

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Efeitos de inibidores de proteinases de soja em organismos não-alvo associados
à cultura da cana-de-açúcar**

Renata Araújo Simões

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Renata Araújo Simões
Engenheira Agrônoma

**Efeitos de inibidores de proteinases de soja em organismos não-alvo associados à
cultura da cana-de-açúcar**

Orientador:

Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2007**

A Jacy,
mãe, refúgio, companheira e guardiã solidária de todos
os meus dias
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprendizagem e qualificação.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, que foi fundamental na conclusão de mais uma etapa da minha realização profissional.

Ao professor Italo Delalibera Jr., pela orientação e paciência no decorrer do mestrado.

Aos professores dos Departamentos de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola e de Genética, especialmente Gilberto José de Moraes, Luís Carlos Marchini, José R. P. Parra, Sérgio B. Alves, Fernando Luis Cònsoli, Márcio de Castro e Daniel Scherer de Moura, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Solange Aparecida Vieira, Neide Graciano Zério, Vitor Celso da Silva, Larissa Cristina Deppmann Nadalini e Ane Hackbart de Medeiros, pelo auxílio na execução dos experimentos.

À Sabrina Moutinho Chabregas do Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba/SP, pelo apoio e solicitude.

À Fapesp, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos e companheiros da Entomologia e Zoologia, que de forma direta e/ou indireta me ajudaram muito a concluir este trabalho.

A minha família e Vinicius Ruys, pela dedicação e suporte financeiro.

Aos funcionários do setor de Zoologia Agrícola e da Biblioteca Central da ESALQ, que me auxiliaram durante o mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
Referências.....	13
2 EFEITOS DE INIBIDORES DE PROTEINASES (KUNITZ E BOWMAN-BIRK) NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Scheloribates praeincisus</i> (ACARI: ORIBATIDA).....	18
Resumo.....	18
Abstract.....	18
2.1 Introdução.....	19
2.2 Desenvolvimento.....	22
2.2.1 Material e métodos.....	22
2.2.1.1 Criação de <i>Scheloribates praeincisus</i>	22
2.2.1.2 Testes com inibidores de proteinases de soja.....	23
2.2.1.3 Teste com cana-de-açúcar geneticamente modificada	25
2.2.1.4 Ensaio enzimático para a atividade da tripsina em folhas de cana-de-açúcar.....	25
2.2.1.5 Análises estatísticas.....	26
2.2.2 Resultados.....	26
2.2.2.1 Testes com inibidores de proteinases de soja.....	26
2.2.2.2 Teste com cana-de-açúcar geneticamente modificada.....	28
2.2.2.3 Ensaio enzimático para a atividade da tripsina em folhas de cana-de-açúcar.....	30
2.2.3 Discussão.....	32
2.3 Conclusões.....	33
Referências.....	34

3 CRESCIMENTO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>Metarhizium anisopliae</i> (MESTCH.) SOROKIN (ASCOMYCETES: HYPOCREALES - FASE ANAMÓRFICA) EM MEIOS DE CULTURA COM INIBIDORES DE PROTEINASES.....	37
Resumo.....	37
Abstract.....	37
3.1 Introdução.....	38
3.2 Desenvolvimento.....	40
3.2.1 Material e métodos.....	40
3.2.2 Resultados.....	41
3.2.3 Discussão.....	46
3.3 Conclusões.....	48
Referências.....	48
4 INIBIDORES DE PROTEINASES AFETANDO A PROPORÇÃO SEXUAL DE <i>Cotesia flavipes</i> (Cameron) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE).....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
4.1 Introdução.....	52
4.2 Desenvolvimento.....	54
4.2.1 Material e Métodos.....	54
4.2.1.1 Avaliação dos efeitos indiretos de inibidores de proteinases semi-purificados em <i>Cotesia flavipes</i>	54
4.2.1.1.1 Criação de <i>D. saccharalis</i> com inibidores de proteinases semi-purificados.....	54
4.2.1.1.2 Parasitismo de <i>D. saccharalis</i> alimentada com IPs semi-purificados pelo parasitóide <i>C. flavipes</i>	57

4.2.1.2 Efeito direto de inibidores de proteinases purificados dos tipos Bowman-Birk (BBI) e Kunitz em <i>C. flavipes</i>	58
4.2.2 Resultados	59
4.2.2.1 Avaliação dos efeitos indiretos de inibidores de proteinases semi-purificados em <i>Cotesia flavipes</i>	59
4.2.2.2 Efeito direto de inibidores de proteinases purificados dos tipos Bowman-Birk (BBI) e Kunitz em <i>C. flavipes</i>	59
4.2.3 Discussão.....	62
4.3 Conclusões.....	64
Referências.....	65
5 IMPACTO DE INIBIDORES DE PROTEINASES DE SOJA NO DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>Apis mellifera</i> (HYMENOPTERA: APIDAE).....	68
Resumo.....	68
Abstract.....	68
5.1 Introdução.....	69
5.2 Desenvolvimento.....	71
5.2.1 Material e Métodos.....	71
5.2.2 Resultados.....	73
5.2.3 Discussão.....	74
5.3 Considerações Finais.....	75
Referências.....	76

RESUMO

Efeitos de inibidores de proteinases de soja em organismos não-alvo associados à cultura da cana-de-açúcar

Genes de plantas que codificam inibidores de enzimas digestivas de insetos têm sido introduzidos em plantas cultivadas visando o controle de pragas. Os inibidores de proteinases estão presentes nos tecidos vegetais, principalmente nas sementes, e atuam em resposta a ataques por herbívoros e patógenos. Inibidores de serino-proteinases (IPs) dos tipos Bowman-Birk e Kunitz isolados de sementes de soja foram inseridos em variedades de cana-de-açúcar para aumentar a resistência à broca *Diatraea saccharalis* (Fabr.), principal praga desta cultura. Para utilização de plantas geneticamente modificadas contendo inibidores de proteinases é necessário um conhecimento profundo de sua sustentabilidade e segurança ambiental, determinando a estabilidade da característica inserida e os seus efeitos nos organismos não-alvo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos diretos e indiretos de inibidores de proteinases de soja em organismos não-alvos: um parasitóide larval, *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae); um patógeno, *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes); um polinizador, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e um decompositor, *Scheloribates praeincisus* (Berlese) (Acari: Oribatida: Scheloribatidae); associados à cultura da cana-de-açúcar. O consumo de Kunitz e BBI não afetou a sobrevivência de *S. praeincisus*. Por outro lado, a ingestão dos inibidores semi-purificados e purificados do tipo Kunitz diminuiu a duração das fases imaturas de *S. praeincisus*. A ingestão de folhas de cana GM expressando inibidores de proteinases (Kunitz e BBI) não afetou o tempo de desenvolvimento e a sobrevivência dos imaturos deste oribatídeo quando comparada à ingestão de suas isolinhas. Os inibidores de proteinases semi-purificados e purificados não afetaram a duração dos períodos larval e pupal, o peso e número de pupas e percentual de emergência do parasitóide *C. flavipes* em *D. saccharalis*. Por outro lado, a proporção de fêmeas em relação a machos de *C. flavipes* foi maior no tratamento onde as lagartas foram alimentadas com dieta contendo 0,5% de inibidores semi-purificados comparado-se à testemunha. A proporção fêmea:macho foi significativamente maior também quando os parasitóides foram alimentados com o inibidor do tipo Kunitz em relação ao controle e aos parasitóides alimentados com BBI. A adição de 0,5% (p/v) de inibidores de proteinases semi-purificados e 0,05% (p/v) de inibidores purificados do tipo Kunitz nos meios de cultura MC e BDA resultaram em maiores crescimento vegetativo e produção de conídios de *M. anisopliae*. Os inibidores purificados do tipo BBI não alteraram a esporulação do fungo. Os resultados dos estudos com *A. mellifera* não foram conclusivos e novas investigações precisam ser conduzidas para esclarecer os potenciais efeitos de inibidores de proteinases em abelhas. De uma forma geral, observou-se que os inibidores de proteinases (Kunitz e BBI) não afetaram negativamente os organismos não-alvo testados. Por outro lado, a ingestão de inibidor do tipo Kunitz alterou positivamente alguns parâmetros biológicos de *C. flavipes*, *M. anisopliae* e *S. praeincisus*.

