

ECOLOGY, BEHAVIOR AND BIONOMICS

Biologia Comparada e Comportamento de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) em Algodoeiro Bollgard™ e Isolinha não-Transgênica

ALBERTO B ESTEVES FILHO, JOSÉ V DE OLIVEIRA, JORGE B TORRES, MANOEL G C GONDIM JR

Depto de Agronomia/Entomologia, Univ Federal Rural de Pernambuco, Av Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil

Edited by Ítalo Delalibera Jr – ESALQ/USP

Neotropical Entomology 39(3):338-344 (2010)

Compared Biology and Behavior of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) on Bollgard™ and non-Transgenic Isoline Cotton

ABSTRACT - The two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, is a nontarget herbivore of Bt-cotton, but acquires and accumulates higher levels of Cry toxin than that expressed by transgenic plants. This work investigated the development and reproduction of *T. urticae* and of the predator *Phytoseiulus macropilis* Banks, during three successive generations looking for potential nontarget effect. In addition, behavioral studies on feeding preference, oviposition, and predation were carried out on Bt and non-Bt cottons. The development and reproduction of *T. urticae* and *P. macropilis* was conducted using leaf discs of Bt and non-Bt cottons. Arena containing leaf discs from both cotton types connected by a slide coverslip were also used in the behavioral studies. Averages of the three generations showed that the Bt-cotton does not affect the development, survival of immature stages, and reproductive output of *T. urticae* and of the predator *P. macropilis*. Furthermore, the preference for feeding and oviposition of *T. urticae* and *P. macropilis* were similar on both cotton types. In addition, *P. macropilis* exhibited similar predatory behavior on *T. urticae* fed on both cotton types. Levels of Cry1Ac toxin in *T. urticae* was 3.97 times greater than that found in the Bt-cotton plants as determined using a ELISA test. Despite of the amount of toxin acquired by the prey (*T. urticae*), no detectable levels of Cry1Ac were found in the predatory mite *P. macropilis*.

KEY WORDS: Transgenic cotton, Cry1Ac, tritrophic interaction, nontarget arthropod

O algodoeiro constitui uma das principais culturas para o agronegócio do Brasil, sendo este o quinto maior produtor mundial, com área cultivada de mais de 1,1 milhão de hectares (IBGE 2008, USDA 2008). No mundo, em 2006, foram plantados 117,7 milhões de hectares de culturas geneticamente modificadas (GM), sendo 16% somente constituída de algodoeiro Bt (James 2007). O algodoeiro, durante os seus estádios fenológicos hospeda, um grande número de artrópodos pragas, como os ácaros (Degrande 1998), sendo o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch um dos mais importantes, pois provoca perdas na produção e nas características das fibras e sementes (Oliveira & Calcagnolo 1975).

A transformação genética de plantas tem sido conduzida empregando diversos genes objetivando conferir resistência às pragas. Neste contexto, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) é, sem dúvida, o organismo mais utilizado como fonte de genes para a transformação de plantas visando à resistência, principalmente, a lepidópteros e coleópteros. O algodoeiro transgênico Bollgard™ foi produzido para expressar a toxina Cry1Ac (Perlak *et al* 2001), o qual foi liberado recentemente para o cultivo no Brasil. Mundialmente, o

algodoeiro Bollgard™ vem se tornando uma tática importante no manejo de pragas do algodoeiro por ser específico e eficaz no controle de lepidópteros-praga (O'Callaghan *et al* 2005). Segundo Shelton *et al* (2002), existem quatro δ-endotoxinas (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ab e Cry9c) que podem ser expressas separadamente ou piramidadas em plantas de milho e algodoeiro Bt, protegendo-as do ataque de pragas. Essas toxinas são produzidas constitutivamente pela planta, mas predominantemente nas folhas. Ao serem expressas continuamente, as toxinas ficam expostas aos demais herbívoros não-alvos e, consequentemente, aos seus inimigos naturais (Dutton *et al* 2002, Obrist *et al* 2006a, Torres *et al* 2006, Torres & Ruberson 2008). Entretanto, nenhum dos trabalhos realizados até o momento avaliaram os possíveis efeitos subletais das toxinas Cry ao longo de gerações ou indiretos, através da planta e comportamentais, na biologia e comportamento de *T. urticae*, praga não-alvo do algodoeiro Bt, mas que apresenta considerável exposição à toxina. Ainda, dado que o ácaro rajado apresenta susceptibilidade a formulações comerciais de Bt (Hoy *et al* 1998) e capacidade em adquirir e manter toxinas Cry da

planta hospedeira (ex. algodoeiro Bt) no seu corpo (Torres & Ruberson 2008), tem-se questionado sobre o possível efeito dessa toxina sobre seus predadores, como *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (McMurtry & Croft 1997). Não existem levantamentos populacionais sobre ácaros predadores da família Phytoseiidae em algodoeiro no Nordeste brasileiro. Entretanto, *P. macropilis* já foi encontrada alimentando-se de *T. urticae* em outras culturas, como morangueiro (Ferla *et al* 2007) e pepino (Watanabe *et al* 1994), apresentando potencial para ser usada no controle dessa praga em algodoeiro.

