

AGRÁRIA

Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN (on line): 1981-0997; (impresso): 1981-1160

v.5, n.4, p.509-517, out.-dez., 2010

Recife, PE, UFRPE. www.agraria.ufrpe.br

DOI: 10.5239/agraria.v5i4.942

Protocolo 942 – 15/05/2010 *Aprovado em 30/08/2010

Roberta L. Santos¹

Jorge B. Torres^{1,2}

Produção da proteína Cry1Ac em algodão transgênico e controle de lagartas

RESUMO

A proteína Cry1Ac expressada pelo algodoeiro Bollgard® deve conferir à planta resistência a lepidópteros-praga durante toda a safra e sob variadas condições de cultivo. Assim, em duas épocas, início dos períodos de alta e de baixa precipitação no Nordeste brasileiro, foram realizados plantios de algodão para quantificar a expressão da proteína Cry1Ac em diferentes partes da planta de algodão e, consequentemente, avaliar a eficácia de controle de lagartas pela variedade Bollgard® Acala 90B. Lagartas de *Alabama argillacea* (Hübner) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) foram confinadas respectivamente em ponteiros de plantas e em toda a planta em campo e, em folhas, botão floral e maçã macia, em laboratório, para ambas as lagartas. A proteína Cry1Ac foi quantificada por teste ELISA. A expressão média de Cry1Ac (μg de Cry1Ac g^{-1} de peso fresco) ao longo da estação variou em função das partes da planta de algodão com maiores níveis nas folhas (0,28 μg), e menores no botão floral (0,101 μg), nas brácteas (0,067 μg) e na casca de maçãs (0,014 μg). Os níveis de Cry1Ac, testado apenas em folhas de plantas submetidas ao estresse hídrico durante o período de baixa precipitação, foram similares àqueles produzidos por plantas sem estresse (0,21 *versus* 0,23 μg de Cry1Ac g^{-1} de peso fresco). O controle de *A. argillacea* foi obtido na variedade Acala 90B independente da parte da planta em laboratório e campo, enquanto *S. frugiperda* exibiu mortalidade em Acala 90B similar a sua isolinha não-Bt.

Palavras-chave: Curuquerê-do-algodoeiro, estresse hídrico, lagarta militar, resistência de plantas a insetos.

Production of Cry1Ac protein in transgenic cotton and control of lepidoperan larvae

ABSTRACT

The Cry1Ac protein expressed by the Bollgard® cotton must confer to the plant a season long resistance against lepidopteran pest under a range of cropping conditions. This study was conducted during two seeding seasons, in the beginning of the high and the low rainfall season in the Northeast of Brazil, to investigate Cry1Ac production by different parts of the plant Bollgard® variety Acala 90B and its efficacy against lepidopteran larvae. Larvae of *Alabama argillacea* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) were respectively caged on terminals and whole cotton plants in the field, and cotton leaves, flower buds, and soft bolls in the laboratory for both larvae. The Cry1Ac production was measured using ELISA assays. The mean levels of Cry1Ac (μg of Cry1Ac g^{-1} of fresh tissue) ranged according to the cotton plant parts across the season with higher levels in the leaves (0.28 μg), followed in the flower buds (0.101 μg), in the square bracts (0.067 μg), and in the skin of the soft boll (0.014 μg). Levels of Cry1Ac in cotton plants, assayed only in leaves, during low rain season were similar to those produced by unstressed plants (0.21 *versus* 0.23 μg de Cry1Ac g^{-1} of fresh tissue). *A. argillacea* is efficiently controlled irrespective of parts of the Acala 90B plants in the laboratory and in the field, while *S. frugiperda* exhibited mortality similar in Acala 90B and its isoline non-Bt.

Key words: Fall armyworm, water stress, cotton leafworm, host plant resistance

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade – Entomologia, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil. Fone: (81) 3320-6218. Fax: (81) 3320-6205. E-mail: rocaleme@hotmail.com; jtorres@depa.ufrpe.br

² Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

INTRODUÇÃO

O manejo de pragas é um fator limitante para o cultivo do algodão, seja em pequena ou larga escala, pois muitas vezes chega a representar 30% do custo total de produção, em consequência das inúmeras pulverizações exigidas para o controle de insetos e ácaros (Richetti et al., 2004). Desta forma, o controle de pragas do algodoeiro acaba sendo um fator condicionante da rentabilidade desta cultura. Entre os principais avanços para o controle de pragas do algodoeiro no Brasil, podemos citar a disponibilidade das variedades de algodão geneticamente modificadas com genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). As variedades disponibilizadas atualmente no Brasil produzem a proteína Cry1Ac. A expressão desta proteína do Bt em plantas de algodão confere à planta resistência a lagartas que atacam as maçãs como *Pectinophora gossypiella* (Saund.) e *Heliothis virescens* (Fabr.), bem como à lagarta desfolhadora *Alabama argillacea* (Hübner), sendo todas consideradas pragas chave da cultura (Almeida et al., 2008).

O algodoeiro Bt é cultivado nos Estados Unidos, Austrália, México, África do Sul, China, Índia, Argentina, Colômbia e Brasil, com benefícios diretos como a redução de custos de manejo de pragas, e indiretos, advindos da redução no uso de inseticidas (Brookes & Bartfoot, 2008; Torres et al., 2009). Uma das grandes vantagens da adoção do algodão Bt é que o método de controle é fornecido ao produtor na semente e é dessa forma que ela se apresenta como instrumento-chave no manejo de pragas, promovendo a resistência da planta às pragas-alvo. Desta forma, independentemente do grau tecnológico do produtor, a tecnologia torna-se de fácil aplicação, como observado em áreas de pequenos produtores da África do Sul (Bennett et al., 2006a), México (Traxler & Godoy-Avila, 2004), China (Pray et al., 2002), e Índia (Bennett et al., 2006b). Por outro lado, o algodoeiro Bt com expressão apenas da proteína Cry1Ac não oferece controle satisfatório para as diversas espécies de lepidópteros praga do algodoeiro e, ainda, pode ter sua expressão influenciada por características do ambiente e da idade da planta (Sumerford & Solomon, 2000; Adamczyk et al., 1998 e 2001; Torres et al., 2006).

