

EXPOSIÇÃO DE ADULTOS DE *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) EM LABORATÓRIO AO PÓLEN DOS HÍBRIDOS DE MILHO TRANSGÊNICO STATUS TL E STATUS VIPTERA

RAFAEL RODRIGUES DOS ANJOS¹; DANIEL SPAGNOL²; RAFAEL ANTÔNIO
 PASINI³; FELIPE FREIRE FRIEDRICH⁴; HELBERT CARVALHO⁵; ANDERSON
 DIONEI GRÜTZMACHER⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – rafaeldosanjos_5@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – spagnol.agro@hotmail.com;

³ Universidade Federal de Pelotas – rafa.pasini@yahoo.com.br;

⁴ Universidade Federal de Pelotas Bolsista – felipefreirefriederdich@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas Bolsista - helljunior_eafb@hotmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – anderson.grutzmacher@pq.cnpq.br

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma área de aproximadamente 15 milhões de hectares cultivados de milho (*Zea mays*) com uma produção em torno de 72 milhões de toneladas, e a ação de insetos-praga é um dos principais fatores que afeta a economicidade das lavouras de milho, por impedir o melhor aproveitamento do potencial produtivo dos híbridos atualmente disponíveis. Destacam-se entre estes insetos, a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) durante a fase vegetativa e reprodutiva, e a lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) durante a fase reprodutiva, e ambas causam danos diretos e indiretos à cultura e perdas significativas na produção (RODRIGUES; SILVA, 2011).

No grupo dos inimigos naturais dessas pragas, destaca-se o parasitoide de ovos do gênero *Trichogramma* (SÁ & PARRA, 1993), que apresenta como principal vantagem o controle das pragas ainda na fase de ovo, antes de causarem qualquer dano à cultura. Como o *Trichogramma* sp. apresenta uma ampla distribuição geográfica, está associado a várias espécies hospedeiras cultivadas, foram escolhidos como padrão para testes de seletividade pelo grupo de trabalho da “International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palearctic Regional Section (WPRS)” para registro de produtos fitossanitários.

Com o advento biotecnológico foi desenvolvida uma nova tática de controle de pragas, que consiste nas plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos. Através de apuradas técnicas de laboratório, um gene de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Berliner, 1911) (Bacillaceae) foi introduzido em plantas de milho, dando origem ao milho geneticamente modificado, conferindo alto padrão de resistência da planta a algumas espécies de lepidópteros-praga. O gene introduzido codifica a expressão de proteínas *Bt*, com ação inseticida, efetivas no controle de lepidópteros como *S. frugiperda* (HUANG et al., 2002).

Apesar dos benefícios, existem possíveis riscos relativos às plantas geneticamente modificadas. Entretanto, adultos de parasitoides de ovos têm possibilidade de exposição direta a proteínas de plantas geneticamente modificadas quando em contato com néctar extrafloral, pólen e outros fluidos de plantas, tais como seivas (xilema, floema) e fluidos provenientes de tecidos danificados (CÔNSOLI et al., 2010).

Visto a importância da integração da biotecnologia, do controle biológico e do reduzido número de trabalhos referentes com plantas geneticamente modificadas (GM), o objetivo deste estudo consistiu em avaliar o efeito da exposição de pólen sobre adultos de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879

(Hymenoptera: Trichogrammatidae) em laboratório, através da adaptação de metodologia da IOBC/WPRS.

2. METODOLOGIA

Os experimentos consistiram de adaptação das metodologias laboratoriais padronizadas pela IOBC/WPRS conforme HASSAN et al. (2000) e HASSAN; ABDELGADER (2001) e foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP), Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, UFPel, Pelotas, RS.

Os [Híbridos transgênicos (proteína expressa) - evento] e respectivos híbridos isogênicos não transgênicos testados foram: [Status TL[®] (Cry1F PAT) - Bt 11], Status[®], [Status Viptera (VIP3Aa20) - MIR 162] e Status[®]. Além dos eventos transgênicos e não transgênicos testados foram utilizados uma testemunha negativa (ausência de agrotóxico) e um padrão de reconhecida toxicidade composto pelo inseticida Lannate BR[®] (metomil), sob a máxima dosagem de campo registrada para a cultura do milho (0,6 l/ha). O produto comercial foi diluído em água destilada, considerando um volume de calda de 200 L ha⁻¹ (HASSAN et al., 2000).