As informações existentes na literatura sobre a interação da toxina Cry1Ac em ácaros-pragas e predadores são escassas e, assim, o presente trabalho objetivou avaliar se a exposição a Cry1Ac produzida pelo algodoeiro Bollgard™ afetaria o desenvolvimento e a reprodução de *T. urticae* e de *P. macropilis*, durante três gerações sucessivas, e se o ácaro fitófago e seu predador apresentam alterações comportamentais de preferência alimentar e postura em algodoeiro Bt.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em estufa tipo B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $57 \pm 4\%$ para os experimentos com *T. urticae*, e umidade relativa de $56 \pm 3,5\%$ para os experimentos com *P. macropilis* alimentadas com *T. urticae*, monitorados a intervalos de 30 min (HOBO datalogger, Spectrum™ Technologies, Inc.), ambos com fotofase de 12h.

Criação de *T. urticae*. Os ácaros foram criados em plantas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) cultivadas em vasos plásticos de 5 L, contendo solo arenoso. Decorridos 10 dias após o plantio, as plantas foram infestadas com fêmeas adultas do ácaro rajado obtidas da criação estoque de laboratório. Também foram utilizadas na criação, plantas de algodoeiro Acala DP 90B (Bt) e sua isolinha Acala DP 90 (não-Bt), cultivadas em vasos plásticos de 5 L contendo solo e húmus de minhoca, na proporção de 2:1, 10 g de calcário e 10 g de NPK (na formulação 4-14-8), as quais foram infestadas aos 35 dias após o plantio. Os ácaros, também, foram criados no laboratório, em discos de folhas de algodoeiro colocados em placas plásticas, idênticas às utilizadas no estudo de biologia de *T. urticae*.

Obtenção e Criação de *P. macropilis*. O predador foi obtido em plantas de feijão-de-porco, previamente infestadas com o ácaro rajado. A criação foi mantida em laboratório à temperatura média de 25°C , utilizando-se o ácaro rajado como fonte de alimento. Folhas de *C. ensiformes* foram postas sobre papel de filtro, circundadas por algodão hidrófilo para evitar a fuga dos ácaros, sobrepostas a uma esponja saturada em água, no interior de bandejas plásticas. As folhas foram trocadas semanalmente.

Biologia de *T. urticae*. Estudou-se o desenvolvimento e reprodução de *T. urticae* em discos de folhas de algodoeiro Bt (Acala DP 90B) e sua isolinha não-Bt (Acala DP 90), durante três gerações sucessivas. Folhas da região mediana

das plantas, naturalmente preferidas pela praga (Chiavegato 1972), com 35 a 60 dias de idade, foram retiradas para confecção de discos com 5 cm de diâmetro. Estes foram dispostos sobre papel de filtro sobrepostos a uma esponja de polietileno umedecida em água e mantida em placas plásticas de 15 cm de diâmetro. Foram construídas 12 arenas, cada uma composta por cinco discos de folha de algodão, contendo dois ovos de *T. urticae* com idade de 0-6h, obtidos da criação em feijão de porco. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (Bt e não-Bt) e 60 repetições. As arenas foram examinadas a cada 12h, avaliando-se a duração e sobrevivência de cada estágio de desenvolvimento, sendo as análises realizadas com a média de dois indivíduos por disco. Após a emergência, as fêmeas foram acasaladas com machos obtidos da criação, observando-se, diariamente, o número de ovos produzidos e a longevidade dos adultos. A razão sexual foi determinada na segunda e terceira gerações. Os resultados foram submetidos aos testes de Kolmogorov e Bartlett para normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente, e transformados quando necessário para atender os pré-requisitos de testes paramétricos. Em seguida, os resultados foram analisados pelo teste t de Student dentro de cada geração, utilizando-se o programa computacional SAS version 8.02 (SAS Institute 2001). As curvas de sobrevivência específica dos adultos de *T. urticae* criados em algodoeiros Bt e não-Bt foram comparadas pelo teste Long-Rank utilizando-se do método Kaplan-Meyer usando o Proc LIFETEST of SAS (SAS Institute 2001).

Biologia de *P. macropilis*. *Tetranychus urticae* foi criada em algodoeiro Bt e não-Bt durante várias gerações antes de serem oferecidos como presa ao ácaro predador, visando avaliar o efeito da toxina Cry1Ac, adquirida pelo ácaro fitófago (presa), sobre a biologia de *P. macropilis* (predador). As arenas foram semelhantes àquelas utilizadas nos experimentos de biologia de *T. urticae*; no entanto, os discos de folhas foram circundados com algodão hidrófilo, para evitar a fuga dos predadores, formando 12 arenas. Cada arena foi composta por dois discos de folha, cada um contendo um ovo do predador com idade de 0-12h. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 24 repetições. A duração e sobrevivência de cada estágio de desenvolvimento foram avaliadas a cada 12h. Após a emergência, as fêmeas foram confinadas com machos obtidos da criação, observando-se, diariamente, o número de ovos, sobrevivência de fêmeas e machos e razão sexual na segunda e terceira gerações. Os resultados foram submetidos aos testes de Kolmogorov e Bartlett para normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente, e transformados quando necessário. Em seguida, foram submetidos ao teste t semelhante ao experimento de biologia de *T. urticae*.

