áptera (Lumbierres et al., 2004). Estes autores relataram menor tempo de desenvolvimento de indivíduos alados criados no milho Bt, mas o tempo de desenvolvimento foi mais longo e a sobrevivência foi menor em indivíduos ápteros mantidos nestas plantas geneticamente modificadas. Em condições de campo, Hurej (2014) encontrou diferenças significativas entre a abundância de *R. padi* em milho Bt DKC3431 e não-Bt, sendo que o número de suas colônias neste milho foram confirmadas apenas ocasionalmente, e não pôde ser relacionada com a toxina Cry1Ab presente no tecido da planta.

Outros estudos sobre os efeitos de milho Bt sobre afídeos, em condições de laboratório, concluem que não existe nenhum efeito deste milho geneticamente modificado em pulgões (Lozzia et al., 1998; Head et al., 2001; Raps et al., 2001; Dutton et al., 2002; Ramirez-Romero et al., 2008). A razão principal é que a toxina não é transportada no floema (Head et al., 2001; Raps et al., 2001; Dutton et al., 2002).

A grande maioria dos estudos mencionados acima não consideram os efeitos de longo prazo das plantas Bt nos pulgões, como estudado no presente trabalho. Aqui, foi demonstrado que ao longo de dez gerações do pulgão *R. padi* a presença da proteína Cry1Ab e da Cry1F em plantas de milho pode levar a diferentes respostas biológicas e comportamentais do inseto. Foi verificado que a presença da toxina Cry1F na planta de milho não leva a diferenças significativas no seu

desenvolvimento comparado ao milho não-Bt, porém, a produção de ninfas foi maior quando comparado ao milho Cry1Ab ao longo do tempo. Por outro lado, foi observado que a toxina Cry1Ab exerce efeito negativo no pulgão *R. padi* ao longo de dez gerações. Investigações prévias demonstram que a modificação genética de plantas pode levar a efeitos secundários indesejáveis e alterar as características, a qualidade nutricional ou estrutura das plantas, podendo influenciar as populações de pulgões (Shieh et al., 1994; Kok & Kuiper, 2003). Os efeitos potenciais do milho Bt sobre insetos fitófagos não-alvo pode levar, por exemplo, a alterações na sua taxa de crescimento populacional (Lumbierres et al., 2004), como observado neste trabalho para os pulgões mantidos até a geração F<sub>10</sub> em milho Cry1Ab.

Trabalhos tem sugerido que a toxina Cry1 expressa em milho Bt aumenta a população de afídeos mais rapidamente após várias gerações (Pons et al., 2005; Kim et al., 2012). Contudo, resultados de desempenho demográfico e variáveis do EPG deste trabalho demonstram que *R. padi* mantido por dez gerações em milho Bt Cry1Ab não tem seu desenvolvimento favorecido ao longo do tempo. O reduzido tempo total de prova, reduzida duração média do caminhar estiletar, reduzido número e tempo de alimentação no floema e diminuição na produção de ninfas totais, da primeira para a décima geração, observado no milho Bt Cry1Ab, demonstra que este milho apresenta um potencial impacto negativo no desenvolvimento do pulgão *R. padi*. Estes resultados foram refletidos nos parâmetros demográficos e períodos de desenvolvimento do pulgão onde também foram negativamente afetados quando mantidos no milho Cry1Ab por dez gerações. Contudo, no milho Cry1F nenhuma diferença foi observada em comparação ao milho controle, mas ambos proporcionaram maior número de ninfas na décima geração do pulgão sem alterar a taxa intrínseca de crescimento. Portanto, o efeito do milho Bt nos aspectos populacional e biológico do pulgão *R. padi* parece ser uma resposta específica e dependente da toxina e evento estudados.

Afídeos alimentam-se predominantemente na seiva do floema (Douglas, 2003) e o fato de que a toxina não é transportada no floema, proposto por Raps et al., (2001), Dutton et al., (2002) e Head et al., (2001), supõe que os pulgões são alvos muito improváveis de efeito direto da toxina. No entanto, a produção contínua de proteínas Bt por alguns tecidos da planta em todo o período de crescimento pode resultar num nível de exposição elevado. Com isso, existe a possibilidade de que os

pulgões ingerem a toxina Bt durante as provas intracelulares (Pds) no processo de seleção da planta hospedeira (Powell et al., 2006). Enquanto os pulgões procuram pelo tecido vascular os estiletos seguem um caminho extracelular interrompido por breves provas intracelulares (Tjallingii, 1988). Estas picadas de provas foram mostradas para correlacionar significativamente com a probabilidade de aquisição de vírus não persistente (Martín et al., 1997; Collar et al., 1998; Moreno et al., 2012) e é durante estas provas intracelulares que pulgões ingerem pequenas quantidades de conteúdo celular da planta (Collar & Fereres, 1998; Powell et al., 2006) e, conseqüentemente, podem ingerir a toxina Bt causando um efeito direto no pulgão.

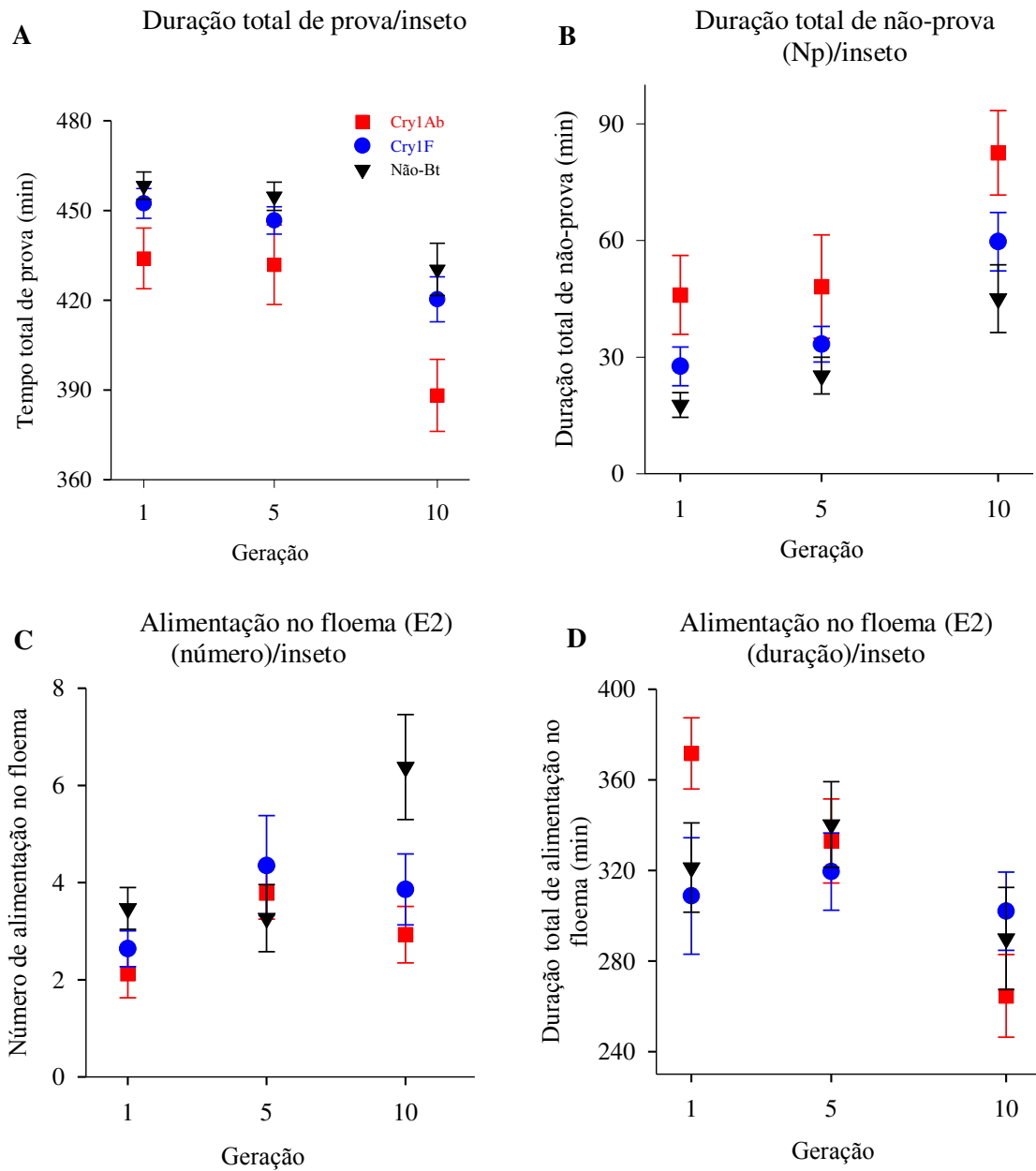
Traços de proteína Cry1Ab em pulgões foram explicados como resultado da ingestão da seiva intracelular da planta durante as provas intracelulares (Raps et al., 2001). Trabalho de Kim et al., (2012) observaram que uma significativa quantidade da toxina Cry1F foi detectada no pulgão *R. padi* quando criado no milho Bt. Da mesma forma, Stephens et al., (2012) detectaram a presença da proteína Cry3Bb em *Rhopalosiphum maidis*, espécie estreitamente relacionadas com *R. padi*. Neste trabalho foi comprovada maior duração média de provas intracelulares (Pds), ao longo do tempo, para pulgões nos milhos Bts comparado ao controle. Portanto, a possível ingestão do conteúdo intracelular das plantas de milho Cry1Ab pode ser um dos fatores que está impactando negativamente os pulgões devido a ação direta da toxina. Importante ressaltar que a maior duração de Pds também pode estar associada ao sucesso na aquisição de vírus, visto que se a subfase II-3 não for suficientemente longa, a probabilidade de aquisição do vírus é notavelmente reduzida (Fereres & Moreno, 2009).

As diferenças nos níveis de suscetibilidade entre variedades transgênicas e isogênicas também podem ser parcialmente explicadas pelas diferenças na composição da seiva do floema, mas é improvável que seja a explicação principal. Além disso, muitos outros fatores podem influenciar a capacidade de uma espécie de pulgão em explorar uma planta hospedeira, tais como as características físicas (Saxena & Stotzky, 2001; Poerschmann et al., 2005) e metabólitos secundários de plantas (Niemeyer, 1988; Givovich et al., 1994). Outra explicação que não pode ser descartada é que essa diferença de suscetibilidade entre as plantas pode surgir durante os procedimentos de modificação genética para inserção da toxina (Kok & Kuiper, 2003). Estas modificações genéticas de plantas podem alterar o

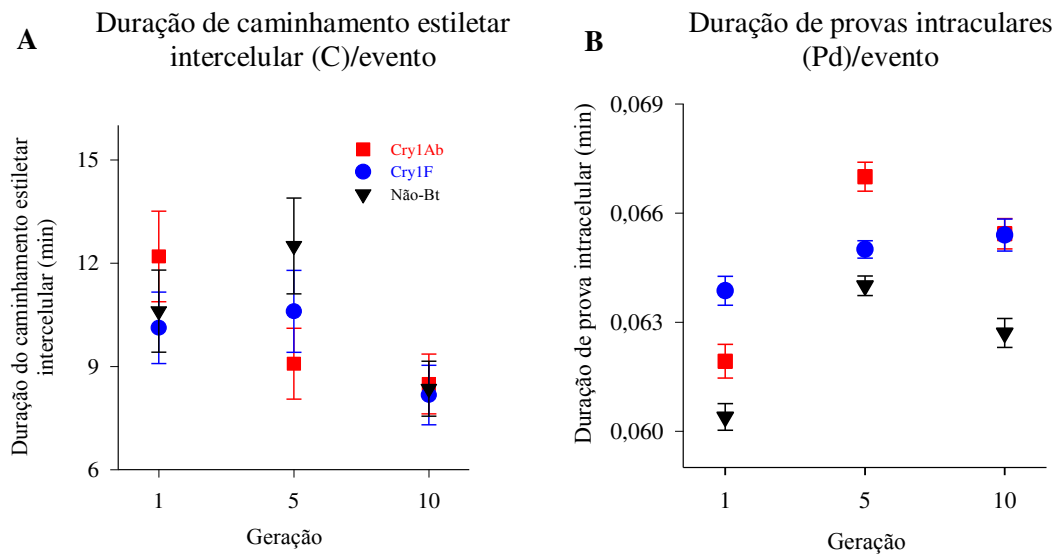
comportamento de prova do pulgão, mesmo ele não sendo o inseto alvo ou não sendo sensível à proteína expressa (Shieh et al., 1994), da mesma maneira como alguns autores sugerem que as plantas resistentes, as plantas infectadas por vírus ou plantas tratadas com inseticidas podem modificar.

Assim, de acordo com estes resultados observa-se que há uma tendência de que respostas populacional e biológica às culturas Bt, ao longo do tempo, dependem das espécies de pulgões considerados, bem como da toxina e evento Bt estudados. Com base em evidências atuais e do presente estudo, não houve efeito negativo a partir do milho Bt Cry1F (TC1507), porém para Cry1Ab (MON 810) efeitos negativos foram evidenciados no pulgão *R. padi*. Isso sugere que a expressão das proteínas Cry1Ab e Cry1F em milho não devem facilitar os pulgões *R. padi* a tornarem-se pragas importantes economicamente por não aumentar o crescimento populacional.