Palavras-chave: Inibidores de proteinases; Cana-de-açúcar; Organismos não-alvo; *Diatraea saccharalis*; *Cotesia flavipes*; *Metarhizium anisopliae*; *Apis mellifera*; *Scheloribates praeincisus*

ABSTRACT

Effects of soybean proteases inhibitors on non-target organisms associated to sugarcane

Genes of plants expressing insect proteinase inhibitors have been introduced into plants for pest control. Proteases inhibitors are present in plant tissues, mainly in seeds, and act in response to predators and pathogens. The Bowman-Birk type and Kunitz type of serine proteases inhibitors (PI) from soybean seeds are been used to increase resistance of sugarcane to *Diatraea saccharalis* (Fabr.), the most important pest of this crop. The sustainability and environmental safety of PI crops is still unknown. For these reasons, it is necessary to understand the stability and the non-target effects of this new trait. The objective of this study was to evaluate the direct and indirect effects of soybean PI on the following non-target organisms associated to sugarcane: the larval parasitoid, *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae); the entomopathogen, *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes); the pollinator *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) and the soil mite involved in the process of recycling organic matter, *Scheloribates praeincisus* (Berlese) (Acari: Oribatida: Scheloribatidae). Kunitz and BBI did not affect *S. praeincisus* survival. On the other hand, Kunitz semi-purified and purified inhibitor ingestion reduced duration of the immature stages of *S. praeincisus*. Ingestion of GM senescent leaves did not have an effect on mite immatures development time and survival compared to ingestion of its isolines leaves. The semi-purified and purified proteinases inhibitors did not alter either the duration of larval and pupal stages of *C. flavipes* on *D. saccharalis*, or weight and number of pupae and parasitoid emergence. In other hand, the parasitism and proportion of female was higher on the treatment where caterpillars were fed with diet containing 0.5% of semi-purified inhibitors, comparing to control. The ratio female:male was significantly higher also when parasitoids were fed to the Kunitz type inhibitor compared to the control and BBI. The addition of 0.5 % (w/v) of semi- purified proteinase inhibitors and 0.05% (w/v) of Kunitz type purified inhibitors on two culture media (CM and PDA), resulted in increase of vegetative growth and production of conidia. BBI type purified inhibitors did not change the fungus sporulation. The results from the studies with *A. mellifera* were not conclusive and investigations are needed to clarify the potential impact of proteinase inhibitors on *A. mellifera*. Overall, proteinase inhibitors (Kunitz and BBI) did not negatively affect the non-target organisms tested. Conversely, ingestion of the Kunitz type of proteinase inhibitors altered positively some biological parameters of *C. flavipes*, *M. anisopliae* and *S. praeincisus*.

Keywords: Proteases inhibitors; Sugarcane; Non-target organisms; *Diatraea saccharalis*; *Cotesia flavipes*; *Metarhizium anisopliae*; *Apis mellifera*; *Scheloribates praeincisus*

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de DNA recombinante e a construção de plantas transgênicas trouxeram importantes avanços científicos, permitindo a geração de plantas com valor nutricional e/ou terapêuticas mais elevados, e mais resistentes aos diferentes tipos de pragas. Após o desenvolvimento de plantas contendo genes que expressam toxinas protéicas do *Bacillus thuringiensis*, considerado um dos marcos pioneiros nesta nova abordagem (ANDREWS et al., 1987), de forma análoga, genes endógenos das plantas, codificando principalmente inibidores de enzimas digestivas de insetos-praga, foram introduzidos em diferentes espécies de plantas com o objetivo de controlar fitófagos (HILDER et al., 1987; JOUANIN et al., 1998). Recentemente foi demonstrado que a expressão de uma toxina do *B. thuringiensis* em cana-de-açúcar, além de controlar a principal praga da cultura (*Diatraea saccharalis* (Fabr.)), não interferiu em características agrônômicas da planta (BRAGA et al., 2003). Entretanto, por serem genes introduzidos de espécies com relativa distância filogenética (bactéria-plantas) ainda há dificuldade na aceitação desta transformação por parte dos consumidores quanto à segurança alimentar e ambiental. A potencialização dos sistemas defensivos endógenos das plantas, manipulando a expressão de suas próprias proteínas de defesa, ou daquelas obtidas de vegetais com proximidade taxonômica é uma estratégia que tem sido atualmente explorada. Evolutivamente as plantas desenvolveram mecanismos complexos de defesa, encontrados principalmente em suas sementes, como um suporte de substâncias constitutivas e/ou induzidas, promovendo resistência, por exemplo, a insetos herbívoros (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). Os inibidores de proteinases (IPs) são um dos componentes protéicos supostamente com ação protetora para o vegetal, possibilitando o uso de seu próprio repertório genético, ou mesmo de outras plantas, para elevar sua resistência a insetos e/ou fitopatógenos através de técnicas envolvendo a manipulação desses genes específicos (CHRISPEELS, 1997; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Em geral, os inibidores são classificados em função da classe de proteinases sobre as quais atuam, serino-, cisteíno-, aspártico- ou metalo-proteinases, de acordo com o grupo químico responsável pela ação enzimática no sítio ativo da proteína.

Inibidores de proteinases das famílias Kunitz e Bowman-Birk inibem serino-proteinases, particularmente tripsina (MAJOR; CONSTABEL, 2007), sendo alguns dos mais estudados. Os

BBI foram isolados e caracterizados pela primeira vez em sementes de soja (BOWMAN, 1946; BIRK et al., 1963) sendo posteriormente encontrados em outras leguminosas (NORIOKA; IKENAKA, 1983; TANAKA et al., 1997) e em gramíneas (ODANI et al., 1986).

Plantas transgênicas expressando inibidores de serino- ou cisteíno-proteinases têm sua resistência potencializada a certos insetos das Ordens Lepidoptera e Coleoptera, respectivamente, comprovando a função dessas proteínas nos mecanismos de defesa das plantas (RYAN, 1989; 1990; SCHULER et al., 1998; FALCO et al., 2001).