Preferência alimentar de *T. urticae*. Foram utilizados discos de folhas de 5 cm de diâmetro, obtidos da parte central de folhas medianas de algodão Bt e não-Bt. Os discos foram colocados lado a lado e conectados por uma lamínula de vidro (18 x 18 mm). Esse conjunto foi disposto sobre papel de filtro, sobreposto a uma esponja saturada em água, no interior

de placas plásticas. Na porção mediana da laminula foram liberadas seis fêmeas fecundadas de *T. urticae*, obtidas da criação em feijão de porco, e após 24h avaliou-se o número de fêmeas e o número de ovos depositados em cada disco. Foram utilizados os tratamentos Bt vs Bt, Bt vs não-Bt e não-Bt vs não-Bt com 10 repetições cada (60 fêmeas por tratamento). Os resultados foram submetidos à análise de frequência de escolha e avaliados pelo teste qui-quadrado, mediante o programa computacional SAS version 8.02 (SAS Institute 2001).

Preferência alimentar de *P. macropilis*. Os experimentos foram conduzidos de forma semelhante aos anteriores; no entanto, o conjunto foi circundado com algodão hidrófilo para evitar a fuga dos predadores. Cada disco foi infestado com 20 fêmeas de *T. urticae* obtidas da criação de feijão de porco e após 12h, os ácaros foram retirados e os discos deixados com 60 ovos cada, alimento preferido pelo predador (Prasad 1967, Oliveira et al 2007a). Em seguida, na distância mediana da laminula foram liberadas quatro fêmeas fecundadas de *P. macropilis*. Decorridas 24h, avaliou-se o número de fêmeas presente em cada disco, o número de ovos depositados e o número de ovos predados. Foram utilizados os tratamentos Bt vs Bt, Bt vs não-Bt e não-Bt vs não-Bt com 10 repetições cada. Todos os experimentos foram realizados com ácaros predadores obtidos da criação de laboratório. Os resultados foram submetidos à análise de frequência de escolha e avaliados pelo teste qui-quadrado, mediante o programa computacional SAS version 8.02 (SAS Institute 2001).

Quantificação da toxina Cry1Ac. Os níveis de Cry1Ac nas amostras dos materiais coletados em algodoeiro Bt e não-Bt foram quantificados utilizando-se de placas PathoScreen® já preparadas com anticorpos para Bt-Cry1Ac/Cry1Ab ELISA e conjugados com a enzima peroxidase (Agdia® Inc., Elkhart, IN). Amostras de folhas de algodoeiro Bt e não-Bt foram coletadas e congeladas até a extração. Da mesma forma, amostras de ácaro rajado (machos e fêmeas) foram coletadas das plantas e congeladas a -20°C até a extração da toxina para posterior quantificação pelo teste de ELISA. Foram utilizadas

três amostras de 10 mg de folha e de 6 mg de *T. urticae*. A extração da toxina foi feita pelo maceramento das amostras em solução salina fostatada e Tween²⁰ (PBST), fornecidos pelos kits adquiridos da Agdia® Inc. (Elkhart, IN). O material congelado foi pesado e misturado à solução PBST 1:10 (peso/volume), sendo essa concentração utilizada para as folhas de algodoeiro. Dada a alta concentração da toxina esperada a ser quantificada no ácaro rajado (Dutton et al 2002, Torres et al 2006), nesse caso empregou-se diluição 1:40 (peso/volume) para a extração da toxina. O produto sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm por um minuto em centrífuga 80-2B Centribio, com rotor de ângulo fixo (45°) e raio de 7 cm. A quantificação dos níveis de toxinas nas amostras foi determinada pela leitura da absorbância a 450 nm. Uma curva padrão de detecção foi empregada utilizando as concentrações 0,75; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 ng/ml do positivo fornecido no kit, a partir da qual foi estimada a concentração de Cry1Ac nas amostras coletadas.

Resultados

Biologia de *T. urticae*. Os resultados de desenvolvimento de *T. urticae* não caracterizaram diferenças entre as médias das três gerações em algodoeiros Bt e não-Bt. No entanto, diferenças na duração de alguns dos estágios imaturos de desenvolvimento de *T. urticae* foram verificadas ao longo das gerações e nas interações entre o tipo de algodoeiro, gerações e estágios de desenvolvimento do ácaro (Tabela 1). Considerando a média das gerações, houve semelhança entre os estágios de desenvolvimento de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e período de ovo a adulto. No entanto, quando se considera cada geração separadamente, observam-se diferenças nos estágios de larva e protoninfa (1ª geração); deutoninfa e período ovo-adulto (2ª geração); larva e protoninfa (3ª geração) e sobrevivência total (1ª e 2ª gerações) (Tabela 2).