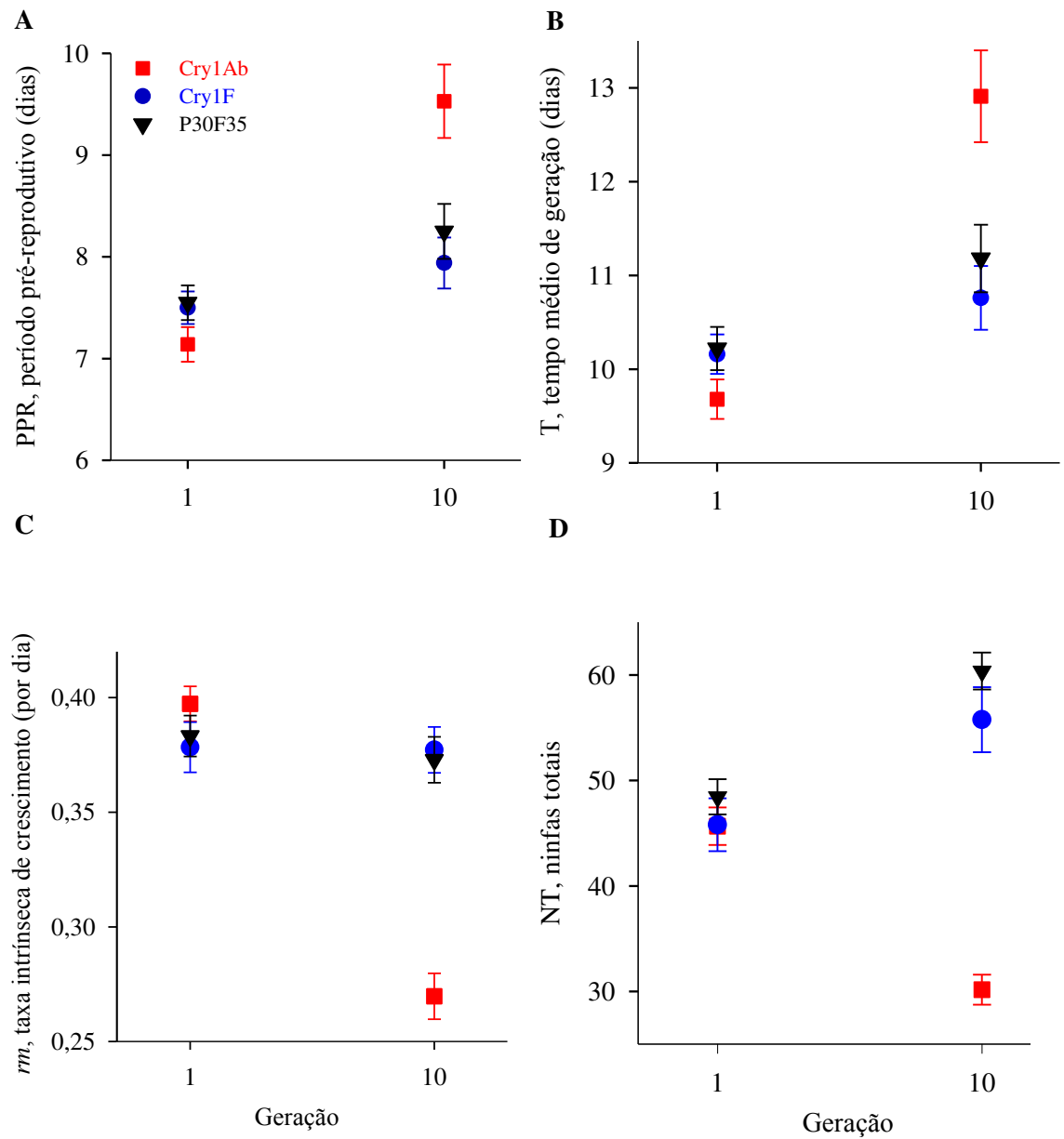
## Figuras de Resultados do Captítulo 1



**Figura 1.** Variáveis não-sequenciais do *Electrical Penetration Graph* (EPG)/inseto de *R. padi* em plantas de milho Bt e não-Bt. **A)** Duração total de prova (min.); **B)** Duração total de não-prova-Np (min.); **C)** Número de vezes de alimentação no floema-E2, e **D)** Duração total de alimentação no floema-E2 (min.). Os dados são média  $\pm$  erro padrão para milho Cry1Ab (quadrado vermelho), Cry1F (círculo azul) e não-Bt (triângulo preto) em uma, cinco ou dez gerações do pulgão.



**Figura 2.** Variáveis não-sequenciais do *Electrical Penetration Graph* (EPG)/evento de *R. padi* em plantas de milho Bt e não-Bt. **A)** Duração do caminhada estiletar intercelular (C) (min.); **B)** Duração de provas intracelulares (Pd) (min.). Os dados são média  $\pm$  erro padrão para milho Cry1Ab (quadrado vermelho), Cry1F (círculo azul) e não-Bt (triângulo preto) em uma, cinco ou dez gerações do pulgão.



**Figura 3.** Desenvolvimento, reprodução e desempenho demográfico do pulgão *R. padi* em plantas de milho Bt e não-Bt. **A)** PPR, período pré-reprodutivo (dias), **B)** T, tempo médio de geração (dias), **C)**  $r_m$ , taxa intrínseca de crescimento populacional (dias), e **D)** NT, ninfas totais. Os dados são média  $\pm$  erro padrão para milho Cry1Ab (quadrado vermelho), Cry1F (círculo azul) e não-Bt (triângulo preto) em uma ou dez gerações do pulgão.

## REFERÊNCIAS

- Areal, F.J.; Riesgo, L. Probability functions to build composite indicators: A methodology to measure environmental impacts of genetically modified crops. **Ecological Indicators**, v.52, p.498–516, 2015.
- Areal, F.J.L; Riesgo, L.; Rodríguez-Cerezo, E. Economic and agronomic impact of commercialized GM crops: a meta-analysis. **Journal of Agricultural Science**, v.151, p. 7–33. 2013.
- Asín, L.; Pons X. Effect of high temperature on the growth and reproduction of corn aphids (Homoptera: Aphididae) and implications for their population dynamics on the northeastern Iberian Peninsula. **Environmental Entomology**, v.30, p. 1127–1134, 2001.
- Auad, A.M.; Alves, S.O.; Carvalho, C.A.; Silva, D.M.; Resende, T.T.; Veríssimo, B.A. The impact of temperature on biological aspects and life table of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) fed with signal grass. **Florida Entomologist**, v. 92(4), p. 569-577. 2009.
- Backus, E.A.; Cline, A.R.; Ellerseick, M.R.; Serrano, M.S. *Lygus Hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of non-sequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, p.296–310, 2007.
- Bereś, P.K. The occurrence of aphids (Aphididae) on maize (*Zea mays* L.) in Krzeczowice near Przeworsk (South-eastern Poland) in 2005-2008. **Acta Scientiarum Polonorum**, v.10(1), p.3-12, 2011.
- Blackman, R.L.; Eastop, V.F. Aphids on the World's Crops. John Wiley and Sons, Chichester, 1984.
- Carrière, Y.; Crowder, D.W.; Tabashnik, B.E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, v.3(5-6), p. 561–573. 2010.
- Carrière, Y.; Crickmore, N.; Tabashnik, B.E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v.33, p.161-168, 2015.
- Catarino, R.; Ceddia, G.; Areal, F.J.; Park, J. The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. **Plant Biotechnology Journal**, p. 1–12, 2015.
- Cattaneo, M.G.; Yafuso, C.; Schmidt, C.; Huang, C.Y.; Rahman, M.; Olson, C.; Ellers-Kirk, C.; Orr, B.J.; Marsh, S.E.; Antillas, L.; Dutilleul, P.; Carrière, Y.

- Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.7571–7576, 2006.
- Collar, J.L.; Avilla, C.; Martín, B.; Duque, M.; Fereres, A. La transmisión de virus no persistentes estudiada a través del comportamiento de prueba de los pulgones. **Boletín Sanidad Vegetal Plagas**, v.24, p.687-694, 1998.
- Douglas AE. Nutritional physiology of aphids. **Advances in Insect Physiology**, v. 31, p. 73–140, 2003.
- Dutton, A.; Klein, H.; Romeis, J.; Bigler, F. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. **Ecological Entomology**, v.27, p. 441–447. 2002.
- Faria, C.A.; Wackers, F.L.; Pritchard, J.; Barrett, D.A.; Turlings, T.C.J. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteran pests. **Plos One**, v.2(7), 2007.
- Fereres, A.; Collar, J.L. Nonpersistent virus transmission efficiency determined by aphid probing behavior during intracellular punctures. **Environmental Entomology**, v.27(3), p.583-591, 1998.
- Fereres, A.; Moreno, A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research**, v.141, p.158–168, 2009.
- Fisher, R.A. Some remarks on the methods formulated in a recent article on “The quantitative analysis of plant growth”. **Annals of Applied Biology**, v.7, p.367-372, 1921.
- Givovich, A.; Sandstrom, J.; Niemeyer, H.M.; Pettersson, J. Presence of a hydroxamic acid glucoside in wheat phloem sap, and its consequences for performance of *Rhopalosiphum padi* (L) (Homoptera, Aphididae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 1923–1930, 1994.
- Gray S, Gildow FE. Luteovirus-aphid interactions. **Annual Review of Phytopathology**. v. 41, p. 539-66. 2003.
- Habustová, O.; Dolezal, P.; Spitzer, L.; Svobodová, Z.; Hussein, H.; Sehnal, F. Impact of Cry1Ab toxin expression on the non-target insects dwelling on maize plants. **Journal of Applied Entomology**, v.138, p. 164–17, 2014.

- Head, G.; Brown, C.R.; Groth, M.; Duan, J.J. Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.99, p.37-45. 2001.
- Hurej, M.; Twardowski, J.P.; Beres, P.; Klukowski, Z. Population development of bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera, Aphididae) on conventional and Bt-maize expressing the insecticidal protein Cry1Ab. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 20(3), p. 676-683, 2014.
- James, C. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Briefs No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
- Kim, Y.H.; Hwang, C.E.; Kim, T-S.; Lee, J-H.; Lee, S.H. Assessment of potential impacts due to unintentionally released Bt maize plants on non-target aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 15(3), p. 443-446, 2012.
- Kok, E.J.; Kuiper, H.A. Comparative safety assessment for biotech crops. **Trends in Biotechnology**, v.21, p. 439–444, 2003.
- Krawczyk, A.; Hurej, M.; Sobota, G. Aphids and their natural enemies infesting maize in Opole province. **Aphids and other homopterous insects**, v.12, p.125-134, 2006.
- Lewandowski, A.; Górecka, J. Effect of transgenic maize MON810 on selected non-target organisms: the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.) and its predator-green lacewing (*Chrysoperla carnea* Steph). **Vegetable Crops Research Bulletin**, v.69, p. 21-30, 2008.
- Littell, R.C.; Milliken, G.A.; Stroup, W.W.; Wolfinger, R.D.; Schabenberger, O. SAS for mixed models, SAS Institute Inc., Cary. 2006.
- Lozzia, G.C.; Furlanis, C.; Manachini, B.; Rigamonti, I.E. Effects of Bt corn on *Rhopalosiphum padi* L. (Rhynchota Aphididae) and on its predator *Chrysoperla carnea* Stephen (Neuroptera Chrysopidae). **Boll. Zool. Agr. Bach.**, v. 30, p.153–164, 1998.
- Lu, Y.; Wu, K.; Jiang, Y.; Xia, B.; Li, P.; Feng, H.; Wyckhuys, K.A.G.; Guo, Y. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. **Science**, v. 328, p. 1151–1154, 2010.

- Lumbierres, B.; Albajes, R.; Pons, X. Transgenic Bt maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance. **Ecological Entomology**, v. 29(3), p. 309-317, 2004.
- Martín, B.; Collar, J.L.; Tjallingii, W.F.; Fereres A. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viroses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2701–2705, 1997.
- Marvier, M.; McCreedy, C.; Regetz, J.; Kareiva, P. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. **Science**, v.316(8), 2007.
- Meissle, M.; Romeis, J.; Bigler, F. BT maize and IPM in Europe. **Outlooks on Pest Management**, v. 22(6), p.257-261, 2011.
- Moreno, A.; Tjallingii, W. F.; Fernandez-Mata, G.; Fereres, A. Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 662–667, 2012.
- Niemeyer, H.M. Hydroxamic acids (4-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the gramineae. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3349–3358. 1988.
- Parizoto, G.; Rebonatto, A.; Schons, J.; Lau, D. Barley yellow dwarf virus-PAV in Brazil: seasonal fluctuation and biological characteristics. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 11-19, 2013.
- Pinto, L.M.N.; Ziegler, D.R.; Fiuza, L.M. 2014. The use of transgenic plants in insect control, pp. 319-329. In K. Sahayaraj [ed.], Basic and Applied Aspects of Biopesticides. DOI 10.1007/978-81-322-1877-7\_18, Springer India.
- Pitta, R.M.; Duarte, A.P.; Boiça Junior, A.L.; Yuki, V.A. Dinâmica populacional de afídeos em cultivares de milho safrinha e influência sobre seus parasitóides. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6(2), p.131-139, 2007.
- Poerschmann, J.; Gathmann, A.; Augustin, J.; Langer, U.; Górecki, T. Molecular composition of leaves and stems of genetically modified Bt and near-isogenic non-Bt maize-characterization of lignin patterns. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p. 1508–1518, 2005.
- Pons, X.; Lumbierres, B.; Lopez, C.; Albajes, R. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: a farm scale study. **European Journal of Entomology**, v. 102, p. 73–79, 2005.

- Powell, G.; Tosh, C.R.; Hardie, J. Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 309–330, 2006.
- Radford, P.J. Growth analysis formulae – their use and abuse. **Crop Science**, v.7, p.171-175, 1967.
- Ramirez-Romero, R.; Desneux, N.; Chaufax, J.; Kaiser, L. Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1Ab toxin detection. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.91, p. 110-115, 2008.
- Raps, A., Kehr, J.; Gugerli, P.; Moar, W.J.; Bigler, F.; Hilbeck, A. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: aphididae) for the presence of Cry1Ab. **Molecular Ecology**, v.10, p.525-533, 2001.
- Riesgo, L.; Areal, F.; Rodriguez-Cerezo, E. How can specific market demand for non-GM maize affect the profitability of Bt and conventional maize? A case study for the middle Ebro Valley, Spain. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.10, p. 867–876, 2012.
- Sarria, E.; Cid, M.; Garzo, E.; Fereres, A. Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.67, p. 35–42, 2009.
- SAS Institute. SAS user's manual, version 9.3. SAS Institute, Cary NC. 2011.
- Saxena D.; Stotzky, G. Bt corn has a higher lignin content than non Bt corn. **American Journal of Botany**, v.88(9), p.1704–1706, 2001.
- Schliephake, E.; Habekuss, A.; Scholz, M.; Ordon, F. Barley yellow dwarf virus transmission and feeding behaviour of *Rhopalosiphum padi* on *Hordeum bulbosum* clones. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.146, p. 347-356, 2013.
- Shieh, J.N.; Berry, R. E.; Reed, G.L.; Rossignol, P.A. Feeding activity of green peach aphid (Homoptera: Aphididae) on transgenic potato expressing a *Bacillus thuringiensis* ssp. tenebrionis deltaendotoxin gene. **Journal of Economic Entomology**, v.87, p.618- 622, 1994.
- Stephens, E.J.; Losey, J.E.; Allee, L.L.; Ditommaso, A.; Bodner, C.; Breyre, A. The impact of cry3Bb Bt-maize on two guilds of beneficial beetles. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.156, p. 72-81, 2012.