Entre as pragas do algodoeiro, a lagarta militar *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) tem sido recentemente citada como praga importante para esta cultura (Miranda & Ferreira, 2005; Martinelli et al., 2007). Este status, ainda, é mais preocupante em virtude de sua baixa susceptibilidade à proteína Cry do Bt (Adamczyk & Gore, 2004). Espécies como *Spodoptera exigua* (Hübner) apenas sofrem controle de certa forma supressivo pela Cry1Ac, em virtude do prolongamento da fase de larva e menor fecundidade (Stewart et al., 2001; Adamczyk & Gore, 2004).

A variação na produção de proteínas Cry nas plantas modificadas pode comprometer o desempenho do controle das pragas-alvo. A variação na produção pode ocorrer ao longo da estação de acordo com a idade da planta e de acordo com a parte da planta, da variedade transformada, e do local de plantio, supostamente devido às condições edafoclimáticas (Torres et al., 2009). Como o Brasil iniciou o cultivo em larga

escala de variedades Bt, é importante verificar o potencial de produção da proteína Cry1Ac sob as nossas condições de cultivo e, ainda, fornecer base de dados para futuro monitoramento da produção da proteína Cry1Ac em estudos comparativos entre regiões, variedades e condições de cultivo. Assim, os objetivos neste trabalho foram estudar a produção da proteína Cry1Ac em plantas de algodão variedade Acala 90B (Bollgard®) em diferentes idades ao longo do seu desenvolvimento (25, 55, 93, 127 e 132 dias) após o plantio, estudar o efeito do estresse hídrico na produção de Cry1Ac pelo algodoeiro Bt e avaliar a sobrevivência e o peso de lagartas de *A. argillacea* e *S. frugiperda* quando confinadas em plantas de algodão Bt em comparação a plantas não-Bt.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos durante duas épocas de cultivo: período regular de plantio durante a estação de chuvas e período de transição para o período de seca. A precipitação acumulada durante 158 dias de experimento (27/5 a 5/10/2007) foi de 1017 mm. O segundo período de cultivo adotado neste experimento para a submissão das plantas ao estresse hídrico foi realizado com o plantio em 1/9/2007. Neste período, considerado de transição entre período das chuvas e seca, as avaliações foram conduzidas de 1/7 a 30/10/2007, sendo a precipitação acumulada de 27,5 mm. Para manter as plantas neste período de estresse hídrico, a metade da parcela foi irrigada e recebeu adicionalmente 94 mm de água.

Plantio de algodão

O plantio de algodão Bt Bollgard® (Acala 90B) e de sua isolinha não-Bt (Acala 90) foi realizado empregando um delineamento em blocos ao acaso com três blocos contendo, em cada um deles, as duas variedades de algodão, compostos de 22 fileiras de 25 m de comprimento como parcela para avaliação. O preparo do solo para o plantio consistiu de aração e gradagem. A adubação de plantio consistiu de 10 g de NPK 4-14-8 por cova, enquanto duas adubações de cobertura foram feitas aos 35 e 70 dias após o plantio com 10g de uréia por planta. O controle de ervas daninha foi feito com aplicação, aos 11 dias após o plantio, de herbicida (mistura de Fusilade® e Staple® 20+20mL p.c. 20L⁻¹), além de duas capinas manuais aos 30 e 50 dias e aplicação direcionada do herbicida Roundup® (150 mL p.c.20L⁻¹) aos 70 dias após o plantio.

O plantio no período de transição para a seca foi realizado empregando o mesmo procedimento e delineamento acima descrito. No entanto, o tamanho da parcela foi de 10 fileiras de 12 m de comprimento, sendo três com a variedade Bollgard® (Acala 90B) e três com a isolinha não-Bt (Acala 90). As plantas das duas variedades receberam irrigação até 25 dias após o plantio, quando foram submetidas aos tratamentos: estresse hídrico (sem irrigação) e tratamento continuado com a irrigação. Assim, três talhões de 10 fileiras foram submetidos ao estresse hídrico e três talhões continuaram recebendo irrigação. O período em que as plantas

foram submetidas ao estresse hídrico foi de 35 dias entre 25/09 e 30/10/2007.

As condições abióticas foram monitoradas a intervalos de 30 min de 20/5 a 30/10/07 utilizando WatchDog datalogger (Spectrum™ Technologies, Inc.) e resultou em temperatura média de 22,8°C (mínima de 16,7°C e máxima de 32,5°C), umidade relativa do ar média de 67% (45 a 100%) e fotoperíodo entre 12 a 13h de luz.

Quantificação da proteína Cry1Ac

A produção de Cry1Ac pelas plantas foi determinada em folhas expandidas do topo da planta e das demais partes da planta como brácteas, botão floral, casca de maçãs e sementes de maçãs firmes, durante o desenvolvimento das plantas no período das chuvas de maio a setembro dependendo da disponibilidade das respectivas partes (Tabela 1). As coletas de folhas para as análises procederam nos dias 21/6, 20/7, 28/8, 30/9 e 06/10, correspondente a cinco idades de plantas: 25, 55, 93, 127 e 132 dias após o plantio.