Os parasitoides *T. pretiosum* utilizados nos bioensaios foram oriundos da criação em laboratório (Temperatura: 25±1°C, UR: 70±10%, Fotofase: 14 h) e conduzidos expondo-se os adultos (estágio mais sensível) ao pólen das plantas. O mesmo foi coletado e disposto de modo a criar uma película uniforme sobre a placa de vidro, quantificada em cerca de 160 grânulos de pólen cm⁻¹, quantidade aferida em microscópio estereoscópico com auxílio de um gabarito.

Posteriormente estas placas foram utilizadas para confecção das gaiolas de exposição, que consistiu de duas placas de vidro que serviram, respectivamente, de fundo e cobertura, as quais foram colocadas em uma armação de alumínio. Os tubos de emergência contendo adultos de *T. pretiosum* (24 horas de idade) foram conectados às gaiolas permitindo a entrada dos mesmos e as gaiolas de contato foram mantidas em sala climatizada nas condições de temperatura 25±1°C, umidade relativa 70±10% e fotofase 14 horas.

Ao longo dos bioensaios foram ofertados ovos do hospedeiro *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) para serem parasitados no segundo dia (seguinte à preparação das placas) três cartões de papel contendo três círculos por cartão (350±50 ovos em cada círculo), no terceiro dia dois cartões e no quinto dia apenas um cartão foi oferecido. Aos sete dias após a aplicação, as gaiolas foram desmontadas, e o número médio de ovos parasitados foi avaliado três dias após o término dos bioensaios. O número de ovos parasitados por fêmea de *T. pretiosum* de cada tratamento foi utilizado para calcular a capacidade de parasitismo, e as reduções no parasitismo ocasionadas pelos tratamentos foram comparadas com a testemunha negativa. Com base nas reduções no parasitismo os tratamentos foram classificados da seguinte maneira: classe 1=inócuo (< 30%), classe 2=levemente nocivo (30-79%), classe 3=moderadamente nocivo (80-99%) ou classe 4=nocivo (>99%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com pólen de milho no bioensaio realizado (Tabela. 1), verificando-se um parasitismo que variou de 22,11 a 23,28 ovos por fêmea. O pólen causou reduções no parasitismo de *T. pretiosum* que variaram de 2,47 a 5,04% sendo classificados como inócuos (classe 1) e que representam 100 % dos híbridos testados.

Unicamente o tratamento envolvendo o inseticida Lannate BR[®] diferiu dos tratamentos com pólen em todos os cinco tratamentos, causando uma redução de 100 % no parasitismo de ovos, sendo classificado como nocivo (classe 4).

Tabela 1 - Número médio de fêmeas por gaiola (N) e efeito do pólen de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas (NO), redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* (RP) e classificação de toxicidade (CT) segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011-2012.

Produto comercial (ingrediente ativo/ proteína expressa)	DC ¹	N ²	NO	RP ³	CT ⁴
Testemunha negativa	-----	155,29 \pm 5,50 a	23,28 \pm 0,43 a	-----	-----
Status [®]	-----	154,80 \pm 8,05 a	22,69 \pm 0,64 a	2,53	1
StatusTL [®] (Cry1Ab PAT)	-----	181,04 \pm 6,04 a	22,11 \pm 0,34 a	5,04	1
Status [®]	-----	158,68 \pm 17,00 a	22,76 \pm 2,47 a	2,47	1
Status Viptera [®]	-----	156,63 \pm 15,23 a	22,46 \pm 0,86 a	3,51	1
Lannate BR [®]	0,600	152,58 \pm 10,34 a	0,00 \pm 0,00 b	100,00	4

¹DC = Dosagem do produto comercial (Kg ou L ha⁻¹); ²Médias seguidas por letras idênticas não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste Tukey, expressando a média de quatro repetições por tratamento; ³RP = Redução no parasitismo comparado com a testemunha negativa (água destilada); ⁴Classes da IOBC/WPRS: 1=inócuo (<30%), 2=levemente nocivo (30-79%), 3=moderadamente nocivo (80-99%), 4=nocivo (>99%); ⁵Inseticida nocivo pela metodologia da IOBC.