- Strażyński, P. Aphid fauna /Hemiptera, Aphidoidea/ on corn crops in Wielkopolska – species composition and increase in numbers. **Aphids and other homopterous insects**, v.14, p.123-128, 2008.
- Tabashnik, B.E.; Gassmann, A.J.; Crowder, D.W.; Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, p.199–202. 2008.
- Tjallingii, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.24, p.721–730, 1978.
- Tjallingii, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks AK, Harrewijn, eds. **Aphids, their biology, natural enemies and control**, v.2B. Elsevier, Amsterdam, p.95–108, 1988.
- Xue K.; Wang X.Y.; Huang C.H.; Wang R.J.; Liu B.; Yan F.M.; Xu C.R. Stylet penetration behaviors of the cotton aphid *Aphis gossypii* on transgenic Bt cotton. **Insect Science**, v16, p. 137-146, 2009.
- Wyatt, I.J.; White, P.F. Simple estimation of intrinsic increase rate for aphids and Tetranychid mites. **Journal of Applied Ecology**, v.14, p.757-766, 1977.

## Capítulo 2: Herbivoria por *Spodoptera frugiperda* em milho afeta o comportamento alimentar e desempenho demográfico do pulgão *Rhopalosiphum maidis*?

### RESUMO

Interações mediadas por plantas entre insetos herbívoros são reconhecidas como uma das principais elementos de estruturação das comunidades de herbívoros, onde a competição e a facilitação podem ocorrer. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar se a fitofagia por larvas de *Spodoptera frugiperda* em uma cultivar de milho altera o comportamento alimentar e o desempenho do pulgão *Rhopalosiphum maidis*. Nos experimentos, um grupo de plantas (n = 20) foi infestado com a lagarta e outro ficou sem infestação (controle). As lagartas permaneceram nas plantas se alimentado por três dias. Após a remoção das lagartas as plantas foram submetidas a alimentação pelo pulgão e o comportamento alimentar deste inseto foi comparado pela técnica do monitoramento eletrônico (*Electrical Penetration Graph* – EPG). As plantas (n = 8) também foram analisadas quanto aos inibidores de proteases logo após a remoção das lagartas. Os resultados mostraram que o ataque por *S. frugiperda* diminuiu a atividade de proteases, demonstrando que houve resposta induzida da planta à herbivoria. Porém, tanto os parâmetros da tabela de vida quanto as variáveis do comportamento alimentar obtidas no EPG de *R. maidis* demonstraram não existir diferenças significativas entre os tratamentos, exceto nas durações de E2 sustentada (sE2 – alimentação no floema por mais de 10 min.) e pd (provas intracelulares) por evento (WDE). A média de duração de alimentação dos pulgões no floema por mais de 10 minutos foi maior nas plantas danificadas, e nestas plantas a duração média de provas intracelulares foi mais curta. Portanto, a prévia infestação de *S. frugiperda* em plantas de milho não reduz o desempenho e apenas afeta minimamente o comportamento alimentar de *R. maidis*. Mais estudos são necessários a fim de elucidar se a interação entre as vias de defesa induzidas por esses insetos nas plantas de milho está favorecendo a competição ou a facilitação entre esses dois herbívoros.

**Palavras-chave:** Resposta induzida, interação inseto-plantas, monitoramento eletrônico.

## INTRODUÇÃO

Um grande número de estudos tem explorado como as respostas induzidas por herbivoria mediam interações entre insetos. Interações mediadas por plantas entre insetos herbívoros são reconhecidas como uma das principais forças de estruturação das comunidades de herbívoros, onde a competição e a facilitação podem ocorrer (Denno et al., 1995; Kaplan & Denno, 2007). Devido ao fenômeno de mudanças específicas no vegetal em resposta à herbivoria, a interação subsequente da planta com uma espécie fitófaga pode resultar em alteração do comportamento e desempenho do inseto sobre a planta hospedeira (Ohgushi, 2005; Stam et al., 2014; Oliveira & Janssen, 2015).

A maioria das interações mediadas por plantas entre herbívoros parece resultar na competição, e ao contrário das previsões da tradicional teoria da competição, é agora claro que essas interações negativas podem ocorrer mesmo entre espécies de guildas diferentes (Hagenbucher et al., 2013; Ali & Agrawal, 2014). A competição parece ser mediada pelas defesas de plantas induzidas, que afetam negativamente não só a praga inicial, mas também a subsequente (Kaplan & Denno 2007). Por outro lado, o *cross-talk* (interações entre as vias de transdução dos sinais de defesa) também pode permitir interações interespecíficas positivas entre insetos herbívoros de contrastantes guildas alimentares, o que representa um “prejuízo” para a planta quando está sendo atacada por insetos mastigadores e sugadores (Zarate et al., 2007; Dicke et al., 2009).

Os insetos mastigadores causam grandes danos mecânicos aos tecidos das plantas e induzem o sistema de defesa de forma diferente dos insetos sugadores de seiva, que geralmente se alimentam de uma forma mais delicada (Walling, 2000). Durante o processo de alimentação, os insetos mastigadores (lagartas) deixam escapar uma ampla gama de elicitores que induzem respostas de defesa específicas que são diferentes de danos mecânicos em geral (Acevedo et al., 2015). Por outro lado, os pulgões usam estiletos para a alimentação e causam danos físicos mínimos para o tecido da planta. Eles causam graves prejuízos em culturas em todo o mundo através da sucção de nutrientes do floema, e na transmissão de vírus fitopatogênicos (Han et al., 2009; Fereres & Moreno, 2009; Fereres, 2015; Cichocka et al., 2015).

Para evitar que sejam consumidas por insetos herbívoros, as plantas desenvolveram mecanismos sofisticados para reconhecer sinais de insetos fitófagos desencadeando defesas contra o ataque herbívoro. Uma cascata de alterações são rapidamente desencadeadas pela herbivoria, que inclui fluxos de íons, formação de espécies reativas de oxigênio, modificações de proteínas, biossíntese e sinalização de fitohormônios (Mithöfer & Boland, 2008; Thivierge et al., 2010, Hogenhout & Bos, 2011; Zebelo & Maffei, 2015). Esta cascata resulta na indução de defesas diretas (defesas que afetam diretamente o desempenho dos herbívoros) e indiretas (atração de inimigos naturais dos herbívoros através da produção de substâncias voláteis) contra os herbívoros (Howe & Jander, 2008; Jaouannet et al., 2014).

Danos causados por insetos desencadeiam defesas da planta nas vias de sinalização em que os hormônios ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA) desempenham papéis importantes (War et al., 2013). Muitos estudos têm sugerido o envolvimento do SA em resposta a insetos sugadores de floema (Walling, 2000; Mewis et al., 2006; Goggin, 2007;. Broekgaarden et al., 2011), ao passo que a resposta da planta a herbívoros mastigadores (principalmente lepidópteros) é tipicamente induzida via JA (e muitas vezes de etileno, ET) (Kessler & Baldwin 2002; De Vos et al., 2005). O papel que o SA exerce em plantas alimentadas por pulgões pode ter efeitos diretos nos produtos finais da resposta induzida ou desempenhar um papel benéfico alternativo devido às interações dos sinais (*cross-talk*) com JA (Goggin, 2007).

Há considerável conhecimento de como as defesas de plantas induzidas operam sob ataque de insetos de guildas alimentares diferentes, principalmente de forma isolada e usando *Arabidopsis*, tomate e fumo como modelos de estudo, mas milho permanece pouco explorado no que se refere como a resposta de um inseto mastigador impacta fitófagos de outra guilda, por exemplo, um inseto sugador.

Mais de 90 espécies de insetos são conhecidas por se alimentarem de milho cultivado (Steffey et al., 1999). Cada parte da planta, desde as suas raízes até o pendão, é consumida por uma ou mais espécies de herbívoros. Insetos que se alimentam de milho pertencem a diferentes guildas alimentares, por exemplo, aqueles que se alimentam das folhas, broqueiam hastes, sugam seiva, e aqueles que se alimentam das raízes (Meihls et al., 2012). Destes fitófagos, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) é principal em importância econômica na

América Neotropical por frequentemente atingir elevados níveis populacionais destruindo as lâminas foliares no cartucho da planta e *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphididae) ocasionalmente causa perdas em cultivos de milho por alimentar do floema nas folhas do cartucho da planta.

O objetivo neste trabalho foi verificar se alimentação por *S. frugiperda* em uma cultivar de milho altera o comportamento alimentar e o desempenho demográfico do pulgão *R. maidis*. Espera-se, portanto, que a resposta de defesa direta desencadeada pela planta, induzida pela herbivoria da lagarta, cause um efeito negativo nos aspectos biológicos do pulgão.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Insetos e plantas

Pulgões ápteros adultos de *R. maidis* foram obtidos de criação do laboratório, gerada a partir de colônia obtida da Embrapa Milho e Sorgo, mantidos em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*). Para os experimentos, colônias de *R. maidis* foram criadas em plantas de milho (*Zea mays*) convencional, cobertas com um cilindro plástico transparente de 60cm de altura e 15cm de diâmetro fechado na parte superior com um tecido de nylon e acondicionados em câmara climatizada com temperatura 25°C, U.R 70% e fotoperíodo 16:8h (luz: escuro). As lagartas, *S. frugiperda*, foram obtidas da criação do laboratório de Interação Inseto-Planta da UFV (Universidade Federal de Viçosa-MG).

Os experimentos foram conduzidos usando plantas de milho convencional não-Bt (P30F53) (Dupont Pioneer, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) e quando as mesmas apresentavam 5-6 folhas. Sementes de milho foram plantadas em vasos de 13 cm de diâmetro utilizando uma mistura de partes iguais de solo e substrato vegetal. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e regadas diariamente.

### Experimentos

Para os experimentos um grupo de plantas (n = 20) escolhidas ao acaso foi infestado com lagartas de 2º instar e o outro (n = 20) foi deixado sem infestação

(controle). As lagartas foram removidas das plantas após se alimentarem por três dias. Um pulgão áptero foi então transferido para a folha de cada planta e seu comportamento alimentar foi registrado durante 8h, usando a técnica do EPG (Electrical Penetration Graph). Após o registro do EPG, o desempenho demográfico do pulgão foi avaliado. As plantas (danificadas e sem danos) também foram analisadas quanto a inibição de protease logo após a remoção das lagartas.

#### *Quantificação de Inibidores de Proteases*

A atividade de inibidores de proteases foi medida em folhas de plantas danificadas e sem danos (n = 8 plantas) de *S. frugiperda* logo após a remoção da lagarta das plantas. Uma quantidade de 600 mg de tecido foliar foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Posteriormente, foi triturado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 1000µl de solução tampão (tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 e CaCl<sub>2</sub> 20mM; 1: 3 w/ v), e centrifugado a 17200g (45 min, 4°C). Cem µl de tripsina (4,7x10<sup>-5</sup>M) foi misturada com 30µl do sobrenadante e 570µl de tampão (tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 e CaCl<sub>2</sub> 20 mM), e foi incubada à temperatura ambiente durante 5 min. Os controles consistiram em 600µl de tampão e 100µl de tripsina (4,7x10<sup>-5</sup>M). Uma alíquota de 500µl da mistura foi adicionada a 500µl de tampão e 500µl de Na-Benzoil-D, L-arginina cloridrato de 4-nitroanilida (1,2 mM). A atividade da tripsina foi monitorada com um espectrofotômetro (410 nm). A diferença entre a absorbância medida a 60 e 150s foi utilizada para determinar a atividade da tripsina. As medições foram realizadas em amostra triplicada, e foram convertidas para mg de tripsina inibida por grama de proteína (Kant et al., 2004) e foram corrigidas para a diluição (Kakade et al., 1974).

#### *Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar*

O comportamento alimentar do pulgão *R. maidis* foi registrado utilizando a técnica do Electrical Penetration Graph (EPG), em plantas de milho danificadas por *S. frugiperda* e sem dano (controle), usando o amplificador Giga-8 (Sistemas de EPG, Wageningen, Holanda) (Tjallingii, 1978, 1988).

Pulgões ápteros adultos foram imobilizados individualmente usando uma placa operada a vácuo. Em seguida, um fio de ouro fino (2 cm de comprimento e 18 µm de diâmetro) foi ligado ao dorso do pulgão com uma pequena gota de cola prata. A extremidade oposta do fio de ouro foi ligada a um eletrodo de cobre (3 cm de comprimento - 1 mm de diâmetro), que representa o eletrodo de entrada. Outro eletrodo de cobre (de saída) (10 cm de comprimento - 2 mm de diâmetro) foi inserido no vaso da planta.

Pulgões com o fio de ouro em anexo foram colocados na folha de uma planta de milho (danificada ou sem dano) e conectados ao dispositivo DC-EPG (Giga-8). O procedimento de aquisição de ondas do EPG foi realizado dentro de uma gaiola Faraday para evitar interferências elétricas. A aquisição de dados do EPG foi conduzida utilizando Stylet+Software para Windows (EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). Os registros foram obtidos durante 8 h sob condições de laboratório (23-25°C) iniciando imediatamente após os pulgões serem colocados sobre a folha de milho. Formas de ondas do EPG anteriormente descrito para os pulgões (Tjallingii, 1988) foram identificadas como segue: não-prova (NP), caminamento estiletar intercelular apoplástico (C), punctura estiletar intracelular (PD), salivagem na seiva do floema, iniciando a fase de floema (E1), absorção passiva da seiva do floema (E2), consumo ativo da seiva do xilema (água + nutrientes) (G) e trabalho mecânico associado a dificuldades de inserção do estilete (F).