A broca da cana, *D. saccharalis*, é a praga mais importante da cana de açúcar no Brasil. Embora seu controle seja realizado com o parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.), existe um dano residual de 10%, incentivando alguns pesquisadores a elevar a resistência das variedades de cana. Experimentos em laboratório revelaram que os inibidores da soja do tipo Kunitz e Bowman-Birk afetam negativamente o crescimento, desenvolvimento e potencial reprodutivo de *D. saccharalis* (POMPERMAYER et al., 2001). Posteriormente, foi demonstrado que estes efeitos também ocorrem quando as lagartas se alimentam de plantas transgênicas de cana que expressam os inibidores de proteinases (FALCO; SILVA-FILHO, 2003). Embora os resultados preliminares indiquem que os IP isoladamente não foram suficientes para prevenir danos nas plantas de cana, as plantas transgênicas apresentam certo grau de resistência, indicando a viabilidade do uso desta técnica como fonte alternativa de manejo.

No entanto, a segurança de variedades geneticamente modificadas (GM) deve ser avaliada cientificamente caso a caso, dependendo do tipo de modificação genética inserida. Dois fatores que determinarão a sustentabilidade de plantas GM resistentes a insetos na agricultura são os seus efeitos em organismos não-alvo e a estabilidade desta resistência aos organismos alvo. Para tanto, vários protocolos de avaliação de riscos de plantas transgênicas foram elaborados (DUTTON et al., 2003; COWGILL; ATKINSON, 2003; ANDOW; HILBECK, 2004; ANDOW et al., 2006), assim como modelos probabilísticos para simular a evolução da resistência ao gene inserido e com isto evitar a perda da eficiência de controle das pragas alvo (MAIA; NETO, 2004).

Plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos que expressam genes derivados de plantas como inibidores de proteases, ureases, inibidores de amilases e lectinas foram testadas em um número limitado de espécies não-alvo. Estas poucas pesquisas com inibidores de proteases e lectinas em geral revelaram que os efeitos destes a inimigos naturais não

são substanciais quando expressados em plantas transgênicas ou através de presas alimentadas em dietas artificiais (O'CALLAGHAN et al., 2005). Em alguns casos foram detectados efeitos negativos em inimigos naturais criados em dietas artificiais contendo estas substâncias, mas os mesmos resultados não foram reproduzidos quando plantas transformadas foram utilizadas. Este é o caso, por exemplo, da lectina *Galanthus nivalis* aglutinina (GNA) nos parasitóides *Aphidius ervi* (COUNTY et al., 2001) e *Cotesia flavipes* (SÉTAMOU et al., 2002). Podem ser citadas diversas pesquisas em laboratório referentes aos efeitos de inibidores de proteinase em organismos polinizadores como *Apis mellifera* L. e *Bombus terrestris* L. (BURGESS et al., 1996; GIRARD et al., 1998; MALONE et al., 2000; BABENDREIER et al., 2005; DECHAUME-MONCHARMONT et al., 2005) ou mesmo em fungos fitopatogênicos (CHILOSI et al., 2000). Com exceção de plantas Bt, o impacto de plantas GM resistentes a insetos em condições de campo ainda é desconhecido.

Por terem um espectro de atividade maior do que endotoxinas do *B. thuringiensis*, os inibidores de proteases, ureases, inibidores de amilases e lectinas têm maior chance de afetarem organismos não-alvo. Como é impraticável avaliar o risco em cada grupo funcional das espécies não-alvo potencialmente afetadas, os grupos de maior importância e maior risco devem ser selecionados, relegando grande relevância à fase de seleção das espécies a serem avaliadas. Risco é definido como uma função da exposição e do perigo. O perigo é inerente à característica do gene inserido e do seu impacto potencial nos organismos não-alvo. Já a exposição mede a extensão do contato do organismo ao perigo. Para as transformações propostas neste trabalho, as espécies a serem selecionadas para estudos de análise de risco devem conter representantes dos organismos polinizadores, agentes naturais de controle biológico, decompositores e organismos relevantes em outras funções no solo, representantes de outros sistemas biológicos. Uma importante forma de direcionar a seleção de espécies não-alvo é através da determinação do nível de expressão do transgene em diferentes partes da planta (floema, mesófilo, pólen, raízes, etc). Caso sejam observados efeitos adversos de plantas GM em laboratório e casa de vegetação, estes precisam ser comparados àqueles associados ao uso de inseticidas ou mesmo de variedades desenvolvidas pelo melhoramento convencional.

Os organismos não-alvo selecionados, devido associação à cultura da cana-de-açúcar, estão expostos aos inibidores de proteinases expressos nessas plantas de formas direta e/ou indireta: o panfitófago *Scheloribates praeincisus* (Berlese) (Acari: Oribatida: Scheloribatidae) ao

triturar e digerir a matéria orgânica disponível no solo (HARTENSTEIN, 1962), o polinizador *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) ao ingerir seiva e conteúdo celular da cana-de-açúcar extravasada durante a colheita (NOGUEIRA-COUTO, 1996), o fungo de solo *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycetes: Hypocreales - fase anamórfica), patogênico a *D. saccharalis*, e o parasitóide *C. flavipes* ao utilizarem larvas de *D. saccharalis* como hospedeiro (ALVES et al., 1990; GALLO et al., 2002) ou mesmo ao aproveitarem material extravasado das plantas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos diretos de: (a) inibidores de proteinases (IPs) de soja (semi-purificado e purificados dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI)) e de cana geneticamente modificada para expressão destes inibidores no desenvolvimento de imaturos do ácaro de solo *S. praeincisus*; (b) IPs semi- e purificados dos tipos Kunitz e BBI no crescimento vegetativo e esporulação de *M. anisopliae*; (c) IPs semi-purificados no desenvolvimento de colônias de *A. mellifera* e (d) IPs purificados nos parâmetros biológicos de *C. flavipes* parasitando lagartas de *D. saccharalis*, além dos efeitos indiretos de lagartas criadas em dietas com inibidores de semi-purificados nos parâmetros já citados da biologia deste parasitóide.

Referências

ALVES, S.B.; BOTELHO, P.S.M.; SALOMÃO, R. Influência de diferentes tipos de alimento na suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) aos fungos *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Vacaria, v. 19, p. 383-391, 1990.

ANDOW, D.A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, Washington, v. 54, n. 7, p. 637-649, 2004.

ANDOW, D.A.; HILBECK, A.; FONTES, E. M. Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: A Case Study of Bt Cotton in Brazil. **Hardback**, Oxford, v. 2, p. 400, 2006. Disponível em: <<http://www.gmo-guidelines.info/public/regions/brazil.html>>. Acesso em: 20 maio 2007.

ANDREWS, R.E.; FAUST, R.M.; WABIKO, H.; RAYMOND, K.C.; BULLA, L.A. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 6, p. 163-232, 1987.