Quanto às características avaliadas da fase adulta de *T. urticae*, a fecundidade obtida em algodoeiros Bt e não-Bt diferiu apenas na segunda geração ($F_{1,91} = 17,48$; $P < 0,0001$)

Tabela 1 Resultados da análise de variância para fatores principais referentes à duração dos estágios imaturos de *Tetranychus urticae*, criados em discos de folha de algodoeiro Bt e não-Bt, e do predador *Phytoseiulus macropilis*. Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $57 \pm 4\%$ (presa) e $56,0 \pm 3,5\%$ (predador) e fotofase de 12h.

| Causas de variação | <i>T. urticae</i> | | | <i>P. macropilis</i> | | |
|-----------------------------|-------------------|---------|---------|----------------------|--------|---------|
| | GL | F | P | GL | F | P |
| Algodoeiro ¹ | 1 | 0,21 | 0,6463 | 1 | 0,58 | 0,4485 |
| Gerações ² | 2 | 29,31 | <0,0001 | 2 | 9,38 | <0,0001 |
| Algodoeiro*gerações | 2 | 14,55 | <0,0001 | 2 | 6,37 | 0,0018 |
| Estágios ³ | 3 | 2958,81 | <0,0001 | 3 | 371,02 | <0,0001 |
| Algodoeiro*estágios | 3 | 0,78 | 0,5031 | 3 | 4,07 | 0,0071 |
| Geração*estágios | 6 | 36,46 | <0,0001 | 6 | 6,24 | <0,0001 |
| Algodoeiro*geração*estágios | 6 | 5,24 | <0,0001 | 6 | 1,62 | 0,1389 |
| Erro | 1373 | | | 540 | | |

¹Tratamentos (Bt e não-Bt); ²Três gerações consecutivas de *T. urticae* e *P. macropilis*; ³Ovo, larva, protoninfa e deutoninfa.

Tabela 2 Duração média (dias), dos estágios de desenvolvimento de *Tetranychus urticae* (n = 60) criados em discos de folha de algodoeiro Bt (Acala DP 90B) e na sua isolinha não-Bt (Acala DP 90), e do predador *Phytoseiulus macropilis* (n = 24). Temp.: 25 ± 1°C, UR: 57,4 ± 3,8% (presa) e 56,0 ± 3,5% (predador) e fotofase de 12h.

| Estágios | 1ª geração | | 2ª geração | | 3ª geração | | Média geral | |
|----------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | Não-Bt | Bt | Não-Bt | Bt | Não-Bt | Bt | Não-Bt | Bt |
| <i>T. urticae</i> | | | | | | | | |
| Ovo | 3,7 ± 0,32 | 3,7 ± 0,37 | 3,8 ± 0,03 | 3,8 ± 0,03 | 3,7 ± 0,03 | 3,8 ± 0,03 | 3,7 ± 0,02 | 3,7 ± 0,02 |
| Larva | 1,6 ± 0,06 ¹ | 1,4 ± 0,05 | 1,6 ± 0,05 | 1,3 ± 0,08 | 1,5 ± 0,02 ¹ | 1,3 ± 0,03 | 1,4 ± 0,35 | 1,37 ± 0,32 |
| Protoninfa | 1,8 ± 0,04 ¹ | 2,0 ± 0,03 | 1,2 ± 0,04 | 1,3 ± 0,07 | 1,5 ± 0,04 ¹ | 1,2 ± 0,03 | 1,5 ± 0,03 | 1,5 ± 0,04 |
| Deutoninfa | 1,9 ± 0,1 | 1,7 ± 0,06 | 2,0 ± 0,07 ¹ | 2,2 ± 0,06 | 1,5 ± 0,04 | 1,7 ± 0,05 | 1,8 ± 0,04 | 1,8 ± 0,04 |
| Ovo-adulto | 9,3 ± 0,09 | 9,2 ± 0,06 | 8,9 ± 0,06 ¹ | 9,1 ± 0,04 | 8,9 ± 0,03 | 8,9 ± 0,03 | 9,0 ± 0,04 | 9,0 ± 0,03 |
| Sobrevivência (%) | 70,0 ± 4,20 ¹ | 86,7 ± 3,12 | 90,0 ± 2,75 ¹ | 75,8 ± 3,92 | 98,3 ± 1,75 | 99,2 ± 0,83 | 86,1 ± 1,82 | 87,2 ± 1,76 |
| <i>P. macropilis</i> | | | | | | | | |
| Ovo | 2,5 ± 0,11 | 2,4 ± 0,08 | 2,3 ± 0,08 | 2,6 ± 0,07 | 2,3 ± 0,08 | 2,27 ± 0,10 | 2,4 ± 0,05 | 2,4 ± 0,05 |
| Larva | 1,4 ± 0,03 ¹ | 1,0 ± 0,06 | 1,0 ± 0,03 | 1,0 ± 0,03 | 1,3 ± 0,05 | 1,3 ± 0,05 | 1,3 ± 0,03 ¹ | 1,1 ± 0,03 |
| Protoninfa | 1,5 ± 0,10 | 1,50 ± 0,07 | 1,2 ± 0,05 ¹ | 1,4 ± 0,05 | 1,4 ± 0,06 | 1,4 ± 0,05 | 2,4 ± 0,05 | 2,4 ± 0,05 |
| Deutoninfa | 1,6 ± 0,07 | 1,8 ± 0,05 | 1,6 ± 0,06 | 1,74 ± 0,05 | 1,4 ± 0,06 | 1,4 ± 0,05 | 1,6 ± 0,04 | 1,6 ± 0,04 |
| Ovo-adulto | 7,5 ± 0,21 | 7,3 ± 0,14 | 6,8 ± 0,15 ¹ | 7,3 ± 0,15 | 6,7 ± 0,15 | 6,8 ± 0,12 | 7,0 ± 0,11 | 7,1 ± 0,08 |
| Sobrevivência (%) | 91,7 ± 5,76 | 87,5 ± 6,89 | 95,8 ± 4,16 | 95,8 ± 4,16 | 95,8 ± 4,16 | 95,8 ± 4,16 | 94,4 ± 2,72 | 93,0 ± 3,02 |