Vinte repetições por tratamento (plantas de milho danificadas e sem dano) foram registradas. Cada repetição (pulgões e plantas individuais) foi realizada usando uma planta e um afídeo diferente para cada gravação do EPG. Todas as variáveis comportamentais foram processadas usando o MS Excel Workbook para o cálculo automático dos dados do EPG, desenvolvido por Sarria et al., (2009). A análise dos dados foi realizada para variáveis relevantes do EPG para um período de 8h de gravação.

Variáveis selecionadas do EPG (Tabela 1) foram calculadas e comparadas entre os tratamentos como descrito em Backus et al., (2007): PPW, proporção de indivíduos que produziram o tipo de forma de onda; NWEI, número de eventos de forma de onda por inseto; WDI, duração da forma de onda (min) por inseto; e WDE, duração da forma de onda (min) por evento.

Tabela 1. Variáveis não-sequenciais e sequenciais do EPG para comparar o comportamento alimentar do pulgão *R. maidis* sobre plantas de milho danificadas e sem danos de *S. frugiperda*.

Variáveis não-sequenciais	Variáveis sequenciais
Número de não-prova	Tempo para a 1ª prova desde o início do EPG
Número de prova	Tempo da 1ª prova para a 1ª E
Número de C	Tempo desde o início do registro para a 1ª E
Número de pd	Duração da 1ª prova
Número de E1	Duração da 2ª prova
Número de E2	Duração total de E1 seguida por E2
Número de E2 maior que 10min	Duração total de E1 seguida por E2 maior que 10min
Duração total de não-prova	Número de provas curtas menores que 3min (C < 3min)
Tempo total de prova	Número de provas até a 1ª E
Duração total de C	Número de provas após a 1ª E
Duração total de pd	Número de provas curtas (< 3 min) após a 1ª E
Duração total de E1	
Duração total de E2	

#### *Desempenho de R. maidis em plantas de milho danificadas por S. frugiperda*

Grupos de adultos ápteros (n = 20) foram individualizados nas folhas de milho das plantas danificadas pelas lagartas (na folha diferente daquela em que a lagarta fez o dano) ou em plantas limpas, sem dano de *S. frugiperda*, sempre utilizando *clipcages*. Vinte e quatro horas após, os pulgões adultos foram removidos deixando somente uma ninfa por *clipcage*. As ninfas foram observadas diariamente para registrar a duração do período ninfal, compreendido desde o nascimento até a última muda que deu origem ao adulto – período pré-reprodutivo - PPR. Após a emergência os adultos foram observados diariamente registrando-se o número diário de ninfas.

Para cada tratamento foi determinada a fecundidade efetiva (Md) ou número de ninfas produzidas num período equivalente ao período pré-reprodutivo; o tempo de desenvolvimento (T) que corresponde ao tempo médio de geração. A taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) foi calculada de acordo com Wyatt & White (1977) pela equação  $r_m = 0,738 (\log Md)/T$ .

Os experimentos foram realizados em câmara climatizada com temperatura 25°C, UR 70% e fotoperíodo 16:8h (luz: escuro).

### **Análises estatísticas**

Todas as análises foram realizadas usando o programa SAS (2011). Para todos os dados foi empregada análise de resíduo para verificar se os pressupostos de homogeneidade de variância e normalidade foram atendidos (Proc Mixed, Proc Univariate, Proc GPlot). Todas as variáveis comportamentais obtidas por gravação do EPG foram comparadas entre os tratamentos por meio do teste U de Mann-Whitney. As variâncias associadas com os parâmetros de crescimento populacionais e a fecundidade diária foram comparadas entre os tratamentos por meio do teste t de Student (variáveis normais) ou pelo teste U de Mann-Whitney (para variáveis não normais). Diferenças nos níveis inibidores de proteases entre os tratamentos foram analisadas pelo teste t de Student.

## **RESULTADOS**

### **Quantificação de inibidores de proteases**

O percentual de inibição da atividade de proteases em plantas de milho previamente danificadas por *S. frugiperda* foi significativamente maior quando comparada àquelas que não foram submetidas a herbivoria ( $t = 2,62$ ;  $gl = 14$ ;  $P = 0,020$ ) (Figura 1). Isto demonstra que ataques por *S. frugiperda* as plantas de milho induziram uma resposta de defesa diminuindo a atividade enzimática.

### **Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar**

Os valores das variáveis sequenciais e não sequenciais obtidos para as atividades de inserção estiletar de *R. maidis* em plantas de milho danificadas e sem dano de *S. frugiperda*, obtidos em 8h de gravação no EPG (480 min), não apresentam diferenças relevantes entre os tratamentos, exceto para as durações de Pd (provas intracelulares) e E2 sustentada (alimentação no floema por maior de 10 min.) por evento (WDE) (Tabela 2). A duração do evento Pd foi significativamente maior para

pulgões mantidos em plantas de milho sem dano de *S. frugiperda* ( $Z = 24,45$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,000$ ). Por outro lado, plantas submetidas a herbivoria da lagarta proporcionaram aos pulgões maior duração média de E2 sustentada ( $Z = 27,11$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,000$ ). Embora não foram observadas diferenças significativas no número (NWEI) e duração (WDI) de E2 (alimentação no floema) por inseto, observou-se uma tendência de que os pulgões fizeram maior número de onda E2 e permaneceram mais tempo alimentando-se do floema das plantas de milho danificadas pelas lagartas (Tabela 2).

Análise sequencial das formas de onda durante todo o período de gravações no EPG mostram que estas variáveis não foram afetadas pelas diferentes fontes de alimentação de *R. maidis* (Tabela 3). Assim, apesar das diferenças nas variáveis pré-floemáticas entre pulgões mantidos em plantas de milho danificadas e sem dano não terem sido observadas, o “Tempo desde o início do registro para a 1ª E” indica que *R. maidis* das plantas danificadas atingiram a fonte de alimentação (floema) antes dos pulgões das plantas limpas que não foram submetidas a herbivoria (Tabela 3).

#### **Desempenho de *R. maidis* em plantas de milho danificadas por *S. frugiperda***

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de crescimento dos pulgões alimentados nas plantas de milho submetidas a prévia herbivoria por *S. frugiperda* ou sem herbivoria (Tabela 4). Da mesma forma, a fecundidade diária não foi afetada pelos diferentes tratamentos ( $t = -0,32$ ,  $gl = 18$ ;  $P = 0,750$ ) (Figura 2). Esses resultados indicam que a infestação prévia de *S. frugiperda* parece não induzir mudanças na qualidade da planta para *R. maidis* de modo a afetar seu desempenho demográfico.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigado se a herbivoria por *S. frugiperda* em plantas de milho afeta negativamente o desempenho e comportamento alimentar do pulgão *R. maidis*. A análise de inibidores de proteases demonstra que houve uma resposta induzida na planta de milho frente à fitofagia por *S. frugiperda*. Dados de Chuang et al. (2014) indicaram que plantas de milho respondem aos elicitores presentes na saliva de *S. frugiperda*, que desencadeiam as defesas diretas contra a herbivoria. As plantas respondem ao ataque de herbívoros com várias defesas, que são realizadas por meio da ativação de diferentes rotas bioquímicas que se interagem (Arimura et al., 2005, Thaler et al., 2012). A produção de inibidores de proteases é um dos mecanismos de defesa das plantas dos quais podem ser encontrados constitutivamente ou induzidos em resposta ao ataque de um patógeno ou de herbívoros (Ryan, 1990; Tamayo et al., 2000; Tremacoldi, 2009; Zhu-Salzman et al., 2015).

No presente trabalho foi demonstrado que, apesar do ataque de *S. frugiperda* ter induzido uma resposta de defesa direta na planta de milho, os aspectos biológicos do pulgão *R. maidis* não foram afetados, e que as plantas previamente danificadas facilitaram o tempo médio de alimentação dos pulgões na seiva do floema. Trabalhos tem demonstrado que respostas induzidas são mediadas por transdução de sinal envolvendo fitohormônios, tais como o ácido jasmônico (JA) e o ácido salicílico (SA) (Erb et al., 2012). As plantas respondem aos herbívoros pertencentes a diferentes guildas alimentares ativando essas distintas vias de transdução de sinal. Em geral, acredita-se que os insetos mastigadores, como as lagartas, induzem a via de defesa do JA, enquanto insetos sugadores de floema, como pulgões e moscas brancas, induzem a via do SA (Walling, 2000, 2008; De Vos et al., 2005; Zarate et al., 2007). As interações entre essas duas vias têm sido muitas vezes demonstradas (Arimura et al., 2005; Bruessow, et al., 2010; Schweiger et al., 2014) sugerindo que os herbívoros que induzem diferentes vias defensivas podem aumentar ou afetar negativamente o desempenho do co-atacante (Rodriguez-Saona et al., 2010; Bruessow et al., 2010; Soler et al., 2012) por serem diferencialmente sensíveis às defesas mediadas por diferentes vias de interação (Thaler et al., 2002, Thaler et al., 2012).

Tem sido proposto que os afídeos manipulam defesas vegetais suprimindo aquelas dependentes do JA, por meio do *cross-talk* SA-JA, e ativando a via do SA (Zhu-Salzman et al., 2004, De Vos et al., 2007). Uma redução significativa na concentração do JA em plantas infestadas com afídeos, juntamente com a baixa expressão dos genes ativadores do JA em plantas com pulgões, sugere que a facilitação é mediada por interferência com a transdução do sinal (Soler et al., 2012). Pulgões e moscas brancas foram relatados por induzir níveis de SA que, posteriormente, enfraqueceram respostas relacionadas ao JA mediadas pelo *cross-talk* entre as vias de sinalização de defesa (Walling, 2008; Giordanengo et al., 2010). Apesar de ampla informação disponível sobre o papel do SA e do JA na resposta de plantas a certos patógenos e insetos, a informação é específica para uma determinada interação planta-patógeno ou planta-inseto.

Aqui foi demonstrado que prévia infestação de *S. frugiperda* parece não induzir mudanças na qualidade da planta para *R. maidis* de modo a afetar negativamente seu comportamento alimentar e desempenho demográfico. Estudos moleculares anteriores sugerem que a saliva dos insetos sugadores de floema pode conter efetores que suprimem ativamente o JA (De Vos et al., 2005; De Vos, et al., 2007; Zhang et al., 2009). Essas proteínas efetoras presentes na saliva dos afídeos interagem com as proteínas da planta hospedeira, a fim de suprimir as defesas e melhorar o desempenho do pulgão (Rodriguez & Bos, 2013).

Por fim, os resultados deste trabalho indicam que as defesas induzidas pela prévia infestação de *S. frugiperda* em plantas de milho não afetam negativamente o desempenho e comportamento alimentar de *R. maidis*. Contudo, sabe-se que as interações entre plantas e insetos são complexas e específicas. Portanto, mais estudos são necessários para a compreensão da interação entre essas diferentes vias de defesa das plantas de milho induzidas por *S. frugiperda* e *R. maidis*, a fim de elucidar se essa interação está favorecendo a competição ou a facilitação entre esses dois herbívoros, e assim contribuir para o desenvolvimento de estratégias otimizadas de proteção da cultura do milho. Além disso, futuros experimentos devem ser conduzidos para averiguar se este ocorrido é também evidenciado em plantas de milho geneticamente modificadas (milho Bt), permitindo evidenciar se a transgenia altera a resposta induzida ou o comportamento do pulgão.

## Tabelas e Figura de Resultados do Capítulo 2

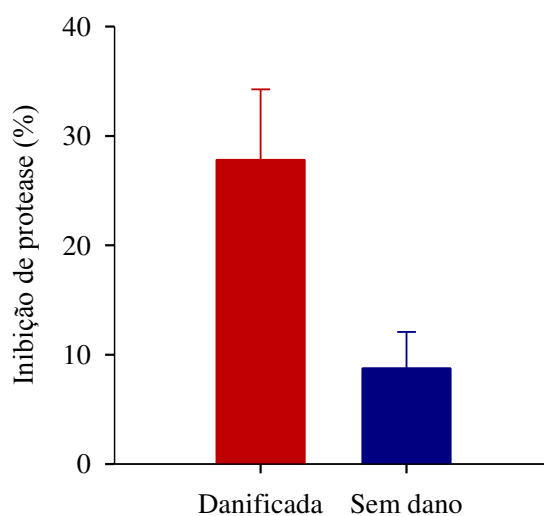


Figura 1. Percentual de inibição de proteases em plantas de milho submetidas a prévia herbivoria (danificadas) e sem herbivoria (sem dano) de *S. frugiperda*. Os dados são média  $\pm$  erro padrão.

Tabela 2. Variáveis não-sequenciais do EPG (média  $\pm$  erro) descrevendo o comportamento alimentar de *R. maidis* em plantas de milho danificadas e sem dano de *S. frugiperda*.