BABENDREIER, D.; KALBERER, N.M.; ROMEIS, J.; FLURI, P.; MULLIGAN, E.; BIGLER, F. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. **Apidologie**, Paris, v. 36, p. 585-594, 2005.

BIRK, Y.; GERTLER, A.; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 87, p. 281-284, 1963.

BOWMAN, D.E. Differentiation of soy bean anti-tryptic factors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 63, p. 547-550, 1946.

BRAGA D.P.V.; ARRIGONI E.D.B.; SILVA-FILHO M.C.; ULIAN E.C. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, New York, v. 5, p. 209-222, 2003.

BURGESS, E.P.J; MALONE, L.A.; CHRISTELLER, J.T. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, n. 9, p. 823-828, 1996.

CARLINI, C.R.O.; GROSSI-DE-SA, M.F. Plant proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CHILOSI, G.; CARUSO, C.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; BUZI, A.; NOBILE, M.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Antifungal activity of a Bowman-Birk-type trypsin inhibitor from wheat kernel. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 477-481, 2000.

CHRISPEELS, M. J. Transfer of bruchid resistance from the common bean to other starchy grain legumes by genetic engineering with the a-amylase inhibitor gene. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 4, p. 139-156, 1997.

COUTY, A.; DOWN, R.E.; GATEHOUSE, A.M.R.; KAISER, L.; PHAM-DEL'EGUE, M.H.; POPPY, G.M. Effects of artificial diet containing GNA and GNA-expressing potatoes on the development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, p. 1357-1366, 2001.

COWGILL, S.E.; ATKINSON, H.J. A sequential approach to risk assessment of transgenic plants expressing protease inhibitors: effects on nontarget herbivorous insects. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 12, p. 439-449, 2003.

DECHAUME-MONCHARMONT, F.X.; AZZOUZ, H.; PONS, O.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Soybean proteinase inhibitor and foraging strategy of free flying honeybees. **Apidologie**, Paris, v. 36, p. 421-430, 2005.

DUTTON, A.; ROMEIS, J. AND BIGLER, F. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. **BioControl**, Dordrecht, v. 48, p. 611-636, 2003.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 761-766, 2003.

FALCO, M.C.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p., 113-122, 2001.

GALLO, D; NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B. Pragas das plantas e seu controle. In: _____. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: Agrônomicas Ceres, 2002. cap. 12, p. 397-912.

GIRARD, C.; PICARD-NIZOU, A.L.; GRALLIEN, E.; ZACCOMER, B.; JOUANIN, L.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 7, p. 239-246, 1998.

HARTENSTEIN, R. Soil Oribatei. I. Feeding specificity among forest soil Oribatei (Acarina). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 55, p. 202-206, 1962.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, London, v. 330, p.160-163, 1987.

JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, Amsterdam, v. 131, p. 1-11, 1998.

MAIA, A.H.N.; NETO, D.D. Probabilistic tools for assessment of pest resistance risk associated to insecticidal transgenic crops. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 481-485, 2004.

MAJOR, I.T; CONSTABEL, C.P. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. **Plant Physiology**, Rockville, v. 16, p. 106-229, 2007.

MALONE, L.A.; BURGESS, E.P.J.; STEFANOVIC, D.; GATEHOUSE, H.S. Effects of four proteinase inhibitors on the survival of worker bumblebees, *Bombus terrestris* L. **Apidologie**, Paris, v. 31, p. 25-38, 2000.

NOGUEIRA-COUTO, R.H. Produção de geléia real utilizando dietas artificiais em regiões canavieiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., 1996. **Anais ...Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura**, 1996. p. 383.

NORIOKA, S.; IKENAKA, T. Amino acid sequence of trypsin chymotrypsin inhibitors (AI, AII, BI and BII) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 94, p. 589-599, 1983.

O'CALLAGHAN M., GLARE T.R., BURGESS E.P.J., MALONE L.A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 50, p. 271-292, 2005.

ODANI, S; KOIDE, T.; ONO, T. Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 100, p. 975-983, 1986.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, p. 79-85, 2001.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. **Bioessays**, Cambridge, v. 10, p. 20-24, 1989.

_____. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 16, p. 168-175, 1998.

SETAMOU, M.; BERNAL, J.S.; LEGASPI, J.C.; MIRKOV, T.E. Effects of snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin) expressed in transgenic sugarcane on fitness of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the nontarget pest *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 95, p. 75–83, 2002.

TANAKA, A.S.; SAMPAIO, U.M.; MARANGONI, S. Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 378, p. 273-281, 1997.

2 EFEITOS DE INIBIDORES DE PROTEINASES (KUNITZ E BOWMAN-BIRK) NO DESENVOLVIMENTO DE *Scheloribates praeincisus* (ACARI: ORIBATIDA)

Resumo

Inibidores de proteinases de plantas têm sido introduzidos em plantas cultivadas, atuando em resposta a ataques de herbívoros e patógenos. Inibidores de serino-proteinases dos tipos Bowman-Birk (BBI) e Kunitz têm sido utilizados para aumentar a resistência de variedades de cana-de-açúcar à broca *Diatraea saccharalis*, principal praga desta cultura. Sendo muito importantes as avaliações do impacto de cultivares transgênicas nos organismos não-alvo. O objetivo desta pesquisa foi investigar os efeitos diretos de inibidores de proteinases semipurificados e purificados de soja e de plantas de cana-de-açúcar GM, para expressão destes inibidores, no ácaro edáfico *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida: Scheloribatidae). Este ácaro é abundante em agroecossistemas e participa no processo de decomposição da matéria orgânica e, desta forma, estará exposto aos inibidores de proteinases ao alimentar-se dos restos culturais das plantas GM incorporados ao solo. Ovos de *S. praeincisus* foram individualizados em unidades experimentais, mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, escotofase de 24h e 96% de umidade relativa. Após a eclosão das larvas, os imaturos foram alimentados com folhas de cana-de-açúcar maceradas acrescidas com inibidores de proteinases semi- ou purificados (Kunitz ou BBI) em sete concentrações diferentes e controle (sem inibidores). A segunda etapa do experimento foi composta por imaturos alimentados com variedades de cana GM expressando inibidores de proteinases dos tipos Kunitz e BBI e com suas respectivas isolinhas. Em ambas as etapas foram adotadas 15 repetições por tratamento, sendo utilizados como parâmetro de avaliação o tempo de desenvolvimento das fases e total (larva-adulto) e sobrevivência de *S. praeincisus*. O consumo de Kunitz e BBI não afetou a sobrevivência de *S. praeincisus*. Por outro lado, a ingestão dos inibidores semi-purificados e purificados do tipo Kunitz diminuiu a duração das fases imaturas de *S. praeincisus*. Além disso, foram realizados ensaios de atividade enzimática da tripsina nas folhas senescentes das variedades de cana GM. Folhas senescentes das plantas transgênicas apresentaram uma moderada redução da atividade da tripsina. A ingestão destas folhas não afetou o tempo de desenvolvimento e a sobrevivência dos imaturos deste oribatídeo comparada à ingestão de suas isolinhas. Estes resultados indicam a segurança do cultivo destas plantas de cana-de-açúcar transgênicas para a espécie não-alvo *S. praeincisus*.