Durante o período de transição para a seca, a produção da proteína foi quantificada apenas em folhas expandidas do topo da planta, pois se trata do principal tecido utilizado pelas lagartas desfolhadoras e é onde a expressão de Cry1Ac é mais elevada (Perlak et al., 2001; Greenplante et al., 2003). A quantificação de Cry1Ac foi realizada a partir de duas coletas de amostras de folhas expandidas do topo das plantas feitas aos 10 e 20 dias após as plantas terem sido submetidas ou não ao estresse hídrico (12/10 e 22/10/2007).

A coleta de material (folhas, brácteas, botão floral e casca de maçãs) foi realizada, aleatoriamente, em seis plantas dentro de cada parcela no período das chuvas (três repetições por tratamento), bem como no período de transição para a seca nos talhões com e sem irrigação. A coleta de folhas e brácteas consistiu do dobramento da folha na sua nervura principal, colocada sobre um microtubo de 1,5 mL que teve a sua tampa pressionada retirando-se um disco de folha de aproximadamente 5 mm de diâmetro por folha. O mesmo foi realizado com as brácteas. O botão floral e as maçãs foram coletados inteiros e, no laboratório, foi retirada a amostra com o uso de estilete. Do botão floral foi cortado apenas um disco transversal na sua parte mediana de no mínimo cinco plantas por repetição, enquanto foi retirada das maçãs apenas a casca. Sementes de maçãs firmes (uma por maçã de cinco maçãs) foram retiradas e congeladas. No momento da extração, 100 mg de endosperma foi submetido à análise. Após a coleta, o material foi colocado em caixa térmica com gelo e conduzido para o laboratório, onde foi acondicionado em freezer à temperatura de -20°C, até a extração e a quantificação da proteína Cry1Ac.

A extração consistiu do maceramento de cada amostra de material vegetal (100 mg de peso fresco) em solução PBST (Phosphate Buffered Saline + Tween 20) na diluição de 1:10 (p/v). A quantificação foi feita utilizando-se kits para ELISA PathoScreen adquiridos da Agdia (Agdia® Inc., Elkhart, IN). Acompanhado ao kit foi adquirido Cry1Ac purificada na concentração de 40 ng, permitindo diluições para concentrações de 40 a 0,625 ng para a construção da curva padrão de detecção. A condução do teste de ELISA, leitura e

interpretação dos resultados seguiram a metodologia descrita por Torres et al. (2008).

A quantidade de Cry1Ac detectada entre plantas submetidas aos tratamentos com e sem estresse hídrico foi comparada pelo teste “t” de Student a 5% de probabilidade (SAS Institute, 2001).

A quantidade de proteína Cry1Ac em lagartas de *A. argillacea* e *S. frugiperda* sobreviventes em algodão Bt de campo foi determinada empregando o mesmo procedimento descrito anteriormente para amostras de folhas através do maceramento de todo o conteúdo em PBST. No entanto, foi empregada a diluição de 1:5 (p/v) devido à baixa concentração de Cry1Ac adquirida, usualmente detectada em lagartas alimentando-se de plantas de algodão Bt (Torres et al., 2006). Todas as lagartas sobreviventes de *A. argillacea* foram utilizadas na amostra devido ao reduzido tamanho e ao pequeno número de indivíduos sobreviventes (n = 5 lagartas de terceiro instar). Para *S. frugiperda*, no entanto, foram utilizadas de 10 a 12 lagartas para compor amostras de 100 mg de material fresco.

Atividade biológica em campo com *Alabama argillacea*

A mortalidade de lagartas do curuquerê-do-algodoeiro *A. argillacea* confinadas em ponteiros de planta, em campo foi investigada por meio de infestações artificiais com lagartas de 48 h de idade e previamente alimentadas com folhas de algodão BRS Verde. O confinamento de lagartas em algodoeiro no período de alta precipitação foi iniciado em 3/7/2007 (plantas com 37 dias após o plantio). As lagartas de *A. argillacea* foram obtidas da criação do laboratório iniciada com pupas coletadas em algodão, no município de Rio Verde, GO, e mantidas conforme descrito em Oliveira et al. (2002).

O confinamento de lagartas consistiu de dois tratamentos (plantas Bt e não-Bt) e três datas de confinamento simulando três gerações sucessivas para *A. argillacea* (3/7, 28/7 e 25/8), empregando 10 repetições (gaiolas) com 10 lagartas cada, totalizando 100 lagartas avaliadas em cada data de confinamento e tratamento.

O confinamento de lagartas de *A. argillacea* nos ponteiros das plantas de algodão incluindo folhas, botões florais, flores e até mesmo maçãs pequenas (~1cm de diâmetro), foi realizado utilizando gaiolas de “voil” de 30 x 60 cm (largura x comprimento) instaladas sobre as plantas em campo. A extremidade superior dessa gaiola é fechada e a extremidade inferior aberta, mas possui cordão revestido na sua borda utilizado para o seu fechamento. O ponteiro foi colocado no interior da gaiola que, posteriormente, foi fechada amarrando-a na haste das plantas. As gaiolas possuem uma abertura longitudinal fechada com zíper de 30 cm que permitiu acesso às plantas no interior das gaiolas para liberação das lagartas.

No algodoeiro cultivado no período de transição com baixa precipitação, apenas um confinamento de lagartas de *A. argillacea* foi realizado. O confinamento foi conduzido na segunda data de coleta de amostras para a análise de Cry1Ac realizada em 22/10/07 (20 dias após as plantas terem sido submetidas ao estresse hídrico). Assim, o delineamento adotado foi inteiramente casualizado com dois tratamentos

(plantas Bt com e plantas Bt sem irrigação) e 10 repetições com 10 lagartas cada repetição.