¹Médias (± EP), dentro de cada geração, diferem estatisticamente pelo teste de “t” entre os tipos de algodoeiro (P < 0,05).

(Tabela 3). A viabilidade de ovos produzidos por fêmeas de ácaros criadas em algodoeiros Bt e não-Bt em cada geração, bem como na média das três gerações, foi semelhante. Da mesma forma, a sobrevivência de adultos de *T. urticae* foi semelhante quando criados em algodoeiro Bt e não-Bt (teste

Long-Rank; $\chi^2 = 2,41$; P = 0,1241) (Tabela 3).

Biologia de *P. macropilis*. A duração dos estágios de desenvolvimento do ácaro predador *P. macropilis* alimentados com presa (ácaro rajado) criada em algodoeiros Bt e não-

Tabela 3 Longevidade, número total de ovos, viabilidade de ovos e razão sexual de *Tetranychus urticae* criados em discos de folha de algodoeiro Bt (Acala DP 90B) e sua isolinha não-Bt (Acala DP 90), e seu predador *Phytoseiulus macropilis*. Temp.: 25 ± 1°C. UR: 57,4 ± 3,8% (presa) e 56,0 ± 3,5% (predador) e fotofase de 12h; (n) = número de repetições.

| Características | 1ª geração | | 2ª geração | | 3ª geração | | Média geral | |
|-------------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | Não-Bt | Bt | Não-Bt | Bt | Não-Bt | Bt | Não-Bt | Bt |
| <i>T. urticae</i> | | | | | | | | |
| No. de ovos/♀ | 167,4 ± 14,95 (40) | 201,1 ± 16,03 (46) | 211,0 ± 13,76 ¹ (48) | 135,5 ± 11,48 (45) | 162,7 ± 10,44 (53) | 145,9 ± 9,42 (58) | 180,5 ± 7,61 (141) | 159,9 ± 7,38 (149) |
| Viabilidade de ovos (%) | 95 | 94 | 95 | 95 | 94 | 94 | 95 | 94 |
| Longevidade de adultos | 16,7 ± 0,88 (45) | 16,6 ± 0,80 (55) | 16,8 ± 0,83 (56) | 15,7 ± 0,67 (47) | 19,7 ± 1,11 (60) | 19,4 ± 1,11 (60) | 18,8 ± 0,96 (161) | 19,0 ± 0,93 (163) |
| Razão sexual | - | - | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 0,9 | 0,8 |
| <i>P. macropilis</i> | | | | | | | | |
| No. de ovos/♀ | 21,2 ± 3,6 (18) | 21,5 ± 2,84 (18) | 31,4 ± 3,74 (20) | 31,9 ± 2,30 (18) | 31,4 ± 5,82 (21) | 24,3 ± 2,62 (20) | 28,4 ± 2,71 (58) | 25,8 ± 1,59 (57) |
| Viabilidade de ovos (%) | 98,3 | 98,5 | 98,6 | 98,7 | 98,8 | 99,1 | 98,6 | 98,8 |
| Longevidade de adultos | 28,9 ± 3,44 (22) | 36,8 ± 4,05 (21) | 32,2 ± 3,92 (23) | 30,1 ± 3,15 (23) | 27,3 ± 2,90 (23) | 31,7 ± 3,01 (23) | 29,5 ± 1,92 (68) | 33,0 ± 1,97 (67) |
| Razão sexual | - | - | 0,8 | 0,7 | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |

¹Médias (± EP), dentro de cada geração, diferem estatisticamente pelo teste “t” entre os tipos de algodoeiro (P < 0,05).

Bt foi semelhante (Tabela 1). Entretanto, foi verificado efeito de gerações, dos estágios de desenvolvimento e suas respectivas interações. O efeito dentro de cada geração e diferenças em alguns dos estágios de desenvolvimento resultou em interação significativa entre estes fatores, como verificado para os estágios de larva (1ª geração e média geral) e protoninfa e período de ovo-adulto (2ª geração). Essa diferença, entretanto, não persistiu para o período de ovo-adulto na média das três gerações consecutivas do predador se alimentando de *T. urticae* provenientes dos algodoeiros Bt e não-Bt. Da mesma forma, não foi observado diferença na sobrevivência da fase imatura de *P. macropilis* (Tabela 2).

Em relação às características da fase adulta como o número total de ovos depositados em cada geração, viabilidade de ovos e razão sexual, os resultados foram semelhantes entre os algodoeiros Bt e não-Bt (Tabela 3). Também foi observada semelhança para a sobrevivência dos adultos em ambos os tipos de algodoeiro (teste Long-Rank; $\chi^2 = 0,7731$; $P = 0,3793$).