Variável	Planta	PPW	NWEI	P	WDI	P	WDE	P
Np	Danificada	20/20	7,60 $\pm$ 1,03	0,47	49,19 $\pm$ 9,82	0,57	6,47 $\pm$ 0,59	0,23
	Sem dano	20/20	6,15 $\pm$ 0,73		35,31 $\pm$ 6,31		5,74 $\pm$ 0,53	
Prova	Danificada	20/20	7,55 $\pm$ 1,02	0,44	430,81 $\pm$ 9,82	0,57	57,06 $\pm$ 4,89	0,96
	Sem dano	20/20	6,00 $\pm$ 0,72		444,70 $\pm$ 631		75,12 $\pm$ 6,64	
C	Danificada	20/20	12,05 $\pm$ 1,31	0,24	216,18 $\pm$ 20,15	0,37	17,11 $\pm$ 1,11	0,83
	Sem dano	20/20	9,80 $\pm$ 1,05		231,71 $\pm$ 18,30		23,64 $\pm$ 1,71	
Pd	Danificada	20/20	103,8 $\pm$ 11,39	0,42	8,80 $\pm$ 0,92	0,53	0,08 $\pm$ 0,00	< 0,01
	Sem dano	20/20	99,25 $\pm$ 10,91		8,52 $\pm$ 0,81		0,09 $\pm$ 0,00	
E1	Danificada	20/20	4,80 $\pm$ 0,45	0,09	4,37 $\pm$ 0,52	0,19	0,91 $\pm$ 0,05	0,79
	Sem dano	20/20	4,05 $\pm$ 0,39		3,60 $\pm$ 0,36		0,89 $\pm$ 0,04	
E2	Danificada	20/20	3,30 $\pm$ 0,33	0,23	228,07 $\pm$ 21,99	0,81	65,66 $\pm$ 9,67	0,53
	Sem dano	20/20	2,90 $\pm$ 0,25		205,96 $\pm$ 21,05		71,02 $\pm$ 10,04	
sE2	Danificada	20/20	1,65 $\pm$ 0,20	0,64			129,66 $\pm$ 17,39	< 0,01
	Sem dano	20/20	1,70 $\pm$ 0,14				119,40 $\pm$ 15,08	

PPW, proporção de indivíduos que produziram o tipo de onda; NWEI, número de onda por inseto; WDI, duração (minuto) da onda por inseto; WDE, duração (minuto) da onda por evento. Np: não-prova; Prova: atividade de provas; C: caminamento estiletar intercelular; Pd: punctura estiletar intracelular; E1: salivagem no floema; E2: ingestão da seiva do floema; sE2: ingestão da seiva do floema durante um tempo maior de 10 minutos. Comparação estatística feita pelo Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 3. Variáveis sequenciais do EPG (média  $\pm$  erro) descrevendo o comportamento alimentar de *R. maidis* em plantas de milho danificadas e sem dano de *S. frugiperda*.

Variável Sequencial	Planta	PPW	NWEI	<i>P</i>	WDI	<i>P</i>
Tempo para a 1ª prova desde o início do EPG	Danificada	20/20			8,10 $\pm$ 1,22	0,45
	Sem dano	20/20			6,72 $\pm$ 1,14	
Tempo da 1ª prova para a 1ª E	Danificada	20/20			87,38 $\pm$ 12,31	0,36
	Sem dano	20/20			88,74 $\pm$ 9,02	
Tempo desde o início do registro para a 1ª E	Danificada	20/20			51,22 $\pm$ 7,65	0,07
	Sem dano	20/20			54,54 $\pm$ 5,78	
Duração da 1ª prova	Danificada	20/20			88,93 $\pm$ 26,44	0,96
	Sem dano	20/20			78,13 $\pm$ 19,95	
Duração da 2ª prova	Danificada	19/20			47,72 $\pm$ 10,16	0,07
	Sem dano	19/20			115,38 $\pm$ 23,25	
Duração total de E1 seguida por E2	Danificada	20/20			2,14 $\pm$ 0,21	0,83
	Sem dano	20/20			2,21 $\pm$ 0,17	
Duração total de E1 seguida por E2 maior que 10min	Danificada	20/20			1,17 $\pm$ 0,12	0,158
	Sem dano	20/20			1,34 $\pm$ 0,11	
Número de provas curtas menores que 3min (C < 3min)	Danificada	12/20	2,45 $\pm$ 0,56	0,95		
	Sem dano	15/20	1,75 $\pm$ 0,31			
Número de provas até a 1ª E	Danificada	20/20	2,85 $\pm$ 0,34	0,636		
	Sem dano	20/20	2,25 $\pm$ 0,22			
Número de provas após a 1ª E	Danificada	18/20	4,70 $\pm$ 0,78	0,434		
	Sem dano	17/20	3,75 $\pm$ 0,65			
Número de provas curtas (menores que 3 min) após a 1ª E	Danificada	8/20	1,4 $\pm$ 0,38	0,311		
	Sem dano	10/20	1,05 $\pm$ 0,24			

PPW, proporção de indivíduos que produziram o tipo de onda; NWEI, número de onda por inseto; WDI, duração (minuto) da onda por inseto. Prova: atividade de provas; E1: salivagem no floema; E2: ingestão da seiva do floema. Comparação estatística feita pelo Teste U de Mann-Whitney.

Tabela 4. Parâmetros demográficos e períodos de desenvolvimento do pulgão *R. maidis* mantidos em plantas de milho danificadas ou sem dano de *S. frugiperda*.

Variável/parâmetro*	Planta danificada	Planta sem dano	<i>P</i>
Pré-reprodutivo (PPR)	6,60 ± 0,12	6,40 ± 0,11	0,300
$r_m$ (fêmeas/fêmeas/dia)	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,734
Tempo médio de geração (T)	8,94 ± 0,16	8,67 ± 0,11	0,300
Nº de ninfas totais (NT)	36,7 ± 1,20	34,70 ± 1,48	0,375

\*Média e erro padrão de um tamanho amostral de  $n = 20$ . Foi realizado Teste t de Student (variáveis normais –  $r_m$ , RGR e NT) ou Teste U de Mann-Whitney (variáveis não normais – PPR e TD).

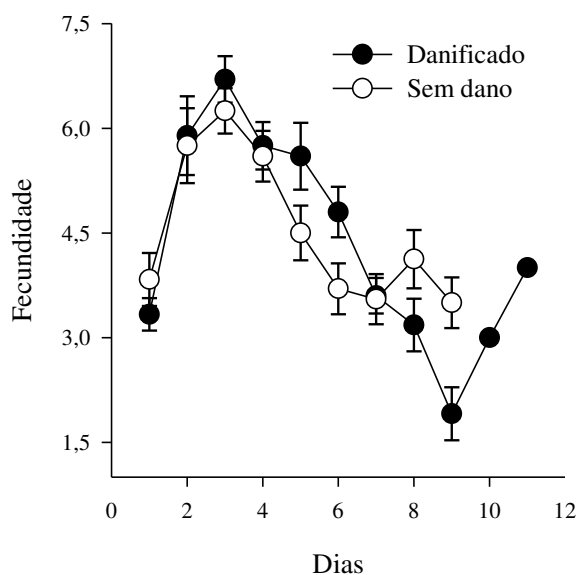


Figura 2. Número médio de ninfas de *R. maidis* nascidas e mantidas em plantas de milho danificadas e sem dano de *S. frugiperda*. Os pontos de dados são médias ± EP.

## REFERÊNCIAS

- Acevedo, F.E., Rivera-Veja, L.J.; Chung, S.H.; Ray, S.; Felton, G.W. Cues from chewing insects — the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. **Current Opinion in Plant Biology**, v.26, p.80–86, 2015.
- Ali, J.G.; Agrawal, A.A. Asymmetry of plant-mediated interactions between specialist aphids and caterpillars on two milkweeds. **Functional Ecology**, p.1-9, 2014.
- Arimura, C.; Kost, G.; Boland, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.734(2), p.91-111, 2005.
- Backus, E.A.; Cline, A.R.; Ellerseick, M.R.; Serrano, M.S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of non-sequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, p.296–310, 2007.
- Broekgaarden, C.; Voorrips, R.E.; Dicke, M.; Vosman, B. Transcriptional responses of *Brassica nigra* to feeding by specialist insects of different feeding guilds. **Insect Science**, v.18, p.259–272, 2011 (doi 10.1111/j.1744-7917.2010.01368.x).
- Bruessow, F.; Gouhier-Darimont, C.; Buchala, A.; Mettraux, J-P.; Reymond, P. Insect eggs suppress plant defence against chewing herbivores. **The Plant Journal**, v.62, p.876–885, 2010 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04200.x).
- Chuang, W.P.; Ray, S.; Acevedo, F.E.; Peiffer, M.; Felton, G.W.; Luthe, D.S. Herbivore cues from the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) larvae trigger direct defenses in maize. **e-Xtra**. v.27(5), p. 461–470, 2014.
- Cichocka, E.; Goszczyński, W.; Lubiarski, M. Chemical and physiological changes caused by aphids feeding on their host plants. **Polish Journal of Entomology**, v.84, p.233–248, 2015.
- Denno, R.F.; McClure, M.S.; Ott, J.R. Interspecific interactions in phytophagous insects: Competition reexamined and resurrected. **Annual Review of Entomology**, v.40, p.297-331, 1995.
- De Vos, M.; Oosten, V.R.V.; Poecke, R.M.P.V.; Pelt, J.A.V.; Pozo, M.J.; Mueller, M.J. Buchala, A.J.; Métraux, J.L.C.; Loon, V.; Dicke, M.; Pieterse, C.M.J. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. **e-Xtra**, v.18(9), p.923-937, 2005.
- De Vos, M.; Kim, J.H.; Jander, G. Biochemistry and molecular biology of *Arabidopsis*-aphid interactions. **Bioessays**, v.29(9), p.871-883, 2007.
- Dicke, M.; van Loon, J.J.A.; Soler, R. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology**, v.5, p.317-324, 2009.

- Erb, M.; Meldau, S.; Howe, G.A. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. **Trends in Plant Science**, v.17(5), 2012.
- Fereres, A. Perspective insect vectors as drivers of plant virus emergence. **Current Opinion in Virology**, v.10, p.42–46, 2015.
- Fereres, A.; Moreno, A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research**, v.141, p.158–168, 2009.
- Fisher, R.A. Some remarks on the methods formulated in a recent article on “The quantitative analysis of plant growth”. **Annals of Applied Biology**, v.7, p.367–372, 1921.
- Goggin, F.L. Plant–aphid interactions: molecular and ecological perspectives. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.399–408, 2007.
- Giordanengo, Philippe.; Brunissen, L.; Rusterucci, C.; Vincent, C.; van Bel, Aart.; Dinant, S.; Gironse, C.; Faucher, M.; Bonnemain, J-L. Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, 516–523, 2010.
- Hagenbucher, S.; Wäckers, F.L.; Wettstein, F.E.; Olson, D.M.; Ruberson, J.R.; Romeis, J. Pest trade-offs in technology: reduced damage by caterpillars in Bt cotton benefits aphids. **Proceeding of the Royal Society B**, v.280, p.1-8, 2013 (doi:10.1098/rspb.2013.0042).
- Hogenhout, S.A.; Bos, J.I.B. Effector proteins that modulate plant–insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.14, p.422–428, 2011.
- Han, Y.; Wang, Y.; Bi, J.L.; Yang, X.Q.; Huang, Y.; Zhao, X.; Hu, Y.; Cai, Q.N. Constitutive and induced activities of defense related enzymes in aphid-resistant and aphid-susceptible cultivars of wheat. **Journal of Chemical Ecology**, v.35, p.176–182, 2009.
- Howe, G.A.; Jander, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.41-66, 2008.
- Jaouannet, M.; Rodriguez, P.A.; Thorpe, P.; Lenoir, C.J.G.; MacLeod, R.; Escudero-Martinez, C.; Bos J.I.B. Plant immunity in plant–aphid interactions. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p.1-10, 2014.
- Kakade, M.L.; Rackis, J.J.; McGhee, J.E.; Puski, G. Determination of trypsin-inhibitor activity of soy products – collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p.376–382. 1974.
- Kant, M.R.; Ament, K.; Sabelis, M.W.; Haring, M.A.; Schuurink, R.C. Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. **Plant Physiology**, v.135, p.483–495, 2004.

- Kaplan, I.; Denno, R.F. Interspecific interactions in phytophagous insects: A quantitative assessment of competition theory. **Ecology Letters**, v.10, p.977-994, 2007.
- Kessler, A.; Baldwin, I.T. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.299–328, 2002.
- Meihls, L.N.; Kaur, H.; Jander, G. Natural variation in maize defense against insect herbivores. **Cold Spring Harb Symposia on Quantitative Biology**, v.77, p.269-283, 2012.
- Mewis, I.; Tokuhisa, J.G.; Schultz, J.C.; Appel, H.M.; Ulrichs, C.; Gershenzon, J. Gene expression and glucosinolates accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathway. **Phytochemistry**, v.67, p.2450-2462, 2006.
- Mithöfer, A.; Boland, W. Recognition of Herbivory-Associated Molecular Patterns. **Plant Physiology**, v. 146, p. 825–831, 2008.
- Moreno, A.; Garzo, E.; Fernandez-Mata, G.; Kassem, M.; Aranda, M.A.; Fereres, A. Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.139, p.145–153, 2011.
- Ohgushi, T. Indirect interaction webs: herbivore-induced effects through change in plants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.36, p.81–105. 2005 (doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175523).
- Oliveira, E.F.; Pallini, A.; Janssen, A. Herbivores with similar feeding modes interact through the induction of different plant responses. **Oecologia**, 2015 (doi:10.1007/s00442-015-3344-0).
- Radford, P.J. Grown analysis formulae – their use and abuse. **Crop Science**, v.7, p.171-175, 1967.
- Rodriguez, P.A.; Bos, J.I. Toward understanding the role of aphid effectors in plant infestation. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.26(1), p.25–30. 2013.
- Rodriguez-Saona, C.; Crafts-Brandner, S.J.; Canas, L.A. Volatile emissions triggered by multiple herbivore damage: beet armyworm and whitefly feeding on cotton plants. **Journal of Chemical Ecology**, v.29, p.2539-2550, 2010.
- Ryan, C.A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-49, 1990.