Procedeu-se à avaliação cinco dias após o confinamento. Os ponteiros das plantas contendo as lagartas confinadas em gaiolas foram cortados e levados para o laboratório para avaliação com a contagem e pesagem das lagartas vivas.

Atividade biológica em campo com *Spodoptera frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas nas infestações foram obtidas de criação de laboratório que teve início com posturas coletadas em plantas de milho na mesma área experimental. A criação de lagartas foi realizada com folha de milho, enquanto as pupas e os adultos foram criados semelhantemente à *A. argillacea*. O confinamento de lagartas de *S. frugiperda* foi realizado com lagartas de 48 h de idade, previamente alimentadas com folhas de algodão BRS Verde, em laboratório. O procedimento experimental foi o mesmo empregado com lagartas de *A. argillacea*, diferindo quanto às datas de infestação, tamanho da gaiola e tempo de confinamento. As infestações de lagarta foram correspondentes a apenas duas gerações (28/07 e 04/09) quando as plantas já apresentavam estruturas reprodutivas (63 e 98 dias de plantio), preferidas pelas lagartas de *S. frugiperda* (Barros et al., 2010a). As gaiolas empregadas foram também de tecido “voil”, porém com 100 x 80 cm, suspensas em armação cilíndrica de vergalhão. O uso dessas gaiolas permitiu às lagartas acesso a todas as estruturas da planta devido ao seu comportamento de alimentação que além de folhas, também alimentam-se de estruturas reprodutivas (Barros et al., 2010a). Devido ao desenvolvimento mais lento de *S. frugiperda*, alimentando-se em algodoeiro, comparado ao curuquerê, a avaliação procedeu-se aos sete dias após o confinamento das lagartas.

Atividade biológica em laboratório

O estudo de laboratório foi conduzido para obter o confinamento de lagartas em partes específicas da planta que não foram possíveis de isolamento em campo. Lagartas de ambas as espécies *A. argillacea* e *S. frugiperda* foram utilizadas ainda neonatas para evitar qualquer condicionamento ao alimento, e a avaliação procedeu-se aos cinco dias após o confinamento em virtude da durabilidade do material utilizado retirado da planta. Assim, lagartas de *A. argillacea* foram confinadas em folhas e botões florais com brácteas. Este estudo foi conduzido simultaneamente ao confinamento de lagartas em planta no campo. A sobrevivência (% de lagartas vivas) e o peso de 100 lagartas distribuídas em 10 repetições foram determinados para cada parte da planta de algodão Bt (Acala 90B) e sua isolinha não-Bt (Acala 90). O confinamento das lagartas sobre as folhas de algodão foi realizado empregando-se placas de Petri de 11,3 x 1,5 cm, forradas com papel de filtro levemente umedecido com água destilada, sobre o qual foi disposto um disco de folha de 10 cm de diâmetro. Sobre cada disco de folha foram liberadas 10 lagartas. Após a infestação com as lagartas, a placa de Petri foi tampada e sua lateral vedada com filme de PVC.

Para o confinamento de lagartas no botão floral foram empregados tubos de vidro de fundo chato de 8,3 x 2,2 cm,

onde foram colocados dois a três botões florais com brácteas e 10 lagartas. Estes tubos foram vedados com chumaço de algodão hidrofílico.

Além disso, foi incluído, também, o confinamento de lagartas sobre maçã macia ao tato das duas variedades Bt e não-Bt, em laboratório. O confinamento das lagartas foi realizado empregando um organizador plástico que possui 18 compartimentos individualizados retangulares de 3x2,5x3cm (comprimento, largura e altura). No interior deste organizador foram colocadas uma maçã de 1,5-20 cm de diâmetro em cada compartimento do organizador e 10 lagartas neonatas de *S. frugiperda*. Assim, cada compartimento foi considerado como sendo uma repetição. Em seguida, foi colocado papel mata-borrão no interior da tampa para auxiliar a vedação evitando o escape de lagartas e também retenção de umidade liberada pela maçã. As avaliações procederam-se para a determinação da sobrevivência e peso das lagartas após cinco dias de confinamento nas referidas condições entre plantas Bt e não-Bt. Os resultados foram comparados entre tratamentos de plantas Bt e não-Bt pelo teste “t” de Student a 5% de probabilidade (SAS Institute, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção da proteína Cry1Ac (μg de Cry1Ac g^{-1} de peso fresco) variou consideravelmente em função das partes das plantas de algodão Bt Acala 90B (Tabela 1). A quantidade de Cry1Ac em botões florais e casca de maçãs resultaram em níveis não detectáveis inferiores que 0,675 ng. Também, níveis menores de Cry1Ac foram detectados nas brácteas em comparação àqueles encontrados nas folhas (Tabela 1).

A proteína produzida em folhas expandidas do ponteiro foi relativamente estável, sempre superior a 0,20 μg de Cry1Ac g^{-1} de peso dos 25 (início da floração) aos 132 dias (maturação) após o plantio. No entanto, uma suave redução da quantidade de proteína nas amostras de folhas aos 55 e 93 dias de idade de plantas é observado (Tabela 1). Esta variação ao longo da estação pode ocorrer em função de vários fatores e tem sido comumente encontrada em outros estudos e variedades (Adamczyk & Sumerford, 2001; Adamczyk et al., 2001; Torres et al., 2006). O importante é que a quantidade produzida seja suficientemente segura para o controle das pragas alvo como demonstrado no confinamento tanto em campo como em laboratório para o curuquerê (Tabela 2).