Palavras-chave: Inibidores de proteinases; Kunitz; Bowman-Birk; Cana-de-açúcar; Organismos não-alvo; *Scheloribates praeincisus*

Abstract

Plant proteinase inhibitors have been introduced in crop plants, acting in response to herbivorous and pathogens. Serine proteinase inhibitors like Bowman-Birk Inhibitor (BBI) and Kunitz have been used to improve the resistance on sugarcane varieties to the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*, the major pest to this crop. The assessment of impact of transgenic crops in

non-target organisms has been very important. The objective of this study was to evaluate direct effects of semi-purified and purified soybean proteinases inhibitors and GM sugarcane plants on the soil-dwelling mite *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida: Scheloribatidae). This mite is abundant in agricultural environments and because it participates in organic matter decomposition process it will be exposed to PIs when it would fed on GM plants debris. *S. praeincisus* eggs were individualized in experimental units, kept in $25 \pm 1^\circ\text{C}$, darkphase of 24 hours and 96% of moist. After larvae emergence, immatures were fed to sugarcane milled leaves added to PI semi-purified or purified (Kunitz e BBI). On the second stage of the experiment, immatures were fed to sugarcane GM varieties expressing Kunitz and BBI type of PIs and to its isolines. In both experiments, 15 replicates were used by treatment, the evaluation parameters were: *S. praeincisus* phase and total (larvae-adult) development time and survival. Kunitz and BBI did not effect *S. praeincisus* survival. On the other hand, Kunitz semi-purified and purified inhibitor ingestion diminished *S. praeincisus* immature stages duration. Enzymatic assays of tripsin activity in senescent leaves of sugarcane GM varieties show that there is a moderate reduction of tripsin activity. Ingestion of GM senescent leaves did not have an effect on oribatid mite immatures development time and survival compared to ingestion of its isolines senescent leaves. These results indicate that cultivation of these transgenic sugarcane plants is safe to the non-target species *S. praeincisus*.

Keywords: Proteinases inhibitors; Kunitz; Bowman-Birk; Sugarcane; Non-target organisms; *Scheloribates praeincisus*

2.1 Introdução

Os inibidores de proteinases fazem parte do grupo de proteínas expressas pelas plantas em resposta ao ataque de herbívoros e patógenos (RYAN, 1989; 1990; KONAREV, 1996; CHRISPEELS et al., 1998; GATEHOUSE; GATEHOUSE, 1998). Além de atuarem como defesa, os inibidores de proteinases de plantas estão envolvidos no controle de enzimas proteolíticas endógenas (RICHARDSON, 1977) e reserva de aminoácidos em sementes e órgãos de armazenamento (PUSZTAI, 1972; TAN-WILSON et al., 1985), podendo representar de 5 a 15% do total de proteínas (JONGSMA; BOLTER, 1997). São geralmente classificados de acordo com a classe de proteinases sobre as quais atuam (KOIWA et al., 1997) como serino-, cisteíno-, aspártico- ou metalo-proteinases, conforme o grupo químico responsável pela ação enzimática no sítio ativo da proteína.

Técnicas envolvendo plantas transgênicas trouxeram avanços científicos importantes, gerando plantas, por exemplo, mais resistentes a diferentes tipos de pragas. Devido ao incontestável sucesso dessa abordagem observou-se o aumento contínuo do número de produtos

agrícolas, já comercializados em vários países, que incorporam transgenes de *Bt* ou de inibidores de proteinases (PEFEROEN, 1997; SCHULER et al., 1998).

A inserção de genes de inibidores de proteinases em plantas através da transgenia têm vantagens práticas sobre a inserção de genes codificados por vias complexas, além de se tratar da transferência de um gene de defesa de uma espécie de planta para outra, o que, teoricamente, geraria menor rejeição perante a sociedade, em comparação com a transferência de um gene de uma bactéria para uma planta, como é o caso de plantas Bt. A expressão destes genes de inibidores de proteinases pode ser induzida através do próprio ferimento ou por promotor constitutivo, conferindo à planta resistência sobre o inseto praga (BOULTER, 1993).

Plantas transgênicas que expressam inibidores de serino- ou cisteíno-proteinases mostram aumento na resistência a certos insetos das Ordens Lepidoptera e Coleoptera, respectivamente, comprovando a função dessas proteínas nos mecanismos de defesa das plantas (RYAN, 1989; 1990; SCHULER et al., 1998, FALCO et al., 2001). Assim, a manipulação biotecnológica para tornar uma planta mais resistente ao ataque de insetos e/ou fitopatógenos poderia ser feita a partir de seu próprio repertório genético, ou mesmo de outras plantas (CHRISPEELS, 1998; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002).

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1974), praga mais importante da cana de açúcar no Brasil, é controlada com eficiência pelo parasitóide larval *Cotesia flavipes*, apesar de um dano residual de 10%. Uma alternativa que tem sido buscada para aumentar a resistência da cana a insetos é a expressão de inibidores de enzimas digestivas (FALCO; SILVA-FILHO, 2003). Lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com cana-de-açúcar geneticamente modificada expressando inibidores de proteinases (Kunitz e Bowman-Birk) não apresentaram elevação da taxa de mortalidade, contudo, foram observados aspectos anti-nutricionais como atraso no desenvolvimento e redução no peso das larvas (FALCO; SILVA-FILHO, 2003).

Uma das preocupações com o uso de plantas GM pela inserção de inibidores de proteinases é o impacto potencial sobre organismos não-alvo, visto que, apesar destes inibidores terem certa especificidade às proteinases digestivas das espécies alvo, ainda são pouco conhecidas as interações destes no trato digestivo dos outros organismos associados. Estudos de DONEGAN et al. (1997) demonstraram que, em condições de campo, inibidores de proteinase I permaneceram ativos em plantas de tabaco enterradas por pelo menos cinquenta e sete dias e que

a decomposição das mesmas afetou negativamente a densidade populacional de Colembola e positivamente as populações de nematóides. A primeira etapa na análise de risco de plantas geneticamente modificadas é a seleção das espécies não-alvo a serem avaliadas dentro dos diferentes grupos funcionais como inimigos naturais, polinizadores, decompositores etc. (COWGILL; ATKINSON, 2003).

Os ácaros Oribatida são o mais diverso e abundante grupo de artrópodes edáficos em sistemas naturais e agrícolas e são importantes na vida do solo por participarem na trituração e digestão da matéria orgânica provenientes de restos culturais (HARTENSTEIN, 1962). *Scheloribates praeincisus* é uma das espécies predominantes em culturas como soja (OLIVEIRA et al., 2001) e algodão (I. DELALIBERA JR., dados não publicados). Amostragens realizadas em plantações de cana-de-açúcar em Piracicaba, São Paulo, revelaram a presença de 5182 adultos de *S. praeincisus* por metro quadrado nos 5 cm superficiais do solo (E. CALDERAN, dados não publicados). Apesar dessa abundância e diversidade, os ácaros oribatídeos não têm sido freqüentemente utilizados nas análises de risco em culturas geneticamente modificadas (COWGILL; ATKINSON, 2003).