- Sarria, E.; Cid, M.; Garzo, E.; Fereres, A. Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.67, p. 35–42, 2009.
- SAS Institute. SAS user's manual, version 9.3. SAS Institute, Cary NC. 2011.
- Schweiger, R.; Heise, A.M.; Persicke, M.; Müller, C. Interactions between the jasmonic and salicylic acid pathway modulate the plant metabolome and affect herbivores of different feeding types. **Plant, Cell and Environment**, v.37, p.1574–1585, 2014.
- Soler, R.; Badenes-Pérez, F.R.; Broekgaarden, C.; Zheng, S-J.; David, A.; Boland, W.; Dicke, M. Plant-mediated facilitation between a leaf-feeding and a phloem-feeding insect in a brassicaceous plant: from insect performance to gene transcription. **Functional Ecology**, v.26, p.156–166, 2012.
- Stam, J.M.; Kroes, A.; Li, Y.; Gols, R.; van Loon, J.J.A.; Poelman, E.H.; Dicke, M. Plant interactions with multiple insect herbivores: From community to genes. **Annual Review of Plant Biology**, v.65, p.689-713, 2014.
- Steffey, K.; Rice, M.E.; All, J.; Andrew, D.A.; Gray, M.E.; Van, D.J.W. (eds.). **Handbook of Corn Insects**. Entomological Society of America, Lanham, MD. 1999.
- Tamayo, M.C.; Rufat, Mar.; Bravo, J.M.; Segundo, B.S. Accumulation of a maize proteinase inhibitor in response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. **Planta**, v.211, p.62-71, 2000.
- Thaler, J.S.; Fidantsef, A.L.; Bostock, R.M. Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: Effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, p.1131–1159, 2002.
- Thaler, J.S.; Humphrey, P.T.; Whiteman, N.K. Evolution of jasmonate and salicylate signal cross-talk. **Trends in Plant Science May**, v.17(5), 2012.
- Thivierge, K.; Prado, A.; Driscoll, B.T.; Bonneil, É.; Thibault, P.; Bede, J.C. Caterpillar- and salivary-specific modification of plant proteins. **Journal of Proteome Research**, v.9, p.5887-5895, 2010.
- Tjallingii, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.24, p.721–730, 1978.
- Tjallingii, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks AK, Harrewijn, eds. *Aphids, their biology, natural enemies and control*, v.2B. Elsevier, Amsterdam, p.95–108, 1988.
- Tremacoldi, C.R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009.

- Walling, L.L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.19, p.195–216, 2000.
- Walling, L.L. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. **Plant Physiology**, v.146, p.859–866, 2008.
- War, A.R.; Paulraj, M.G.; Ignacimuthu, S.; Sharma, H.C. Defensive responses in groundnut against chewing and sap-sucking insects. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.32, p.259–272, 2013.
- Wyatt, I.J.; White, P.F. Simple estimation of intrinsic increase rate for aphids and Tetranychid mites. **Journal of Applied Ecology**, v.14, p.757-766, 1977.
- Zarate, S.I.; Kempema, L.A.; Walling L.L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology**, v. 143, p.866–875, 2007.
- Zebelo, S.A.; Maffei, M.E. Role of early signalling events in plant–insect interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 66(2), p. 435–448, 2015.
- Zhang, P-J.; Zheng, S-J.; van Loon, J.J.A.; Boland, W.; David, A.; Mumm, R.; Dicke, M. Whiteflies interfere with indirect plant defense against spider mites in Lima bean. **Pnas**, v.106(50), p. 21202–21207, 2009.
- Zhu-Salzman, K.; Salzman, R.A.; Ahn, J-E.; Koiwa, H. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. **Plant Physiology**, v.134, p.420–431, 2004.
- Zhu-Salzman, K.; Zeng, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v.60, p.233–252, 2015.

### Capítulo 3: Soja Bt Cry1Ac Favorece o Crescimento Populacional de *Bemisia tabaci*

#### RESUMO

Plantas transgênicas Bt são efetivas no manejo de lepidópteros-alvo, mas pouco se conhece sobre o efeito destas plantas em insetos sugadores. Neste trabalho foram comparados o comportamento alimentar de *Bemisia tabaci* Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em plantas de soja Bt Cry1Ac e não-Bt, usando a técnica do monitoramento eletrônico (*Electrical Penetration Graph* - EPG) e o efeito dessas plantas no desempenho demográfico da mosca branca. Grupos de dez ovos por planta foram monitorados até a emergência dos adultos, avaliando-se a duração das fases de ovo e ninfa. Após a emergência, casais ( $n = 14$ ) foram avaliados para determinação da fecundidade e fertilidade das fêmeas, e seus descendentes monitorados até a fase adulta. Moscas brancas alimentadas com plantas da variedade de soja Bt apresentaram maior período de incubação e menor duração da fase ninfal, mas o período total de ovo a adulto não foi afetado em relação ao controle. Experimentos de tabela de vida demonstraram que moscas brancas mantidas em soja Bt produziram o dobro de fêmeas por geração ( $R_o$ ) comparada aquelas mantidas em soja não-Bt, com um aumento de 14,71% na taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ). O tempo para que a população dobre o tamanho ( $DT$ ) foi 1,15 vezes mais rápido para *B. tabaci* mantida em soja expressando a proteína Cry1Ac. Além disso, moscas brancas colocaram 99,27% mais ovos em plantas de soja Bt do que em não-Bt. No comportamento alimentar houve diferenças na duração das formas de ondas por evento, sendo que o tempo médio de salivação (E1) e de ingestão do floema (E2 e E2 sustentada) foi maior em soja Bt. Assim, estas evidências permitem concluir que a variedade de soja Bt, expressando a proteína Cry1Ac, favorece o crescimento populacional de *B. tabaci*, e pode aumentar a disseminação de fitovirose pelo inseto, embora seja necessário mais pesquisas para entender se tal efeito é devido à transgenia ou à variedade de soja em que se encontra transgene *cry1Ab*.

**Palavras chave:** sugador, cultura transgênica, monitoramento eletrônico.

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas geneticamente modificadas tem apresentado grande destaque no cenário agrícola mundial. A área cultivada global com variedades transgênicas tem aumentado mais de cem vezes, de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 181,5 milhões de hectares em 2014, isto torna faz com que as cultivares transgênicas sejam a tecnologia agrícola mais adotada nos últimos tempos (James, 2014). Em 2104, o Brasil ficou em segundo lugar, perdendo somente para os Estados Unidos em área cultivada com transgênicos no mundo, com 42,2 milhões de hectares (acima dos 40,3 milhões registrados em 2013). Neste mesmo ano, o Brasil plantou comercialmente pelo segundo ano, a primeira soja (*Glycine max* (L.) Merrill) combinada com resistência a inseto (Bt) e tolerância a herbicida em 5,2 milhões de hectares, substancialmente ultrapassando os 2,2 milhões de hectares em 2013 (James, 2014). No Brasil a soja foi o produto que mais contribuiu para o crescimento econômico de 2014, com faturamento bruto de R\$ 15 bilhões e com uma exportação estimada de 46,7 milhões de toneladas ficando a frente dos Estados Unidos que comercializaram cerca de 46,3 milhões de toneladas da oleaginosa (SEAB, 2014).

Porém, mesmo com o uso das plantas geneticamente modificadas, os artrópodes continuam a ser uma ameaça constante para a produção agrícola, tanto no campo quanto após a colheita. O uso de cultivos transgênicos que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tornaram-se a principal ferramenta para o manejo de algumas pragas (Sanahuja et al., 2011), que beneficiou tanto os produtores pela proteção das culturas quanto o ambiente pela redução no uso de inseticidas (Stokstad & Grullon, 2013). No entanto, toxinas Bt geralmente não são eficazes contra insetos sugadores, e populações de algumas espécies têm aumentado dramaticamente associados a essa diminuição do uso de inseticida (Li et al., 2010; Lu et al., 2010, Yang et al., 2014).

Na cultura da soja, a expressão da proteína Cry1Ac é eficaz contra as quatro principais lagartas que atacam esta cultura: Lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*), lagarta falsa medideira (*Chrysodeixis includens* e *Rachiplusia nu*), lagarta das maçãs (*Heliothis virescens*) e broca das axilas ou broca dos ponteiros (*Crociosema aporema*), além de supressão às lagartas do tipo Elasm (*Elasmopalpus lignosellus*) e Helicoverpa (*H. zea* e *H. armigera*) (Navarro, 2013). Por outro lado, os artrópodes

sugadores de importância secundária, não são afetadas pela toxina (Catarino et al., 2015) e podem minar benefícios econômicos e ecológicos de plantas Bt.

*Bemisia tabaci* tem sido considerada uma espécie complexa. Ela chegou à fama mundial na década de 1980, devido à invasão pelo comumente chamado biótipo B. Desde então, a erupção concomitante de um grupo de vírus de plantas conhecidas como begomovirus criou problemas consideráveis de gestão em muitos países (De Barro et al., 2011). Esta é uma das mais graves pragas agrícolas em todo o mundo. É altamente polífaga, capaz de causar vários distúrbios fisiológicos, e é um vetor de vírus que atacam várias culturas de interesse econômico, gerando perdas anuais significativas (Perring, 2001; Ning et al., 2015). No Brasil, *B. tabaci* tem sido um problema esporádico na cultura da soja por um longo tempo; no entanto, com a chegada do biótipo B relativamente agressiva na década de 1990 (Lourenção & Nagai, 1994), a soja se tornou um grande hospedeiro (Lima & Lara, 2004; Berlinger, 1986). Enquanto suga a seiva das plantas, a mosca branca excreta uma solução açucarada, levando ao desenvolvimento de colônias de fungos (*Capnodium* sp.) capazes de reduzir a capacidade fotossintética da planta, reduzindo também a sua produtividade (Suekane et al., 2013).

Na cultura da soja, além da formação de fumagina há também o dano indireto que está relacionado a transmissão do vírus da necrose da haste. Os sintomas causados pela necrose da haste são inicialmente um mosaico e enrugamento das folhas, deformação do limbo foliar, posteriormente o aparecimento de uma acronecrose, curvatura e necrose do broto, seguido de necrose da haste, necrose do pecíolo e algumas vezes até a morte da planta (Marubayashi, 2010).

Portanto, considerando a relevância econômica da cultura da soja e da praga *B. tabaci* (Biótipo B) para o Brasil e para o mundo, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o comportamento alimentar de *B. tabaci* em plantas de soja Bt e não-Bt, utilizando a técnica do monitoramento eletrônico (Electrical Penetration Graph – EPG) e avaliar o efeito dessas plantas no desempenho demográfico da mosca branca.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Insetos e plantas

Adultos de *B. tabaci* foram obtidos da criação de laboratório, gerada a partir de indivíduos mantidos em plantas de couve. Para os experimentos, os insetos foram criados em plantas de soja Bt e não-Bt, cobertas com um cilindro plástico transparente de 50cm de altura e 20cm de diâmetro fechado na parte superior com uma manga lateral, utilizando um tecido de nylon. Os cilindros foram acondicionados em câmara climatizada com temperatura 25°C, UR 70% e fotoperíodo 16:8h (luz: escuro).

Os experimentos foram conduzidos usando plantas de soja Bt, expressando a proteína Cry1Ac (M-SOY8330IPRO) e plantas de soja não-Bt (M-SOY8866) quando as mesmas apresentavam dois trifolíolos. Ambas possuem a tecnologia INTACTA RR2 PRO™ que conferem tolerância ao herbicida glifosato, porém somente a M-SOY8330IPRO possui a proteína Cry1Ac que também confere resistência a um complexo de lagartas na cultura da soja. As sementes foram plantadas em vasos de 13 cm de diâmetro utilizando uma mistura de partes iguais de solo e substrato vegetal. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e regadas diariamente.

### Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar

O comportamento alimentar de *B. tabaci* foi registrado utilizando a técnica do Electrical Penetration Graph (EPG), usando o amplificador Giga-8 (Sistemas de EPG, Wageningen, Holanda) (Tjallingii, 1978, 1988). Esta técnica foi utilizada para monitorar o comportamento alimentar de fêmeas adultas em plantas de soja Bt e não-Bt.

Antes de iniciar as gravações, as moscas brancas foram submetidas a um curto tratamento a frio para imobilizá-las e facilitar o manuseio. Em seguida, um fio de ouro extra fino (12,5 µm de diâmetro e 2 cm de comprimento) foi ligado ao dorso da mosca branca com uma pequena gota de cola prata à base de água. O extremo oposto do fio de ouro foi ligado a um eletrodo de cobre que foi conectado ao amplificador de entrada (Tjallingii, 1985; Tjallingii, 1988) e as moscas brancas

foram colocadas na face inferior da folha das plantas. O procedimento de aquisição de ondas do EPG foi realizado dentro de uma gaiola Faraday para evitar interferências elétricas.

A aquisição de dados do EPG foi conduzida utilizando Stylet+Software para Windows (EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). Os registros foram obtidos durante 8h (480 min) sob condições de laboratório (25-28°C) iniciando imediatamente após as moscas serem colocadas sobre a folha de soja. Formas de ondas do EPG para as moscas brancas foram as mesmas como descrita anteriormente por Rodríguez-López et al., (2012): forma de onda Np, comportamento de não-prova (estiletos sem contato com o tecido foliar); forma de onda C, caminamento estiletar intercelular apoplástico, onde os insetos mostram uma atividade cíclica de inserção mecânica dos estiletos e secreção de saliva; Pd, punctura estiletar intracelular, durante a fase C. Além disso, duas formas de onda relacionadas com a atividade no floema foram registradas: Forma de onda E1, salivagem no floema, iniciando a fase do floema (Jiang et al., 2000); e forma de onda E2, correlacionada com a absorção passiva a partir da seiva do floema que é comparável à forma de onda E2 de pulgões (Prado & Tjallingii, 1994). Além disso, a forma de onda G foi observada em gravações do EPG, o que representa o consumo ativo de água a partir de elementos do xilema (Spiller et al., 1990). O termo “prova” refere-se a qualquer tipo de evento durante o período em que o estilete do inseto está em contato com o tecido da planta, e “não-prova” refere-se ao caso em que nenhum contato entre os estiletos e o tecido da planta é observado (Rodríguez-López et al., 2012).

Vinte repetições por tratamento (plantas de soja Bt e não-Bt) foram registradas. Cada repetição (moscas e plantas individuais) foi realizada usando uma planta e uma mosca branca diferente para cada gravação do EPG. Todas as variáveis comportamentais foram processadas usando o MS Excel Workbook para o cálculo automático dos dados do EPG, desenvolvido por Sarria et al. (2009). A análise dos dados foi realizada para variáveis relevantes do EPG para um período de 8h de gravação.

Variáveis selecionadas do EPG (Tabela 1) foram calculadas e comparadas entre os tratamentos como descrito em Backus et al., (2007): PPW, proporção de indivíduos que produziram o tipo de forma de onda; NWEI, número de eventos de

forma de onda por inseto; WDI, duração da forma de onda (min) por inseto; e WDE, duração da forma de onda (min) por evento.