Preferência alimentar de *T. urticae*. Nos testes de preferência alimentar e de postura, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos Bt ($\chi^2 = 0,1335$; $P = 0,7148$) e não-Bt ($\chi^2 = 0,1270$; $P = 0,7216$), respectivamente. Da mesma forma, não houve diferença nas combinações de livre escolha entre os algodoeiros não-Bt vs não-Bt; Bt vs Bt; Bt vs não-Bt. A proporção de fêmeas de *T. urticae* presentes em discos de folhas de algodoeiro Bt e não-Bt, com livre chance de escolha, foi de 53,3% e 46,6%, respectivamente. O tipo de algodoeiro também não afetou a taxa de oviposição, sendo que 48,6% e 51,4% dos ovos foram encontrados nos discos de folha de algodoeiro Bt e não-Bt, respectivamente.

Preferência alimentar de *P. macropilis*. Nos testes de comportamento do ácaro predador *P. macropilis* submetidos às diferentes combinações de escolha entre os algodoeiros Bt e não-Bt, não foram observadas alterações quanto à preferência alimentar (Bt vs não-Bt, $\chi^2 = 0,9996$; $P = 0,3174$; Bt vs Bt, $\chi^2 = 1,0905$; $P = 0,2964$; não-Bt vs não-Bt, $\chi^2 = 0,0835$; $P = 0,7726$), taxa de oviposição (Bt vs não-Bt, $\chi^2 = 1,5027$; $P = 0,2203$; Bt vs Bt, $\chi^2 = 0,000$; $P = 1,000$; não-Bt vs não-Bt, $\chi^2 = 0,0770$; $P = 0,7814$) e taxa de predação (Bt vs não-Bt, $\chi^2 = 0,2159$; $P = 0,6422$; Bt vs Bt, $\chi^2 = 2,2981$; $P = 0,1295$; não-Bt vs não-Bt, $\chi^2 = 0,9455$; $P = 0,3309$). Os percentuais de postura e predação observados para fêmeas foram 64%; 63,4% e 51,5% (Bt) e 36,0%; 36,6% e 48,5% (não-Bt), respectivamente. Assim, a predação de ovos do ácaro rajado criados e oferecidos em discos de folhas do algodoeiro Bt e não-Bt ao predador foram, em média, 23,4 e 22 ovos por disco durante 24h de exposição, respectivamente.

Quantificação da toxina Cry1Ac. O nível médio de toxina Cry1Ac (média \pm EP) presente nas folhas do algodoeiro Bt das diferentes coletas feitas ao longo do estudo de biologia de *T. urticae* foi de $0,31 \pm 0,001$ μ g de Cry1Ac/g de peso fresco de folhas. Ao atingirem a fase adulta, *T. urticae* continha, em média, $1,24 \pm 0,03$ μ g Cry1Ac/g de peso fresco de ácaro. Assim, a quantidade relativa de Cry1Ac no ácaro fitófago

é 3,97 vezes maior do que na folha do algodoeiro Bt. Os níveis da toxina em folhas de algodoeiro Bt utilizadas nos experimentos de comportamento de *T. urticae* e *P. macropilis* foram, em média, de $0,28 \pm 0,001$ e $0,29 \pm 0,007$ μ g de Cry1Ac/g de peso fresco de folha, respectivamente. A toxina Cry1Ac não foi detectada no algodoeiro não-Bt, nem em *T. urticae* criado neste hospedeiro.

Discussão

A toxina Cry1Ac produzida pelo algodoeiro Bt não afetou o desenvolvimento, longevidade, número total e viabilidade de ovos, e razão sexual de *T. urticae*, considerando-se a média de três gerações sucessivas. Estudos sobre as toxinas Cry presentes em plantas transgênicas sobre ácaros (herbívoros não-alvo), ainda são incipientes (Carter et al 2004, Rovenská et al 2005, Obrist et al 2006b), mas demonstraram que esses organismos geralmente não são afetados, apesar da grande exposição via aquisição e acúmulo da toxina em seu corpo, assim como encontrado neste estudo. Desta forma, podemos descartar a hipótese de um possível efeito negativo da toxina Cry1Ac ingerida e presente no corpo de *T. urticae* sobre o predador *P. macropilis*. Da mesma forma, podemos descartar o efeito indireto da possível alteração da qualidade da planta transgênica de algodoeiro como hospedeiro para *T. urticae*. A qualidade da planta hospedeira é fator determinante para o desempenho de um herbívoro, pois é sabido que alterações na fisiologia e bioquímica da planta afetam diretamente a fecundidade do herbívoro (Awmack & Leather 2002). Variações populacionais de *T. urticae* em algodoeiro Bt podem estar associadas a outros fatores e não a presença da toxina Cry1Ac. Mudanças na escolha dos inseticidas, como a não utilização de inseticidas de largo espectro, e na frequência de pulverizações podem ser as causas de maior ocorrência de *T. urticae* em lavouras de algodoeiro Bt, assim como observado na China (Men et al 2004, Ma et al 2006). Por outro lado, o ácaro predador *P. macropilis* possui grande potencial para ser utilizado em programas de manejo desse ácaro fitófago e também não é afetado pela sua exposição à toxina Cry1Ac.