O primeiro estudo utilizando uma espécie de oribatídeo em análise de risco de plantas GM foi conduzido por YU e colaboradores (1997). Estes autores avaliaram o crescimento da população do Oribatida *Oppia nitens* mantida em folhas de algodão Bt e batata Bt, não encontrando efeitos no crescimento populacional desta espécie. Mais recentemente, estudos de toxicologia de algodão GM (Bollgard®) foram realizados com o ácaro de solo *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida), demonstrando a ausência de alterações no tempo de desenvolvimento e na sobrevivência destes organismos em relação aos expostos à isolinha (OLIVEIRA et al., 2007).

S. praeincisus pode estar exposto aos inibidores de proteinases expressos em cana-de-açúcar GM, devido à utilização do material vegetal em decomposição nas camadas mais superficiais do solo, seja pela queda de folhas senescentes, raízes mortas, ou pela incorporação dos restos culturais no solo após a colheita. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar o desenvolvimento de imaturos de *S. praeincisus* em folhas de cana-de-açúcar sem e com a adição de inibidores de proteinase e em folhas de cana-de-açúcar transgênica expressando inibidores de proteinases dos tipos Kunitz e Bowman-Birk e em suas isolinhas não transgênicas.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Criação de *Scheloribates praeincisus*

S. praeincisus foram mantidos em laboratório por 6 meses a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e escotofase de 24h no Laboratório de Acarologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. A criação foi realizada em arenas confeccionadas segundo OLIVEIRA et al. (2007) e acondicionadas em câmara (10 cm de altura, 20 cm de diâmetro) hermeticamente fechada contendo solução saturada de KH_2PO_4 a fim de manter umidade relativa de 96% (Figura 2.1). A dieta alimentar utilizada na manutenção dos ácaros foi composta por pólen de *Typha angustifolia*, fungo *Alternaria alternata* e macerado de folhas de variedades não-transgênicas de algodão e cana-de-açúcar em senescência. Os testes foram iniciados com ovos de *S. praeincisus* coletados da criação com pincéis umedecidos em água destilada sob microscópio estereoscópico e então transferidos para as unidades experimentais.

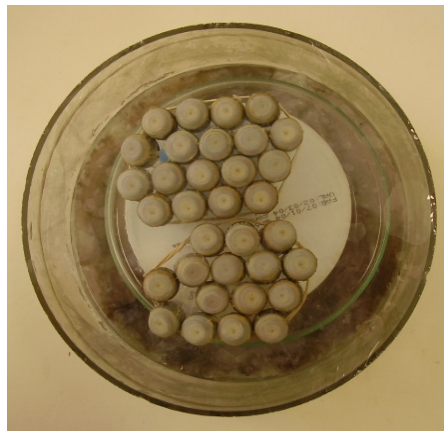


Figura 2.1 - Unidades experimentais para confinamento de imaturos de *Scheloribates praeincisus* acondicionadas em câmara com umidade relativa de 96% a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e escotofase de 24h

2.2.1.2 Testes com inibidores de proteinases de soja

Inibidores de proteinases semi-purificados foram extraídos de soja (variedade Conquista – Jan/2007) no Departamento de Genética da ESALQ, sendo também testados inibidores de proteinases purificados dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (Sigma Chemical CO. St Louis, MO, USA).

A metodologia de extração foi adaptada por Pompermayer et al. (2003). Cem gramas de sementes de soja foram homogeneizadas em um litro de solução salina (NaCl 0,15 M). A mistura resultante foi filtrada em gaze, sendo a parte líquida centrifugada a 3000 x g durante 20 minutos a 4°C para coleta do sobrenadante, medindo-se o volume, o qual foi ajustado a 70% com acetona gelada e posteriormente centrifugado a 6000 x g por 20 minutos a 4°C. O material decantado foi liofilizado para remoção completa da acetona e macerado, produzindo assim inibidores de proteinases semi-purificados (com atividade enzimática para tripsina e quimotripsina de 3,4% e 0,34%, respectivamente, do total da proteína retirada da semente).

Ovos de *S. praeincisus* foram confinados individualmente em unidades experimentais construídas em laboratório cortando-se base e tampa de microtubos de 0,5 mL (Eppendorf). A área remanescente do tubo (16 mm de altura) foi preenchida com uma mistura 9:1 de gesso (emplastro dental tipo III, Pasom Indústria e Comércio de Materiais Odontológicos Ltda., São Paulo, Brasil) e pó de carvão vegetal ativado (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil), mantendo uma concavidade (1,5 mm de altura) onde ácaro e substrato alimentar foram alocados. Estas unidades foram inseridas em tubos de vidro de 5 mL e dimensões 13 x 9 x 42 mm (diâmetros externo e interno e altura, respectivamente), sendo a tampa confeccionada com tela de nylon (silk-screen) a fim de permitir ventilação e confinamento do ácaro (OLIVEIRA et al., 2007) (Figura 2.2). O início das avaliações foi definido a partir da eclosão das larvas. Foram utilizados ovos com variação de até 15 dias quanto à data de oviposição, sendo as repetições dentro de cada experimento distribuídas ao longo do tempo.

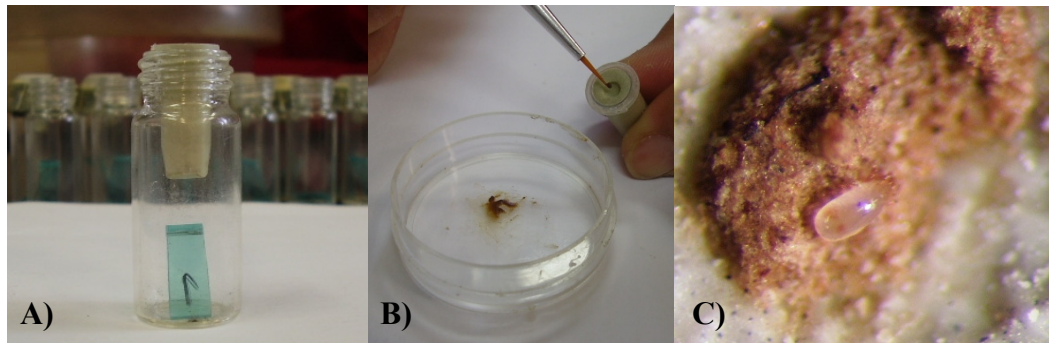


Figura 2.2 - A) Unidade experimental para contenção de imaturos de *Schelorbates praeincisus*; B) Folha de cana macerada; C) Tritoninfa quiescente de *S. praeincisus* sobre substrato alimentar