O plantio do algodoeiro Bt no período de transição para a seca submetendo as plantas à condição de estresse hídrico possivelmente nos cultivos de safrinha, não alterou a produção de Cry1Ac medida na folha expandida do topo aos 10 dias ($t_{11} = 2,47$; $P = 0,1307$) e aos 20 dias ($t_{11} = 1,23$; $P = 0,2312$) entre plantas submetidas ou não ao estresse hídrico, bem como para plantas mantidas nas mesmas condições entre 10 e 20 dias (Figura 1).

A condição de estresse hídrico pode não somente ocorrer na época de baixa precipitação, mas também através de veranicos durante o verão chuvoso ou em plantios safrinha. A sobrevivência de *A. argillacea* confinadas aos 20 dias após submissão das plantas ao estresse hídrico, tanto nos

Tabela 1. Estimativa de Cry1Ac (μg de Cry1Ac g^{-1} de peso fresco) em diferentes partes da planta de algodão Acala 90B em diferentes idades da planta e em lagartas alimentadas com Acala 90B**Table 1.** Estimative of Cry1Ac protein (μg of Cry1Ac g^{-1} of fresh weight) in different parts of the cotton plant Acala 90B under different plant ages and in larvae feeding with Acala 90B

Materiais	Datas de coleta (dias após plantio)				
	21/06(25 dias)	20/07(55 dias)	28/08(93 dias)	30/09(127 dias)	06/10(132 dias)
Folha	0,331(0,30 - 0,35) ¹	0,206(0,19 - 0,22)	0,223(0,19 - 0,25)	0,301(0,27 - 0,32)	0,316(0,29 - 0,34)
Bráctea	-(²)	0,094(0,084 - 0,104)	0,058(0,050 - 0,065)	-	0,049(0,035 - 0,062)
Botão floral	-	0,106(0,098 - 0,113)	0,073(0,067 - 0,078)	0,178(0,170 - 0,185)	0,043(0,041 - 0,044)
Casca maçã macia	-	-	0,011(0,003 - 0,018)	-	0,017(0,015 - 0,018)
Endosperma	-	-	-	-	ND(³)
Lagarta <i>S. frugiperda</i>	-	-	-	0,065(0,063 - 0,066)	-
Lagarta <i>A. argillacea</i>	-	-	-	0,151(0,127 - 0,174)	-

¹ Média e intervalo de confiança da média a 95% de probabilidade² Material não coletado nestas datas³ Material analisado para Cry1Ac, sem a detecção da toxina em nível de 0,625 ng/grama de peso fresco de material vegetal analisado**Tabela 2.** Sobrevivência e peso de lagartas de *Alabama argillacea* criadas em algodoeiro Bt (Acala 90B) e sua isolinha não-Bt (Acala 90) durante cinco dias de confinamento em diferentes partes das plantas, em laboratório, ou em ponteiros das plantas, em campo. Paudalho, PE, 2007**Table 2.** Survival and weight of *Alabama argillacea* larvae raised in Bt-cotton (Acala 90B) cotton plant and its isoline non-Bt (Acala 90) caged during five days on different parts of the plants in the laboratory, and on plant terminals in the field. Paudalho, PE, 2007

Material	Idade da lagarta	DAP ⁽¹⁾	Sobrevivência (%)	Peso (mg) (x \pm EP)
<i>Laboratório</i>				
Folha não-Bt	Primeiro instar	37	86	6,7 \pm 0,91
	62	80	4,6 \pm 0,46	
	87	82	5,5 \pm 0,71	
Folha Bt	Primeiro instar	37	3	1,1 \pm 0,12 ⁽²⁾
	62	1	0,60 ⁽²⁾	
	87	0	-	
Botão + bráctea não-Bt	Primeiro instar	63	40	1,2 \pm 0,06
	87	72	1,7 \pm 0,10	
	121	67	2,0 \pm 0,29	
Botão + bráctea Bt	Primeiro instar	63	0	-
	87	0	-	
	121	0	-	
Maçã não-Bt	Primeiro instar	121	61	4,3 \pm 1,59
Maçã Bt	Primeiro instar	121	0	-
Folha não-Bt	Terceiro instar	121	86	12,9 \pm 0,92
Folha Bt	Terceiro instar	121	0	-
<i>Campo</i>				
Ponteiro não-Bt	Primeiro instar	37	65	5,6 \pm 0,19
	62	81	4,2 \pm 0,13	
	87	30	3,7 \pm 0,23	
Ponteiro Bt	Primeiro instar	37	1	2,8 ⁽²⁾
	62	1	0,6 ⁽²⁾	
	87	0	-	
Ponteiro não-Bt	Terceiro instar	121	55	55 ⁻⁽³⁾
	Ponteiro Bt	121	5	5 ⁻⁽³⁾

¹ Dias após plantio² Número de amostras não suficiente para análise estatística³ Nas avaliações em campo não foram obtidos pesos das lagartas sobreviventes nas plantas não-Bt e Bt, pois essas foram congeladas imediatamente para quantificação de Cry1Ac