A alimentação pelo ácaro predador *P. macropilis* em presas (ácaros) contendo a toxina Cry1Ac não afetou os estágios imaturos (ovo, protoninfa, deutoninfa), o período de ovo-adulto, a longevidade de adultos, número total e viabilidade de ovos, razão sexual e sobrevivência de adultos durante três gerações consecutivas. Na maioria das pesquisas sobre produção de plantas Bt, tem sido desconsiderado o papel que essas plantas exercem sobre o comportamento de forrageamento de inimigos naturais (Poppy & Sutherland 2004). É conhecido que a inserção de genes do Bt em plantas de algodoeiro promove mudanças em compostos secundários associados com a interação planta-herbívoro (Jallow et al 1999, Yan et al 2004). De acordo com Yan et al (2004), plantas de algodoeiro Bt produzem 5,5 e 2,8 vezes mais os voláteis α -pineno e β -pineno que algodoeiro não-Bt. De acordo com os autores, esses compostos foram responsáveis pela estimulação dos sensilos das antenas de adultos da mariposa *Helicoverpa armigera* (Hübner), praga importante do algodoeiro. Desta forma, diferenças na composição

química dos voláteis produzidos constitutivamente, ou em resposta à herbivoria, podem alterar a atratividade de plantas para algumas espécies de artrópodes predadores, ou torná-las de baixa qualidade. Entretanto, estes possíveis efeitos não foram observados nesse caso entre o algodoeiro Bt Bollgard™, o ácaro rajado *T. urticae* e o seu predador *P. macropilis*, em laboratório.

Ainda não é conhecida a existência de receptores específicos no epitélio digestivo de ácaros para os tipos de toxinas Cry presentes até o momento em plantas transgênicas. A ausência de efeito do milho Bt, que expressa a toxina Cry1Ab, foi também observado por Dutton *et al* (2003). O mesmo ocorreu com a toxina Cry1Ac presente no algodão Bollgard™ sobre o desenvolvimento dos estágios imaturos, sobrevivência de adultos e imaturos e o consumo alimentar (estimado pelo número de peletes fecais) de *Scheloribates praeincisus* (Berlese) (Acari: Oribatida) (Oliveira *et al* 2007b). *Rhizoglyphus robini* (Claparède) (Acari: Acaridae) também não foi afetada pela toxina Cry3Bb1 presente no milho Bt, em relação à sobrevivência de adultos e imaturos coletados em armadilhas no milho Bt e em quatro isolinhas não-Bt (Carter *et al* 2004). Similar aos resultados encontrados para *P. macropilis*, Obrist *et al* (2006a) verificaram que a toxina Cry1Ab no milho Bt, não afetou seu predador *Neoseiulus cucumeris* Oudemans (Acari: Phytoseiidae). No entanto, fêmeas de *N. cucumeris* alimentadas com pólen Bt apresentaram cerca de 9% de prolongamento no tempo de desenvolvimento e cerca de 17% de redução de fecundidade. Os autores explicaram esse resultado pelas possíveis diferenças nutricionais existentes entre os polens de plantas Bt e não-Bt.

Os algodoeiros Bt e não-Bt não influenciaram a preferência de adultos e produção de ovos nas diferentes combinações testadas neste estudo. Por outro lado, de acordo com Rovenská *et al* (2005), *T. urticae* preferiu plantas transgênicas de berinjela (*Solanum melongena* L.) expressando a toxina Cry3Bb, e depositou maior quantidade de ovos em relação à planta não-Bt. O mesmo comportamento foi observado para o ácaro *R. robini* em raízes de milho contendo a toxina Cry3Bb1 (Carter *et al* 2004). Por outro lado, em testes de livre escolha, *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot preferiu alimentar-se de *T. urticae* proveniente de plantas de berinjela não-Bt (Rovenská *et al* 2005). Os poucos estudos de interações de plantas Bt e ácaros, sejam fitófagos ou predadores, e, conseqüentemente, a falta de método padrão para os estudos, podem ser uma das razões dessas variações e dificuldade para a comparação entre os resultados. Deste modo, os resultados encontrados neste estudo e aqueles já publicados fornecem indícios que o comportamento de diferentes espécies de ácaros pode ser influenciado pela planta hospedeira, seus aleloquímicos e tipo de toxina heteróloga expressa pela planta. Entretanto, no presente trabalho não se observou alteração na preferência de postura e predação de *P. macropilis* entre as combinações de algodoeiro Bt e não-Bt oferecidas. Esses resultados demonstram que estudos de casos específicos devem ser conduzidos para melhor elucidar o efeito de toxinas Cry sobre ácaros fitoseídeos na interação praga-planta-inimigo natural.

Agradecimentos

A Andreia Serra Galvão pela ajuda nas análises estatísticas. A Roberto S de Castro, Rinaldo A Mota e Michele M M de Oliveira (DMV/UFRPE), pela disponibilidade de equipamentos na realização dos testes de ELISA. Ao CNPq pela concessão de bolsas de Mestrado ao primeiro autor e de produtividade em pesquisa aos demais autores.