Em média a concentração de proteínas expressas no pólen de híbridos de milho transgênico é de 3,0 a 25,0 ng/mg de peso seco, ocorrendo variação conforme o cultivar (AAB, 2012). No caso da proteína que está sendo expressa no pólen de variedades de milho *Bt*, deve ser tomado em consideração como uma importante via de exposição junto aos organismos não alvo necessitando investigação (ZHANG et al., 2004).

Efeitos do pólen de algodão transgênico expressando a proteína Cry1Ac em adultos de *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foram avaliados em laboratório, estudando sobrevivência, longevidade e razão sexual (GENG et al., 2006). Os parasitoides foram alimentados com suspensão de pólen da planta transgênica de algodão em água (20mg ml⁻¹ de água) ou mel a 10% não diferindo significativamente daqueles alimentados com suspensão de pólen em água ou de mel a 10% de plantas de algodão convencional e os autores observaram que não houve efeitos prejudiciais sobre os parâmetros biológicos da espécie. Quanto a sobrevivência e parasitismo, tal dado coincide com os da presente pesquisa, onde tais parâmetros não foram afetados pelos tratamentos contendo pólen (Tabela. 1).

Com a grande utilização da piramidação de genes nas plantas transgênicas, onde uma única planta pode expressar mais de uma proteína tóxica (controle de lepidópteros, dípteros, coleópteros) é essencial continuar estudando

o possível efeito sobre inimigos naturais e sua fisiologia. Deste modo, deve-se adaptar a metodologia para demais parasitoides e predadores, levando em conta as fases mais sensíveis dos inimigos naturais.

4. CONCLUSÕES

Pelos resultados da presente pesquisa, o pólen dos híbridos de milho testados não tiveram efeito sobre o parasitismo e mortalidade de *T. pretiosum*. Os híbridos foram classificados como inócuos (classe 1).

A adaptação da metodologia da IOBC se mostrou adequada para os bioensaios com o parasitoide *T. pretiosum*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAB. **Biopesticides registration action document: United States of America 2012/09**. United States of America: AAB. 2012. 249p

CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. **Progress in biological control - egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on *Trichogramma***. Piracicaba: ESALQ, 2010. 465 p.

GENG, J. H.; SHEN Z. R.; SONG K.; ZHENG L. Effect of pollen of regular cotton and transgenic *Bt-CpTI* cotton on the survival and reproduction of the parasitoid wasp *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in the laboratory. **Environmental Entomology**, Washington, n.35, p.1661-1668, 2006.

HASSAN, S. A.; ABDELGADER, H. A sequential testing program to assess the effects of pesticides on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae). **IOBC/WPRS Bulletin**, Reinheim, v. 24, p. 71-81, 2001.

HASSAN, S.A.; HALSALL, N.; GRAY, A.P.; KUEHNER, C.; MOLL, M.; BAKKER, F.M.; ROEMBKE, J.; YOUSEF, A.; NASR, F.; ABDELGADER, H. A. A laboratory method to evaluate the side effects of plant protection products on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae). In: CANDOLFI, M.P.; BLÜMEL, S.; FORSTER, R.; BAKKER, F.M.; GRIMM, C.; HASSAN, S.A.; HEIMBACH, U.; MEAD-BRIGGS, M.A.; REBER, B.; SCHMUCK, R.; VOGT, H. (eds.): **Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods**, Reinheim: IOBC/WPRS. 2000. p.107-119.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L.L.; HIGGINS, R.A.; LI, H. Survival of Kansas Dipel-resistant European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on *Bt* and non-*Bt* corn hybrids. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v.95, n.3, p.614-621, 2002.

RODRIGUES, L. R.; SILVA, P.R. F. (Org.). Indicações técnicas para o cultivo do milho e do sorgo no Rio Grande do Sul: Safras 2011/2012 e 2012/2013. In: 56ª **REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE MILHO E 39ª REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE SORGO**. Ijuí/RS: Emater/RS, Fepagro. 2011. 140 p

SÁ, L.A.N.; PARRA, J.R.P. Efeito do número e intervalo entre liberações de *Trichogramma pretiosum* Riley no parasitismo e controle de *Helicoverpa zea* (Boddie), em milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.50, n.3, p.355-359, 1993.

ZHANG, G. R.; O. ZIMMERMANN.; HASSAN, S.A. Pollen as a source of food for egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biocontrol Science Technology**, Abingdon, v.14, p. 201- 209, 2004.