Tabela 1. Variáveis não-sequenciais e sequenciais do EPG para comparar o comportamento alimentar de *B. tabaci* sobre plantas de soja Bt e não-Bt.

<b>Variáveis não-sequenciais</b>	<b>Variáveis sequenciais</b>
Número de não-prova	Tempo para a 1ª prova desde o início do EPG
Número de prova	Tempo da 1ª prova para a 1ª E
Número de C	Tempo desde o início do registro para a 1ª E
Número de pd	Duração da 1ª prova
Número de E1	Duração da 2ª prova
Número de E2	Duração total de E1 seguida por E2
Número de E2 maior que 10min	Duração total de E1 seguida por E2 maior que 10min
Duração total de não-prova	Número de provas curtas menores que 3min (C < 3min)
Tempo total de prova	Número de provas até a 1ª E
Duração total de C	Número de provas após a 1ª E
Duração total de pd	Número de provas curtas (< 3 min) após a 1ª E
Duração total de E1	
Duração total de E2	

### **Efeito da soja Bt no desempenho de *B. tabaci***

Grupos de dez adultos foram individualizados na face abaxial das folhas de soja Bt e não-Bt utilizando *clipcages*. Vinte e quatro horas após, as moscas e os *clipcages* foram removidas deixando dez ovos por planta (n = 14), que foram monitorados até a emergência dos adultos. As avaliações foram feitas diariamente, observando-se a duração das fases de ovo e ninfa. Após a emergência, foram formados casais, individualmente, utilizando um *clipcage*. Os casais (n = 14) foram observados diariamente, para determinação da fecundidade e fertilidade das fêmeas. Os experimentos foram realizados em câmara climatizada com temperatura 25°C, UR 70% e fotoperíodo 16:8h (luz: escuro).

Os parâmetros relacionados ao crescimento populacional foram calculados usando a informação dos dados de fecundidade e número de descendentes produzidos. Para os dois tratamentos os parâmetros calculados com a tabela de

fertilidade foram taxa líquida reprodutiva (produção de fêmeas por fêmea parental,  $R_0$ ), tempo médio de uma geração (T), taxa intrínseca de crescimento populacional (produção diária de fêmeas por fêmea parental,  $r_m$ ) e tempo médio para que a população dobre o tamanho (DT). Estes parâmetros foram determinados usando o método descrito por Maia et al., (2000) no programa SAS (SAS Institute, 2011).

Os dados de sobrevivência foram utilizados para construção de curvas de sobrevivência, por meio do programa SAS Institute (2011).

### **Análise estatística**

Para todos os dados foi empregada a análise de resíduo para verificar se os pressupostos de homogeneidade de variância e normalidade foram atendidos (Proc Mixed, Proc Univariate, Proc GPlot) (SAS Institute, 2011). Dados de fecundidade foram comparados entre os tratamentos por meio do teste t de Student (variáveis normais). Procedimento semelhante foi realizado para as durações das fases imaturas usando dados transformados em raiz(x+1), uma vez que não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade. As variâncias associadas com os parâmetros de crescimento populacionais foram estimadas pelo método de Jackknife, utilizando a programação em SAS desenvolvida por Maia et al., (2000). O programa permite o cálculo dos intervalos de confiança para todos os parâmetros estimados e fornece testes t unilaterais e bilaterais para realizar a comparação pareada ou múltipla entre grupos usando seus respectivos valores de  $P$ .

Os dados de sobrevivência foram utilizados para construção de curvas de sobrevivência por meio do Proc Lifetest do SAS Institute (2011). Este procedimento estima curvas de sobrevivência usando estimadores de Kaplan-Meier gerados a partir da proporção de ninfas sobreviventes de *B. tabaci* desde o início até ao fim do experimento e fornece testes de  $\chi^2$  para comparação dos grupos.

Todas as variáveis comportamentais obtidas por gravação do EPG foram comparadas entre os tratamentos por meio do teste t de Student (variáveis normais) ou pelo teste U de Mann-Whitney (para variáveis não normais) usando o programa SAS Institute (2011).

## RESULTADOS

### Monitoramento eletrônico do comportamento alimentar

Foi avaliado o comportamento e atividade estiletar de *B. tabaci* em plantas de soja Bt e não-Bt. Os resultados das variáveis não sequenciais indicaram que não existem diferenças significativas no número (NWEI) e duração (WDI) dos tipos de ondas por inseto (Tabela 2). Registros do EPG indicaram que existem diferenças para as durações das formas de ondas por evento (WDE) (Tabela 2). A duração média do evento “prova” foi significativamente mais longo em moscas das plantas Bt do que em não-Bt ( $Z = 3,29$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,001$ ). Além disso, foram encontradas diferenças significativas na duração média de “C”, sendo menor para moscas brancas mantidas em soja Bt ( $Z = -4,38$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ).

Embora não houve diferenças significativas no número (NWEI) e duração (WDI) de “pd” por inseto, diferenças foram observadas na duração por evento (WDE). A duração média de provas intracelulares foi menor para moscas mantidas na soja Bt ( $Z = -3,43$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,0001$ ). Diferenças também foram observadas para durações de E1, E2 e E2 sustentada, por evento (WDE). A duração média de salivação (E1) e de ingestão do floema (E2 e E2 sustentada) foi significativamente maior para *B. tabaci* mantida em soja Bt (E1:  $Z = -6,42$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ; E2:  $Z = -28,74$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ; sE2:  $Z = -4,48$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ), indicando que há maior probabilidade das moscas alimentadas em soja Bt transmitirem virose a planta.

Para as variáveis sequenciais do EPG, que descrevem a sequência de eventos relacionados, durante as oito horas de gravação, não foram registradas diferenças significativas para nenhuma destas variáveis.

### Efeito da soja Bt no desempenho de *B. tabaci*

Diferenças significativas foram observadas para as durações das fases de ovo ( $t = 2,17$ ,  $gl = 26$ ,  $P = 0,039$ ) e de ninfa ( $t = -2,59$ ,  $gl = 26$ ,  $P = 0,015$ ) entre indivíduos alimentados em soja Bt e não-Bt (Tabela 3). O período de incubação foi significativamente maior para indivíduos que foram mantidos em plantas de soja Bt, sendo a duração da fase ninfal prolongada em um dia nos insetos alimentados em

plantas não-Bt (Tabela 2). Contudo, não foram observadas diferenças significativas no período total de ovo a adulto entre os tratamentos ( $t = -1,78$ ,  $gl = 26$ ,  $P = 0,087$ ).

Resultados de crescimento populacional demonstraram diferenças significativas para todos os parâmetros demográficos, exceto para o tempo de geração (Tabela 4). O número de fêmeas produzidas por fêmea parental ( $R_o$ ) foi 99% maior em moscas brancas mantidas em plantas de soja Bt do que aquelas mantidas em soja não-Bt. Da mesma forma, houve um crescimento de 14,71% na taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ) para moscas de soja Bt. Já o tempo para que a população dobre o tamanho ( $DT$ ) foi 1,15 vezes mais rápido para *B. tabaci* mantida em soja expressando a proteína Cry1Ac. Diferenças também foram observadas nos resultados de fecundidade ( $t = 2,78$ ;  $gl = 26$ ;  $P = 0,010$ ). Moscas brancas colocaram 99% mais ovos em plantas de soja Bt do que em não-Bt (Figura 1).

As curvas de sobrevivência de *B. tabaci* quando expostas a plantas de soja Bt e não-Bt, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (teste de log-rank,  $\chi^2 = 0,000$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 1,000$ ).

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudados o desempenho demográfico e comportamento alimentar de *B. tabaci* Biótipo B em soja Bt e não-Bt. Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade demonstraram que moscas brancas mantidas em soja Bt apresentaram maior taxa líquida reprodutiva ( $R_o$ ), maior taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r_m$ ) e menor tempo para que a população dobre o tamanho ( $DT$ ). Estes resultados têm implicações importantes porque indicam que o crescimento populacional de *B. tabaci* em soja Bt é favorecido. Tem sido demonstrado, por observação visual, que insetos sugadores, como pulgão, cigarrinha, mosca branca e percevejo, são espécies dominantes em cultivo de soja, porém nenhuma diferença significativa foi evidenciada na abundância desses insetos em parcelas de soja Bt (MON87701RR2Y) quando comparado ao cultivo convencional não-Bt (Yu et al., 2014). Contudo, pouco tem sido estudado o efeito da soja Bt,

expressando a toxina Cry1Ac, no desempenho demográfico e comportamento alimentar de herbívoros não alvos.

Os resultados do comportamento alimentar da mosca branca em soja Bt, obtidos neste trabalho, demonstraram que as durações médias das formas de ondas por evento (WDE) relacionadas ao floema (E1, E2, E2 sustentada) foram significativamente maiores em moscas brancas mantidas em soja Bt. É importante ressaltar que a maior duração de E1 poderá implicar numa maior probabilidade de transmissão de vírus pela mosca branca. A salivação no floema por seu vetor *B. tabaci* é um pré-requisito absoluto para a transmissão de begomovírus (Fernandes & Cruz, 2009; Fereres & Moreno, 2009). Estes vírus são inoculados durante a salivação no floema (E1) antes de qualquer ingestão de seiva do floema (E2) ocorrer (Moreno-Delafuente et al., 2013). Portanto, o aumento e a disseminação das populações do vetor (*B. tabaci* Biótipo B), que é altamente polífago, é um dos principais fatores para a disseminação de begomovírus nas plantas (Morales, 2006).

Neste trabalho foram estudadas a soja Bt expressando a proteína Cry1Ac (M-SOY8330IPRO) e a soja convencional não-Bt (M-SOY8866). Assim, como essas variedades possuem bases genéticas diferentes, além da presença da toxina outros fatores podem estar envolvidos nas causas de diferenças no desempenho da mosca branca nas plantas hospedeiras estudadas. Por exemplo, uma correlação positiva entre a densidade de tricomas e a oviposição da mosca branca foi previamente encontrada em outros genótipos de soja (Silva et al., 2012). A alta densidade e comprimento dos tricomas presentes nas folhas pode ajudar os indivíduos a permanecerem na superfície das folhas e evitar que sejam levados pelo vento (Vieira et al., 2011), também podem gerar um microclima que é mais favorável para oviposição por *B. tabaci* (Butter & Vir, 1989). Além disso, outros fatores podem surgir durante os procedimentos de modificação genética e, conseqüentemente, afetar o desempenho do inseto na planta hospedeira, tais como diferenças na composição da seiva do floema e metabólitos secundários de plantas. Assim, pragas secundárias, que antes eram pouco importantes, podem agora encontrar condições favoráveis nas plantas Bt e se tornarem grandes pragas (Lu et al., 2010).

Na cultura do algodão, o aumento de sucção pela população de pragas em áreas de cultivo Bt pode ser atribuído a suculência de partes da planta tais como as folhas e as nervuras que na fase de crescimento da planta, combinado com as

condições climáticas, são favoráveis. Ahmad & Wakeel, (2000) observaram que a população de sugadores depende de fatores ambientais, idade da planta e características morfo-física da planta, em vez da expressão de Cry1Ac. No campo, três fatores potenciais também parecem favorecer esse melhor desempenho de espécies secundárias de pragas com o uso de culturas Bt: (i) redução na aplicação de inseticidas de amplo espectro; (ii) redução nas populações de inimigos naturais; ou (iii) diminuição na competição interespecífica com a praga alvo (Catarino et al., 2015).

Apesar da ocorrência de altas infestações por insetos fitossuccívoros em alguns cultivos de plantas Bt, geralmente eles têm sido negligenciados na investigação. Enquanto as culturas Bt são altamente eficientes no controle dos níveis de pragas alvo, eles podem não ser tão eficazes no controle de outras pragas que historicamente têm colocado menos ou mesmo nenhuma ameaça (Sharma & Ortiz, 2000). Tem-se mostrado que, mesmo em sistemas de cultivo Bt bem sucedidos (tais como o algodão Bt nos EUA), aplicações de inseticidas continuam a ser um método estrategicamente importante para controlar focos secundários de pragas (Wu & Guo, 2003; Naranjo & Ellsworth, 2009; Naranjo, 2011).

Por fim, neste trabalho foram estudados o desempenho demográfico e o comportamento alimentar de *B. tabaci* (Biótipo B) em soja Bt, expressando a proteína Cry1Ac, e soja não-Bt. Foi demonstrado que a soja Bt tem impacto direto sobre a dinâmica populacional da mosca branca favorecendo seu crescimento populacional. Atrelado a isso, há também maior probabilidade das moscas mantidas em soja Bt transmitirem vírus fitopatogênico a planta. Este é o primeiro estudo que demonstra potencial incremento no crescimento populacional de *B. tabaci* em uma cultivar de soja Bt, embora seja necessário mais pesquisas para entender se este efeito é devido à transgenia, se o efeito é varietal, ou ambos.

### Tabelas e Figura de Resultados do Capítulo 3

Tabela 2. Variáveis não-sequenciais do EPG (média ± erro) descrevendo o comportamento alimentar de *B. tabaci* em plantas de soja Bt e não-Bt.