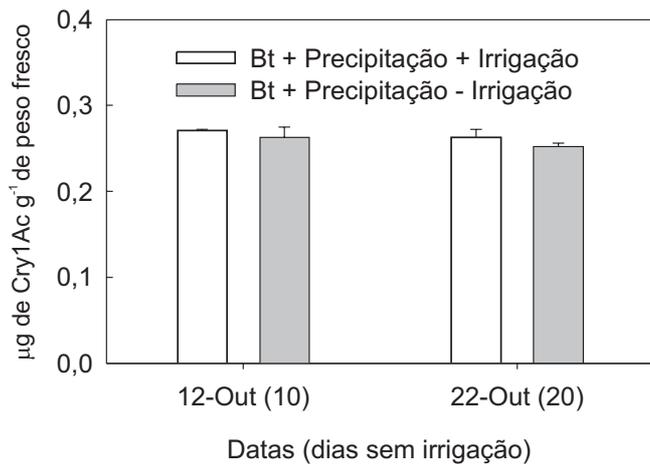


Figura 1. Produção da proteína Cry1Ac nas folhas expandidas do topo de plantas do algodoeiro Bt Acala 90B em duas idades durante o período de baixa precipitação com e sem irrigação. Paudalho, PE, 2007. Médias não diferiram entre idade de plantas e tratamentos pelo teste de t ao nível de 5% de probabilidade

Figure 1. Production of Cry1Ac in the upper fully expanded cotton leaves from the Bt-cotton variety Acala 90B at two plant ages during the dry season with and without irrigation. Paudalho, PE, Brazil, 2007. Means do not differ between plants age and with and treatments by the t-test at 5% significance levels

ponteiros de plantas em campo como em folhas do algodão Bt, em laboratório, foi de 0%, comparado a 61 e 85% de sobrevivência no ponteiro e folhas de algodão não-Bt. A ocorrência de veranicos, que são estiagens temporárias durante o período de chuvas (Castro Neto & Villela, 1986), certamente interfere na fisiologia da planta. O resultado do estresse hídrico se dá com a paralisação temporária de crescimento, perdas acentuadas de estruturas reprodutivas (Pettigrew, 2004), o que pode também interferir na produção da proteína Cry1Ac (Rochester, 2006) e, conseqüentemente, na eficácia de controle. Rochester (2006) observou uma redução de aproximadamente 20% na produção de Cry1Ac na variedade Sicot 289RRi quando submetida à condição de estresse hídrico.

A variabilidade da quantidade de Cry1Ac produzida entre partes da planta pode ser comum em função de diversos fatores do ambiente que podem interferir na fisiologia da planta. O monitoramento da produção de Cry1Ac entre as partes da planta de algodão é importante em virtude do comportamento de ataque das diferentes espécies de lepidópteros-praga do algodoeiro. A produção de Cry1Ac na planta ocorre em função do promotor gênico utilizado no processo de transformação, dos retrocruzamentos para a transferência da característica desejada (expressão da proteína Cry) da planta transformada, da variedade elite a ser cultivada e das condições edafoclimáticas (revisão em Torres et al., 2009). Além disso, como a expressão da proteína é de forma constitutiva, por sua vez, poderá ser influenciada pelos fatores do ambiente como a umidade do solo. Assim, pode ser também variável entre localidades e condições de cultivo como sequeiro, safrinha ou irrigado. No processo de

transformação do algodoeiro Bt, o sítio de expressão da Cry1Ac é predominante no citoplasma das células dos tecidos verdes. Desse modo, espera-se encontrar maiores concentrações da toxina nas partes com maior atividade metabólica e mais rica em cloroplastos como as folhas (Tabela 2). O nível de proteína encontrado nas folhas neste estudo confere garantia de controle para as lagartas de *A. argillacea*, bem como para *Heliothis virescens* Fabr., com base nas concentrações letais de Cry1Ac determinada para esta última espécie (Perlak et al., 2001). Por outro lado, não existe resultado de linha base de susceptibilidade de *A. argillacea* à proteína Cry1Ac para comparação, e os resultados encontrados mostram que esta espécie é altamente susceptível a esta proteína expressada nas diferentes idades e partes do algodoeiro Bollgard (Acala 90B).

Lagartas neonatas do curuquerê apresentaram sobrevivência acima de 80%, em laboratório, quando confinadas em folhas (Tabela 2). Entretanto, observa-se que o peso das lagartas após confinamento foi variável quando estas foram confinadas nas partes reprodutivas como botões florais e maçãs macias ao tato, em comparação àquelas confinadas em folhas. Este resultado corrobora com observações de campo em que o curuquerê comporta-se predominantemente como desfolhador do algodoeiro atacando estruturas reprodutivas apenas quando em altas infestações por ocasião de desfolha acentuada das plantas induzindo uma situação de escassez do alimento preferido. Portanto, o menor peso e sobrevivência nas partes reprodutivas do algodoeiro não-Bt é plausível.

Em campo, a sobrevivência foi variável para lagartas de *A. argillacea* (30 a 61%) em algodoeiro não-Bt em virtude de inúmeras variáveis não controladas como, por exemplo, a predação por formigas. Em contrapartida a sobrevivência de lagartas neonatas, confinadas em algodoeiro Bt, foi de duas de 300 lagartas confinadas durante três avaliações (Tabela 2). Entretanto, para lagartas de terceiro instar, foram encontrados 5% de lagartas vivas confinadas no ponteiro do algodoeiro Bt (Tabela 2). A sobrevivência de lagartas de *H. zea*, por exemplo, em estruturas do algodoeiro Bt como pétala, é possível (Gore et al., 2001), o que não tem sido observado para lagartas neonatas e de quinto instar do curuquerê (dados ainda não publicados). Foi observado que as lagartas sobreviventes quase não se alimentaram das folhas, mas a alimentação foi suficiente para ingerir a proteína detectada em seu corpo ($0,151 \pm 0,012$ µg/grama de peso fresco; n = 5 lagartas sobreviventes quando confinadas em ponteiro do algodoeiro Bt) (Tabela 2). Isto indica que possivelmente em um maior período de avaliação elas não seriam encontradas vivas.