Testes preliminares foram realizados fornecendo-se como alimentação macerado de folhas de cana-de-açúcar verdes (não senescentes), mas devido a baixa ingestão destas pelos ácaros os resultados não foram apresentados. O experimento foi composto por oito tratamentos sendo os inibidores de proteinases incorporados às folhas senescentes maceradas de cana-de-açúcar da variedade SP 83-2847: 1) 0,05% de inibidores de proteinases semi-purificados (IPS) (0,5mg IPS/g de folha de cana-de-açúcar); 2) 0,5% de IPS (5mg IPS/g de folha) 3) $1,7 \times 10^{-3}\%$ + $1,7 \times 10^{-4}\%$ de inibidores de proteinases purificados (IP) dos tipos Kunitz e BBI, respectivamente (0,017 e 0,0017 mg IP/g de folha); 4) $1,7 \times 10^{-2}\%$ e $1,7 \times 10^{-3}\%$ de IP dos tipos Kunitz e BBI, respectivamente (0,17 e 0,017 mg IP/g de folha); 5) 0,5% de IP do tipo Kunitz (5mg IP/g de folha); 6) 0,5% de IP do tipo BBI (5mg IP/g de folha); 7) 0,5% de Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma Chemical CO. St Louis, MO, USA) (5mg BSA/g de folha) e 8) controle. As concentrações de inibidores de proteinases purificados nos tratamentos 3 e 4 equivalem às concentrações de inibidores de proteinases semi-purificados nos 1 e 2, respectivamente. A adição da proteína neutra BSA foi utilizada como controle positivo.

As porções diárias de alimento foram preparadas diluindo-se em água destilada a concentração de inibidores de proteinases referente a cada tratamento, sendo a solução utilizada para umedecer as folhas maceradas (1,2 mg de material macerado + 2 μ L de água destilada (com ou sem tratamento)/ácaro). Diariamente os ácaros foram transferidos para novas unidades experimentais limpas contendo alimento novo, para evitar que os ácaros se alimentassem de fungos crescidos no alimento e/ou na arena. Cada tratamento consistiu de 15 repetições compostas por um indivíduo imaturo de *S. praeincisus*.

As avaliações foram realizadas a cada 24 horas, acompanhando-se o desenvolvimento e sobrevivência dos ácaros, desde a eclosão da larva até a emergência do adulto.

2.2.1.3 Teste com cana-de-açúcar geneticamente modificada

O desenvolvimento de imaturos de *S. praeincisus* em folhas de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificadas para expressão de inibidores de proteinases do tipo Kunitz e do tipo Bowman-Birk, foi comparado com as respectivas variedades isogênicas não transgênicas (isolinhas), cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil. Sendo assim, foram utilizados quatro tratamentos: 1) variedade SP 80-1842 geneticamente transformada para expressão de IP tipo Kunitz; 2) isolinha da variedade SP 80-1842; 3) variedade SP 80-3280 geneticamente transformada para expressão de IP tipo BBI e 4) isolinha da variedade SP 80-3280.

As porções de alimento foram preparadas umedecendo-se o macerado de folha com água destilada (1,2 mg de folha + 2 µL de água destilada/ácaro). O número de repetições e a metodologia de avaliação adotados foram semelhantes aos utilizados nos testes com inibidores de proteinases semi- e purificados.

2.2.1.4 Ensaio enzimático para a atividade da tripsina em folhas de cana-de-açúcar

Foi elaborada uma solução estoque de 1 a 2 µg/100µL de tripsina (SIGMA) diluída em 0,001M HCl. Para o ensaio enzimático da atividade da tripsina, a solução foi composta por 200 µL de tampão (0,046M Tris, pH 8,1 com 0,0115M CaCl₂), 100 µL de 0,001M HCl e 60 µL do sobrenadante extraído das folhas de cana, ou de tampão (no caso da atividade da tripsina sem a presença de inibidores). Após 5 minutos de incubação foram acrescentados 2,4 mL de tampão e 0,3 mL de substrato (TAME).

O espectrofotômetro foi zerado com uma solução (branco) composta por todos os componentes do ensaio, exceto o extrato a ser avaliado. Os valores de absorbância do branco e das amostras referentes aos tratamentos com extratos de folhas foram obtidos em espectrofotômetro a 247 nm em intervalos de 1 minuto durante 4 minutos, sendo plotados em

gráfico de forma a obter o incremento da absorbância. A fim de obter a atividade total da tripsina foi realizado o mesmo ensaio sem a adição dos inibidores.

O extrato das plantas foi obtido adicionando 1,6 mL de água destilada a 160 mg de folha macerada equivalente a cada tratamento (variedades transgênicas – SP80-1842 e SP80-3280 – e respectivas isolinhas). As soluções foram centrifugadas a 16000 x g durante 20 minutos a 8°C, recolhendo-se o sobrenadante para leituras em espectrofotômetro.

2.2.1.5 Análises estatísticas

As médias de duração das fases de desenvolvimento (larva – adulto) de *S. praeincisus* foram transformadas em $\sqrt{x+0,5}$ e submetidas à análise de variância ANOVA, sendo comparadas através do teste de Tukey ao nível de significância de 5% pelo programa estatístico Sisvar DEX/UFLA (versão 4.6, 2003). Os experimentos com inibidores de proteinases e cana GM foram analisados separadamente em função de diferenças quanto a variedades de cana e épocas de realização dos mesmos.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Testes com inibidores de proteinases de soja

O incremento na concentração de inibidores de proteinases semi-purificados e purificados do tipo Kunitz adicionados à dieta de folhas de cana-de-açúcar resultou na diminuição da duração total das fases imaturas de *S. praeincisus* ($F_{7, 75} = 11,1$; $P < 0,0001$). Este decréscimo foi de 21,8; 18,8 e 16,1 dias nos tratamentos onde se adicionou 5 mg IPS/g de folha, 0,17 mg IP Kunitz/g de folha + 0,017 mg IP BBI/g de folha e 5 mg IP Kunitz/g de folha, respectivamente, quando comparados ao tempo de desenvolvimento de larva a adulto dos ácaros alimentados sem inibidores de proteinases ($54 \pm 3,2$ dias). No tratamento com a adição unicamente de BBI (5 mg IP/g de folha), o período de desenvolvimento de larva a adulto foi semelhante ao controle (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Tempo médio de desenvolvimento (dias) e sobrevivência (%) dos estágios imaturos de *Scheloribates praeincisus* alimentados com folhas de cana-de-açúcar (variedade SP83-2847) sem (controle) e com a adição de diferentes concentrações de Inibidores de Proteinase (Kunitz e Bowman-Birk (BBI)) semi-purificados extraídos de soja (IPS) e purificado e de albumina de soro bovino (BSA) a 25°C (n = 15)