Variável	Planta	PPW	NWEI	P	WDI	P	WDE	P
Np	Bt	20/20	56,75 ± 6,43	0,878 <sup>a</sup>	299,19 ± 17,15	0,834 <sup>b</sup>	5,27 ± 0,18	0,0007 <sup>a</sup>
	Não-Bt	20/20	71,45 ± 6,76		298,96 ± 15,54		4,18 ± 0,14	
Prova	Bt	20/20	56,55 ± 6,44	0,835 <sup>b</sup>	171,81 ± 15,56	0,869 <sup>b</sup>	3,04 ± 0,11	< 0,0001 <sup>a</sup>
	Não-Bt	20/20	71,30 ± 6,74		181,03 ± 15,54		2,54 ± 0,07	
C	Bt	20/20	58,00 ± 6,39	0,865 <sup>b</sup>	85,57 ± 8,94	0,092 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,04	< 0,0001 <sup>a</sup>
	Não-Bt	20/20	72,10 ± 6,69		133,88 ± 12,87		1,86 ± 0,04	
Pd	Bt	13/20	3,9 ± 0,93	0,872 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,08	0,926 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,00	0,0006 <sup>a</sup>
	Não-Bt	13/20	3,70 ± 0,89		0,58 ± 0,11		0,10 ± 0,00	
E1	Bt	8/20	0,70 ± 0,19	1,000 <sup>a</sup>	2,93 ± 0,58	0,735 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,36	< 0,0001 <sup>a</sup>
	Não-Bt	7/20	0,45 ± 0,13		0,93 ± 0,10		0,72 ± 0,11	
E2	Bt	8/20	0,70 ± 0,19	1,000 <sup>a</sup>	120,12 ± 17,55	0,976 <sup>a</sup>	68,64 ± 15,11	< 0,0001 <sup>a</sup>
	Não-Bt	7/20	0,45 ± 0,13		71,55 ± 10,29		55,65 ± 11,13	
sE2	Bt	8/20	0,55 ± 0,15	0,875 <sup>a</sup>			86,77 ± 19,04	< 0,0001 <sup>a</sup>
	Não-Bt	6/20	0,40 ± 0,13				62,33 ± 10,75	

PPW, proporção de indivíduos que produziram o tipo de onda; NWEI, número de onda por inseto; WDI, duração (minuto) da onda por inseto; WDE, duração (minuto) da onda por evento. Np: não-prova; Prova: atividade de provas; C: caminhamento estiletar intercelular; Pd: punctura estiletar intracelular; E1: salivagem no floema; E2: ingestão da seiva do floema; sE2: ingestão da seiva do floema durante um tempo maior de 10 minutos.

<sup>a</sup> Comparação estatística entre os dois tratamentos feita pelo Teste não-paramétrico U de Mann-Whitney.

<sup>b</sup> Comparação estatística entre os dois tratamentos feita pelo Teste t de Student.

Tabela 3. Duração (dias) das fases imaturas e de ovo a adulto de *B. tabaci* mantida em plantas de soja Bt e não-Bt.

Fase do ciclo de vida de <i>B. tabaci</i>	Bt	Não-Bt	<i>P</i> *
Ovo	7,61 ± 0,11	7,21 ± 0,09	0,039
Ninfa	12,36 ± 0,22	13,64 ± 0,31	0,015
Ovo-adulto	19,96 ± 0,24	20,86 ± 0,32	0,087

\*Comparação estatística para cada variável feita pelo Teste t de Student. Os dados foram transformados em raiz(x+1).

Tabela 4. Parâmetros de crescimento populacional (média e intervalo de confiança 95%) para *B. tabaci* mantidas em plantas de soja Bt e não-Bt.

Parâmetro da tabela de vida	Bt	Não-Bt
$R_o$	78,48 (55,99-112,60) a	39,46 (22,99-57,42) b
$r_m$	0,195 (0,183-0,215) a	0,170 (0,155-0,185) b
$DT$	3,55 (3,18-3,77) b	4,08 (3,71-4,43) a
$T$	22,35 (21,41-23,29) a	21,64 (20,40-23,30) a

$R_o$ , taxa líquida reprodutiva (fêmeas/fêmea/geração);  $r_m$ , taxa intrínseca de incremento populacional (dia);  $T$ , tempo médio por geração (dias);  $DT$ , tempo para que a população dobre o tamanho. Para cada parâmetro, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si significativamente ( $P > 0,05$ ) pelo método jackknife usando o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2011) (Maia et al., 2001).

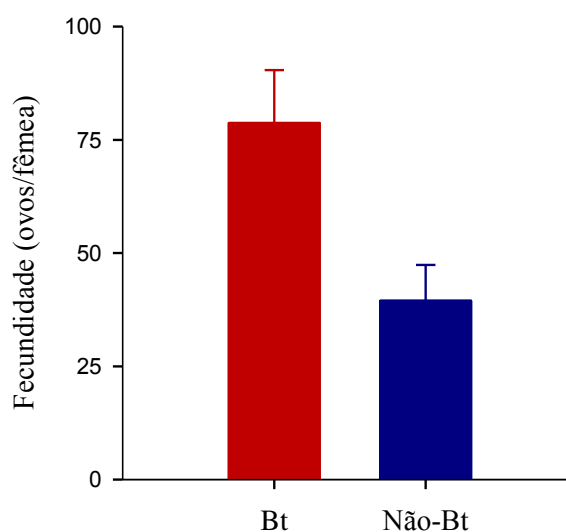


Figura 1. Fecundidade de *B. tabaci* em plantas de soja Cry1Ac e não-Bt. Os dados são média ± erro padrão.

## REFERÊNCIAS

- Ahmad, F.; Wakeel, W. Role of biochemical components in varietal resistance of cotton against sucking insect pests. **Pakistan Entomology**, v.22, p.69-71, 2000.
- Backus, E.A.; Cline, A.R.; Ellerseick, M.R.; Serrano, M.S. *Lygus Hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of non-sequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, p.296–310, 2007.
- Berlinger, M. J. Host plant resistance to *Bemisia tabaci*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.17, p.69-82. 1986.
- Birch, L.C. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **Journal of Animal Ecology**, v.17, p. 15-26. 1948.
- Butter, N.S.; Vir, B.K. Morphological basis of resistance in cotton to the whitefly *Bemisia tabaci*. **Phytoparasitica**, v.17, p.251-261, 1989.
- Catarino, R., Ceddia, G.; Areal, F.J.; Park, J. The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. **Plant Biotechnology Journal**, p.1–12, 2015.
- De Barro, P.J.; Liu, Shu-Sheng.; Boykin, L.M.; Dinsdale, A.B. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 1-19, 2011.
- Fernandes, F.R.; Cruz, A.R.R.; Faria, J. C.; Zerbini, F. M.; Aragão, F.J.L. Three distinct begomoviruses associated with soybean in central Brazil. **Archives of Virology**, v.154, p. 1567–1570, 2009.
- Fereres, A.; Moreno, A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research**, v.141, p.158–168, 2009.
- James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY. 2014
- Jiang, Y.X.B.C.; Barrios, L.; Fereres, A. Correlation between whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) feeding behavior and transmission of tomato yellow leaf curl virus. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93(3), p.573–579, 2000.
- Krebs, C.J. Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. 4. ed. New York, Harper Collins College Publishers, 801p. 1994.
- Lima, A.C.S.; Lara, F.M. Resistência de genótipos de soja à mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v.33, p.71-75, 2004.

- Lourenção, A.L.; Nagai, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v.53, p.53-59, 1994.
- Lu, Y.; Wu, K.; Jiang, Y.; Xia, B.; Li, P.; Feng, H.; Wyckhuys, K.A.G.; Guo, Y. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. **Science**, v.328, p.1151–1154, 2010.
- Maia, A.D.N; Luiz, A.J.B; Campanhola, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 511-518, 2000.
- Marubayashi, J.M.; Yuki, V.A.; Wutke, E.B. Transmissão do *Cowpea mild mottle virus* pela mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B para plantas de feijão e soja. **Summa phytopathologica**, v.36(2), p.158-160, 2010.
- Morales, F.J. History and current distribution of begomoviruses in Latin America. **Advances in Virus Research**, v.67, p. 127–162, 2006.
- Moreno-Delafuente, A.; Garzo, E.; Moreno, A.; Fereres, A. A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. **Plos One**, v.8(4), p.158-168. 2013.
- Musa, P.D.; Ren, S.X. Development and reproduction of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on three bean species. **Insect Science**, v.12, p. 25-30, 2005.
- Naranjo, S.E.; Ellsworth, P.C. The contribution of conservation biological control to integrated control of *Bemisia tabaci* in cotton. **Biological Control**, v.51, p.458–470, 2009.
- Naranjo, S.E. Impacts of Bt transgenic cotton on integrated pest management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 5842–5851, 2011.
- Navarro, E. Monsoy® apresenta variedades de soja com a tecnologia Intacta rr2 Pro. 2013. Disponível em <<http://www.monsanto.com/global/br/noticias/pages/monsoyapresentavariedades-de-soja-com-a-tecnologia-intacta-rr2-pro.aspx>>. Acesso em: 3 dezembro. 2015.
- Ning, W.; Shi, X.; Liu, B.; Pan, H.; Wei, W. et al. Transmission of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* by *Bemisia tabaci* as Affected by Whitefly Sex and Biotype. **Scientific Reports**, v.5(10744), 2015. doi:10.1038/srep10744
- Perring, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, v.20, p.725–737, 2001.
- Prado, E; Tjallingii, W.F. Aphid activities during sieve element punctures. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.72, p. 157–165, 1994.
- Rodríguez-López, M.J; Garzo, E.; Bonani, J.P.; Fernández-Muñoz, R.; Moriones, E.; Fereres, A. Acylsucrose-Producing Tomato Plants Forces *Bemisia tabaci* to

- Shift Its Preferred Settling and Feeding Site. **Plos One**, v.7(3), 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0033064.
- Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.M.; Capell, T.; Christou, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p.283–300, 2011.
- Spiller, N.J.; Koenders, L.; Tjallingii, W.F. Xylem ingestion by aphids – a strategy for maintaining water balance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 55, p. 101–104, 1990.
- Sarria, E.; Cid, M.; Garzo, E.; Fereres, A. Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.67, p. 35–42, 2009.
- SAS Institute. SAS user's manual, version 9.3. SAS Institute, Cary NC. 2011
- SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Soja: Análise da conjuntura agropecuária. v.41, p.3313-4035. 2014.
- Sharma, H.; Ortiz, R. Transgenics, pest management, and the environment. **Current Science**, v.79, p.421–437, 2000.
- Silva, J.P.G.F.; Baldin, E.L.L.; Souza, E.S.; Lourenção, A.L. Assessing *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B resistance in soybean genotypes: antixenosis and antibiosis. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72(4), p.516-522, 2012.
- Stokstad, E.; Grullon, G. Infographic: pesticide planet. **Science**, v.341, p. 730–731, 2013.
- Suekane, R.; Degrande, P.E.; Lima Junior I.S., Queiroz, M.V.B.M.; Rigoni, E.R. Danos da mosca-branca *Bemisia tabaci* (genn.) e distribuição vertical das ninfas em cultivares de soja em casa de vegetação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80(2), p.151-158, 2013.
- Tjallingii, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.24, p.721–730, 1978.
- Tjallingii, W.F. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.38, p.187–193, 1985.
- Tjallingii, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks AK, Harrewijn, eds. *Aphids, their biology, natural enemies and control*, v.2B. Elsevier, Amsterdam, p.95–108, 1988.
- Vieira, S.S.; Bueno, A.F.; Boff, M.I.C.; Bueno, R.C.O.F.; Hoffman-Campo, C.B. Resistance of Soybean Genotypes to *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, v.40(1), 2011.

- Wu, K.M.; Guo, Y.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, p.312–318, 2003.
- Yang, B.; Parajulee, M.; Ouyang, F.; Wu, G.; Ge, Feng. Intraspecies mixture exerted contrasting effects on nontarget arthropods of *Bacillus thuringiensis* cotton in northern China. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 16(1), p. 24–32, 2014.
- Yu, H., Li, Yunhe; Li, Xiangju; Wu, Kongming. Arthropod abundance and diversity in transgenic Bt soybean. **Environmental Entomology**, v.43(4), p.1124-1134, 2014.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos experimentos realizados com o pulgão *R. padi* em milho Bt demonstraram que plantas de milho expressando a toxina Cry1Ab (evento MON 810) afetam negativamente o desempenho demográfico e o comportamento alimentar de *R. padi* ao longo de dez gerações. Isto não foi observado nas plantas de milho Bt Cry1F (evento TC1507), onde o desempenho e comportamento alimentar do pulgão foi similar aos obtidos no milho não-Bt. Curiosamente, no milho Cry1F o pulgão teve sua história de vida alterada, produzindo mais ninfas/fêmeas, mas isto não se traduziu em incremento nas taxas de crescimento populacional. Portanto, pode-se inferir que milho Bt produzindo Cry1Ab ou Cry1F diretamente não induz crescimento populacional que facilita os pulgões *R. padi* a tornarem-se pragas importantes economicamente.

No estudo da interação entre herbívoros de guildas diferentes não foram observadas evidências de que as respostas induzidas pela prévia fitofagia por *S. frugiperda* em uma cultivar comercial de milho afetam negativamente o desempenho e comportamento alimentar o pulgão *R. maidis*. Contudo, para melhor compreensão das respostas induzidas por herbivoria em plantas milho, mais estudos sobre efeito da fitofagia de *R. maidis* no desempenho de *S. frugiperda* devem ser conduzidos e se a transgenia altera ou não a resposta induzida.

Os experimentos realizados para avaliar o desempenho e comportamento alimentar de *B. tabaci* em soja Bt mostraram que plantas de soja Cry1Ac tem impacto direto na dinâmica populacional da mosca branca por incrementar seu crescimento populacional. Além disto, o maior tempo de salivação e de ingestão do floema associados à alimentação de *B. tabaci* na soja Bt pode aumentar a disseminação de fitoviroses pelo inseto. Contudo, permanece sem resposta se este incremento é devido à transgenia, se é devido a um efeito é varietal, ou ambos.

Por fim, a investigação aqui realizada permitiu demonstrar que ao longo de dez gerações em milho Bt uma espécie de pulgão (i.e., *R. padi*) teve seu desempenho populacional afetado num tipo de milho Bt mas não em outro, indicando que o impacto de plantas transgênicas em organismos não-alvos devem ser analisado caso-

a-caso, como recomendado nas análises de risco para liberação dessas plantas no ambiente. Deve-se ressaltar que a maioria dos estudos não consideram os efeitos de longo prazo de plantas Bt em insetos não-alvos, como estudado no presente trabalho, o que o põe boa posição em relação aos estudos neste tema. Também, importantes resultados foram obtidos com o estudo da interação entre herbívoros de guildas diferentes, sendo que este trabalho é pioneiro no estudo de interferência entre insetos fitófagos usando sistema *S. frugiperda* e fitossuccívoros em milho. Além disso, este é o primeiro estudo que demonstra o potencial incremento no crescimento populacional de *B. tabaci* em uma cultivar de soja Bt, embora sejam necessárias mais pesquisas para entender se tal efeito é devido à transgenia ou à variedade de soja em que se encontra transgene *cry1Ab*.