Ao contrário dos resultados encontrados para o curuquerê, não foi observado efeito pronunciado da variedade Bt Acala 90B, sobre lagartas de *S. frugiperda*, quanto à sobrevivência e peso (Tabela 3). As diferenças observadas entre as variedades são apenas parciais devido a uma grande variabilidade na sobrevivência e ganho de peso durante o período de confinamento em campo e, portanto, um efeito subletal não pode ser claramente afirmado com base nestes resultados, pois este efeito pode ser oriundo de outras

variáveis não controladas ao nível de campo. A sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* pode ser considerada baixa em ambas as variedades Bt e não-Bt. A acentuada presença do gossipol nas folhas e brácteas possui efeito de antibiose para *S. frugiperda*, tanto que a ocorrência desta lagarta em algodoeiro é tida como esporádica embora ocorra perda significativa, em especial, quando passam a somar o complexo de lagartas que atacam as maçãs do algodoeiro (Miranda & Ferreira, 2005). Vale salientar que em maçãs com sementes ainda não definidas não se detecta a presença de gossipol (Meyer et al., 2004), o que permite o desenvolvimento e a reprodução de *S. frugiperda* com sucesso em comparação a folhas do algodoeiro (Barros et al., 2010b).

As variedades geneticamente modificadas de algodoeiro com apenas a produção da proteína Cry1Ac não são consideradas eficientes contra *S. frugiperda*, mas poderiam

atuar de forma supressiva proporcionando prolongamento da fase larval e menor peso, como observado sobre outras espécies de *Spodoptera* (e.x.: *S. exigua*) (Stewart et al., 2001; Adamczyk & Gore, 2004). Entretanto, menor peso foi observado em apenas um dos confinamentos de lagartas de primeiro instar em campo, apesar dos diversos testes de laboratório e campo empregando diferentes partes da planta (Tabela 3). A baixa sobrevivência em ambas as variedades em campo, é um resultado comum para *S. frugiperda*, o que corrobora com resultados de Ali & Lutrell (1990) e Barros et al. (2010a), e não permite diferenciar o efeito da alimentação em Bt ou em não-Bt. Por outro lado, quando as proteínas Cry2Ab são adicionadas à Cry1Ac no algodoeiro Bollgard™ II ou Cry1F e Cry1Ac no algodoeiro Widestrike®, obtém-se controle satisfatório para *S. frugiperda* (Adamczyk et al, 2001; Greenplate et al., 2003; Adamczyk & Gore, 2004).

Tabela 3. Sobrevivência e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda* criadas em algodoeiro Bt (Acala 90B) e sua isolinha não-Bt (Acala 90) durante cinco dias de confinamento em diferentes partes das plantas, em laboratório, ou em ponteiros das plantas, em campo. Paudalho, PE, 2007

Table 3. Survival and weight of *Spodoptera frugiperda* larvae raised in Bt-cotton (Acala 90B) cotton plant and its isoline non-Bt (Acala 90) caged during five days on different parts of the plants in the laboratory, or in plant terminals in the field. Paudalho, PE, Brazil, 2007

Algodão	Idade da lagarta	DAP ⁽¹⁾	Sobrevivência (%)	Peso (mg) (x ± EP)
<i>Laboratório</i>				
Folha não-Bt	Primeiro instar	63	46	5,5 ± 1,34
	98	75	6,4 ± 1,80	
	136	37	11,6 ± 1,15	
Folha Bt	Primeiro instar	63	46	5,3 ± 1,02
	98	42	5,7 ± 1,58	
	136	48	8,1 ± 0,73	
Botão floral + bráctea não-Bt	Primeiro instar	63	41	3,4 ± 0,46
	98	54	3,1 ± 0,32	
	136	29	7,1 ± 1,27	
Botão floral + bráctea Bt	Primeiro instar	63	52	2,6 ± 0,27
	98	35	5,8 ± 0,57	
	136	37	5,4 ± 0,55	
Maçã não-Bt	Primeiro instar	100	24	7,3 ± 1,45
Maçã Bt	Primeiro instar	100	20	6,3 ± 1,65
<i>Campo</i>				
Ponteiro não-Bt	Primeiro instar	63	11	5,1 ± 1,38*
	98	15	4,7 ± 1,20	
Ponteiro Bt	Primeiro instar	63	4	2,4 ± 0,60
	98	12	3,8 ± 1,01	

¹ Dias após plantio

*Médias de peso diferentes entre variedades Bt e não-Bt, para a mesma data de infestação, pelo teste *t* a 5% de probabilidade

CONCLUSÕES

A expressão da proteína Cry1Ac varia em função das partes da planta de algodão Bollgard® Acala 90B.

O cultivo do algodão Bollgard® em condições de baixa precipitação por curto período de tempo não altera a produção de Cry1Ac nas suas folhas.

A expressão da proteína Cry1Ac em todas as partes da planta de algodão é eficaz para o controle de *A. argillacea*.

O algodoeiro Bollgard® Acala 90B, produzindo apenas a proteína Cry1Ac, não possui ação supressiva em lagartas de *S. frugiperda*.

AGRADECIMENTOS

Ao projeto REDALGO Finep 0593/2007 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio.