Referências

- Awmack C S, Leather S R (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu Rev Entomol* 47: 817-844.
- Carter M E, Villani M G, Allee L L, Losey J E (2004) Absence non-target effects of two *Bacillus thuringiensis* coleopteran active δ -endotoxins on the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Claparède) (Acari, Acaridae). *J Appl Entomol* 128: 56-63.
- Chiavegato L G (1972) Ácaros da cultura algodoeira. São Paulo, Instituto Agrônômico, 28p. (Circular n°. 17).
- Degrande P E (1998) Guia prático de controle das pragas do algodoeiro. Dourados, UFMS, 60p.
- Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F (2002) Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol Entomol* 27: 441-447.
- Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F (2003) Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Chrysoperla carnea* in maize. *Biol Control* 26: 209-215.
- Ferla N J, Marchetti M M, Gonçalves D (2007). Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp, Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. *Biota Neotropica* 7: 1-8.
- Hoy C W, Feldman J, Gould F, Kennedy G G, Reed G, Wyman J A (1998) Naturally occurring biological controls in genetically engineered crops, p. 185-205. In Barbosa P (ed) Conservation biological control. San Diego, Academic Press, 396p.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008) Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 04.jan. 2008.
- Jallow M F A, Zalucki M P, Fitt G P (1999) Role of chemical cues from cotton in mediating host selection and oviposition behavior in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Aust J Entomol* 38: 359-366.
- James C (2007) Situação global da comercialização das lavouras GM: 2007. Sumário executivo. Brief 37. Disponível em: <http://www.isaaa.org>. Acesso: 06.fev.2008.
- Ma X M, Liu X X, Zhang Q W, Li J J, Ren A M (2006) Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton on a non-target pest *Tetranychus* spp. in northern China. *Insect Sci* 8: 279-286.
- McMurtry J A, Croft B A (1997) Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annu Rev Entomol* 42: 291-321.
- Men X, Ge F, Edwards C A, Yardim E N (2004) Influence of pesticide applications on pest and predatory arthropods

- associated with transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton plants. *Phytoparasitica* 32: 246-254.
- O'Callaghan M, Glare T R, Burguess E P J, Malone L A (2005) Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annu Rev Entomol* 50: 271-292.
- Obrist L B, Dutton A, Romeis J, Bigler F (2006a) Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. *Bio Control* 51: 31-48.
- Obrist L B, Klein H, Dutton A, Bigler F (2006b) Assessing the effects of Bt maize on the predatory mite *Neoseiulus cucumeris*. *Exp Appl Acarol* 38: 125-139.
- Oliveira C A L., Calcagnolo G (1975) Ação do ácaro "rajado" *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) na depreciação quantitativa da produção algodoeiro. *Biológico* 41: 307-327.
- Oliveira A R, Castro T R, Capalbo D M F, Delalibera Jr I (2007b) Toxicological evaluation of genetically modified cotton (Bollgard®) and Dipel® WP on the non-target soil mite *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida). *Exp Appl Acarol* 41: 191-201.
- Oliveira H, Janssen A, Palini A, Venzon M, Fadini M, Duarte V (2007a) A phytoseiid predator from the tropics as potential biological control agent for the spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Biol Control* 42: 105-109.
- Perlak F J, Oppenhuizen M, Gustafson K, Voth R, Sivasupramaniam S, Heering D, Carey B, R Ihrig A, Roberts J K (2001) Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA – early promises versus today reality. *Plant J* 27: 489-501.
- Poppy G M, Sutherland P (2004) Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. *Physiol Entomol* 29: 257-268.
- Prasad V (1967) Biology of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* in Hawaii (Acarina: Phytoseiidae). *Ann Entomol Soc Am* 60: 905-908.
- Rovenská G Z, Zemek R, Schmidt J E U, Hilbeck A (2005) Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bb-eggplants. *Biol Control* 33: 293-300.
- SAS Institute (2001) SAS/STAT User's guide, version 8.2, TS level 2MO. SAS Institute. Inc., Cary, N.C.
- Shelton A M, Zhao J Z, Roush R T (2002) Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu Rev Entomol* 47: 845-881.
- Torres J B, Ruberson J R (2008) Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transg Res* (available online 15 June 2007) doi: 10.1007/s11248-007-9109-8.
- Torres J B, Ruberson J R, Adang M J (2006) Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agric For Entomol* 8: 191-202.
- USDA – United States Department of agriculture (2008) <http://www.fas.usda.gov/cotton/circular/2008/January/cotton0108.pdf>. Acesso: 15.jan.2008.
- Watanabe M A, Moraes G J, Gastaldo Jr I, Nicolella G (1994) Controle biológico do ácaro rajado com ácaros predadores fitoseídeos (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) em culturas de pepino e morango. *Sci Agric* 51: 75-81.
- Yan F, Bengtsson M, Anderson P, Ansebo L, Xu C, Witzgall P (2004). Antennal response of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) to volatiles in transgenic Bt cotton. *J Appl Entomol*. 128: 354-357.

Received 11/IX/08. Accepted 15/V/09.