LITERATURA CITADA

- Adamczyk, J.J.; Adams, L.C.; Hardee, D.D. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *Journal of Economic Entomology*, v.94, n.6, p.1589-1593, 2001.
- Adamczyk, J.J.; Gore, J. Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1F and both Cry1Ac and Cry1F (Widestrike®) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *The Florida Entomologist*, v.87, n.4, p.427-432, 2004.
- Adamczyk, J.J.; Holloway, J.W.; Church, G.E.; Leonard, R.B.; Graves, D.J.B. Larval survival and development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) “-endotoxin. *Journal of Economic Entomology*, v.91, n.2, p.539-545, 1998.
- Adamczyk, J.J.; Sumerford, D.V. Potential factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard® cotton. *Journal of Insect Science*, v.13, n.1, p.1-6, 2001.
- Ali, A.; Luttrell, R.G. Survival of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) immatures on cotton. *Florida Entomologist*, v.73, n.3, p.459-465, 1990.
- Almeida, R.P.; Silva, C.A.D. Silva; Ramalho, F.S. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: Beltrão, N.E.M.; Azevedo, D.M.P. (Orgs.). *O agronegócio do algodão no Brasil*. Brasília: Embrapa, 2008. p.1035-1098.
- Barros, E.M.; Torres, J.B.; Bueno, A.F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotropical Entomology*, v.39, 2010b. prelo.
- Barros, E.M.; Torres, J.B.; Ruberson, J.R.; Oliveira, M.D. Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.137, p.237-245, 2010a.
- Bennett, R.; Kambhampati, U.; Morse, S.; Ismael, Y. Farm-level economic performance of genetically modified cotton in Maharashtra, India. *The Review of Agricultural Economics*, v.28, n.1, p.59-71, 2006b.
- Bennett, R.; Morse, S.; Ismael, Y. The economic impact of genetically modified cotton on South African smallholders: yield, profit and health effects. *The Journal of Development Studies*, v.42, n.4, p.662-677, 2006a.
- Brookes, G.; Barfoot, P. Global impact of biotech crops: Socio-economic and environmental effects 1996-2006. *The Journal of Agrobiotechnology Management & Economics*, v.11, n.1, p.21-38, 2008.
- Castro Neto, P.; Villela, E.A. Veranico: um problema de seca no período chuvoso. *Informe Agropecuário*, n.12, p.59-62, 1986.
- Gore, J.; Leonard, B.R.; Adamczyk, J.J. Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) survival on ‘Bollgard’ and ‘Bollgard II’ cotton flower bud and flower components. *Journal of Economic Entomology*, v.94, n.6, p.1445-1451, 2001.
- Greenplate, J.T.; Mullins, J.W.; Penn, S.R.; Dahm, A.; Reich, B.J.; Osborn, J.A.; Rahn, P.R.; Ruschke, L.; Shappley, Z.W. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *Journal of Applied Entomology*, v.127, n.6, p.340-347, 2003.
- Martinelli, S.; Clark, P.L.; Zucchi, M.I.; Silva, M.C.; Foster, J.E.; Omoto, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, v.97, n.3, p.225-231, 2007.
- Meyer, R.; Vorster, S.; Dubery, I.A. Identification and quantification of gossypol in cotton by using packed micro-tips columns in combination with HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.380, n.4, p.719-724, 2004.
- Miranda, J.E.; Ferreira, A.C.B. Contra-ataque. *Caderno Técnico Cultivar*, v.72, p.7-10, 2005.
- Oliveira, J.E.M.; Torres, J.B.; Carrano-Moreira, A.F.; Ramalho, F.S. *Biologia de Podisus nigrispinus* predando lagartas de *Alabama argillacea* em campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, n.1, p.7-14, 2002.
- Perlak, F.J.; Oppenhuizen, M.; Gustafson, K.; Voth, R.; Sivasupramaniam, S.; Heering, D.; Carey, B.; Ihrig, R.A.; Roberts, J.K. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA – early promises versus today’s reality. *The Plant Journal*, v.27, n.6, p.489-501, 2001.
- Pettigrew, W.T. Physiological consequences of moisture deficit stress in cotton. *Crop Science*, v.44, n.4, p.1265-1272, 2004.
- Pray, C.; Huang, J.; Hu, R.; Rozelle, S. Five years of Bt cotton in China - the benefits continue. *The Plant Journal*, v.31, n.4, p.423-430, 2002.
- Richetti, A.; Melo Filho, G.A.; Lamas, F.M.; Staut, L.A.; Fabrício, A.C. Estimativa do custo de produção de algodão, safra 2004/05, para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Dourados: Embrapa Pecuária Oeste, 2004. 16p (Comunicado Técnico, 91).

- Rochester, I.J. Effect of genotype, edaphic, environmental conditions and agronomic practices on Cry1Ac protein expression in transgenic cotton. *Journal of Cotton Science*, v.10, n.4, p.252-262, 2006.
- SAS Institute. SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. Cary: SAS Institute Inc., 2001.
- Stewart, S.D.; Adamczyk, J.J.; Knighten, K.S.; Davis, F.M. Impact of Bt cotton expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *Journal of Economic Entomology*, v.94, n.3, p.752-760, 2001.
- Sumerford, D. V.; Solomon, W. L. Growth of wild *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected from Bt and Non-Bt cotton. *Florida Entomologist*, v.83, n.3, p.354-357, 2000.
- Torres, J.B.; Ruberson, J.R. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Research*, v.17, n.3, p.345-354, 2008.
- Torres, J.B.; Ruberson, J.R.; Adang, M.J. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agricultural and Forest Entomology*, v.8, n.3, p.191-202, 2006.
- Torres, J.B.; Ruberson, J.R.; Whitehouse, M. Transgenic cotton for sustainable pest management: a review. In: Lichtfouse, E. (Org.). *Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants: sustainable agriculture reviews*. Dordrecht: Springer, 2009. p.15-54.
- Traxler, G.; Godoy-Avila, S. Transgenic Cotton in Mexico. *The Journal of Agrobiotechnology Management & Economics*, v.7, n.1-2, p.57-62, 2004.