Tratamento (mg/g de folha)	Duração média das fases em dias ± EP (% sobrevivência)				
	Larva	Protoninfa	Deutoninfa	Tritoninfa	Larva-Adulto
IPS (0,5)	10,2 ± 0,1 b (100)	8,0 ± 0,1 c (85,7)	7,7 ± 0,1 bc (100)	10,8 ± 0,2 a (83,3)	47,1 ± 0,1 bcde (71,4)
IPS (5)	6,8 ± 0,1 a (100)	4,2 ± 0,1 a (93,3)	4,8 ± 0,1 a (100)	7,3 ± 0,2 a (91,7)	32,2 ± 0,1 a (85,6)
BSA (5)	5,6 ± 0,1 a (100)	5,1 ± 0,1 ab (93,3)	5,8 ± 0,1 ab (100)	16,7 ± 0,4 abc (91,7)	40,7 ± 0,3 abcd (85,6)
Kunitz (0,017) + BBI (0,0017)	5,5 ± 0,1 a (100)	5,4 ± 0,1 ab (100)	6,1 ± 0,2 ab (85,7)	25,8 ± 0,9 c (72,7)	49,4 ± 1,1 cde (62,3)
Kunitz (0,17) + BBI (0,017)	6,1 ± 0,1 a (100)	4,8 ± 0,1 a (100)	5,3 ± 0,1 ab (92,3)	10,4 ± 0,1 a (100)	35,2 ± 0,1 ab (92,3)
Kunitz (5)	5,5 ± 0,1 a (100)	5,1 ± 0,0 ab (100)	5,9 ± 0,1 ab (100)	13,0 ± 0,1 abc (87)	37,9 ± 0,1 abc (87)
BBI (5)	14,7 ± 0,2 c (100)	8,8 ± 0,2 c (100)	10,9 ± 0,2 c (100)	12,3 ± 0,3 ab (100)	59,1 ± 0,3 e (100)
Controle	7,7 ± 0,1 ab (93,3)	7,4 ± 0,1 bc (100)	6,3 ± 0,1 ab (95)	22,5 ± 0,3 bc (100)	54,0 ± 0,3 de (88,6)

Valores com letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Não houve diferenças significativas na duração média das fases quiescentes de larva ($F_{7, 122} = 18,4$; $P < 0,0001$), protoninfa ($F_{7, 111} = 7,7$; $P < 0,0001$), deutoninfa ($F_{7, 99} = 6,6$; $P < 0,0001$) e tritoninfa ($F_{7, 78} = 6,8$; $P < 0,0001$) de *S. praeincisus* submetidos aos tratamentos sem e com adição de inibidores de proteinases (dados não apresentados).

As fases mais longas no desenvolvimento de *S. praeincisus* são larva e tritoninfa, correspondendo, no tratamento controle, por exemplo, a 14,3% e 41,7%, respectivamente, de todo o período larva-adulto (Tabela 2.1).

A adição de inibidores de proteinases não alterou a sobrevivência de *S. praeincisus* demonstrado pelas altas taxas de sobrevivência e pela variabilidade destas entre os tratamentos nos diferentes estágios do ciclo de vida dos ácaros. As menores taxas de sobrevivência foram observadas na fase de tritoninfa, entretanto, estes valores ficaram acima de 72%. Os ácaros alimentados com BBI, apesar de necessitarem de um período maior para seu desenvolvimento, apresentaram sobrevivência de 100% em todas as fases imaturas (Tabela 2.1).

2.2.2.2 Teste com cana-de-açúcar geneticamente modificada

Não foram observadas diferenças quanto ao período de desenvolvimento de nenhuma das fases imaturas (larva - $F_{3, 49} = 1,1$; $P = 0,36$; protoninfa - $F_{3, 46} = 0,75$; $P = 0,53$; deutoninfa - $F_{3, 45} = 0,17$; $P = 0,92$ e tritoninfa - $F_{3, 43} = 1,53$; $P = 0,22$) de *S. praeincisus* alimentados com folhas senescentes maceradas de cana-de-açúcar geneticamente modificada para expressão de inibidores de proteinases (IP) de soja dos tipos Kunitz e BBI, em relação aos alimentados com as respectivas isolinhas. Embora não haja diferença estatística, o ciclo de vida de larva-adulto ($F_{3, 44} = 0,99$; $P = 0,41$) na variedade transgênica que expressa IP dos tipos Kunitz e BBI foi 3,9 e 3 dias mais curto do que o ciclo nas isolinhas. Os imaturos de *S. praeincisus* apresentaram taxa de sobrevivência elevada em todas as fases (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Tempo médio de desenvolvimento (dias) e sobrevivência (%) dos estágios imaturos de *Scheloribates praeincisus* alimentados com folhas senescentes maceradas de cana-de-açúcar transgênicas, expressando IPs de soja dos tipos Kunitz (variedade SP80-1842) e BBI (variedade SP80-3280), e respectivas isolinhas a 25°C ($\eta = 15$)

Tratamento	Duração média das fases em dias \pm EP (% sobrevivência)				
	Larva	Protoninfa	Deutoninfa	Tritoninfa	Larva-adulto
SP80-1842 GM (Kunitz)	7,6 \pm 0,2 a (100)	5,6 \pm 0,1 a (92,3)	8,4 \pm 0,2 a (100)	11,6 \pm 0,2 a (100)	41,7 \pm 0,3 a (92,3)
SP80-1842 Iso-linha	8,1 \pm 0,2 a (85,7)	7,0 \pm 0,1 a (100)	8,0 \pm 0,1 a (100)	13,1 \pm 0,2 a (100)	45,6 \pm 0,2 a (85,7)
SP80-3280 GM (BBI)	7,4 \pm 0,1 a (94,1)	6,5 \pm 0,2 a (100)	9,4 \pm 0,2 a (100)	14,3 \pm 0,2 a (93,3)	45,6 \pm 0,2 a (87,8)
SP80-3280 Iso-linha	11,0 \pm 0,2 a (84,6)	7,1 \pm 0,2 a (100)	8,1 \pm 0,2 a (100)	17,3 \pm 0,2 a (100)	48,6 \pm 0,2 a (84,6)

Valores com letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

2.2.2.3 Ensaio enzimático para a atividade da tripsina em folhas de cana-de-açúcar

A redução da atividade enzimática da tripsina pelos inibidores presentes nas folhas senescentes das variedades transgênicas de cana e isolinhas utilizadas na alimentação de *S. praeincisus* foi detectada pela diminuição do ângulo da equação da reta de atividade da tripsina na presença de inibidores de proteinase, quando comparada com aquela equação da atividade da tripsina sem a presença de inibidores. Um menor ângulo significa perda de atividade da tripsina, e conseqüentemente, maior presença de inibidores de proteinases no extrato foliar sendo avaliado (Figura 2.3). Embora tenha sido observada atividade residual da tripsina no extrato das folhas de cana em senescência (Tabela 2.3), não foram detectadas diferenças significativas na atividade enzimática entre folhas das variedades transgênicas e das suas isolinhas.

Tabela 2.3 - Ensaio enzimático para a atividade da tripsina em folha de cana-de-açúcar geneticamente modificada expressando inibidores de proteinases de soja dos tipos Kunitz (variedade SP80-1842) e BBI (variedade SP80-3280) e respectivas isolinhas, e percentual de atividade residual da tripsina nos tratamentos, em relação à atividade total da tripsina

Variedades de cana	Ângulo da equação da reta de atividade da tripsina (Média ± EP)	% de atividade residual da tripsina
SP80-1842 GM (Kunitz)	0,040 ± 0,002	71,4
Iso SP80-1842	0,042 ± 0,003	75,0
SP80-3280 GM (BBI)	0,045 ± 0,005	80,4
Iso SP80-3280	0,042 ± 0,002	75,0
Controle (atividade total)	0,056 ± 0,003	100,0

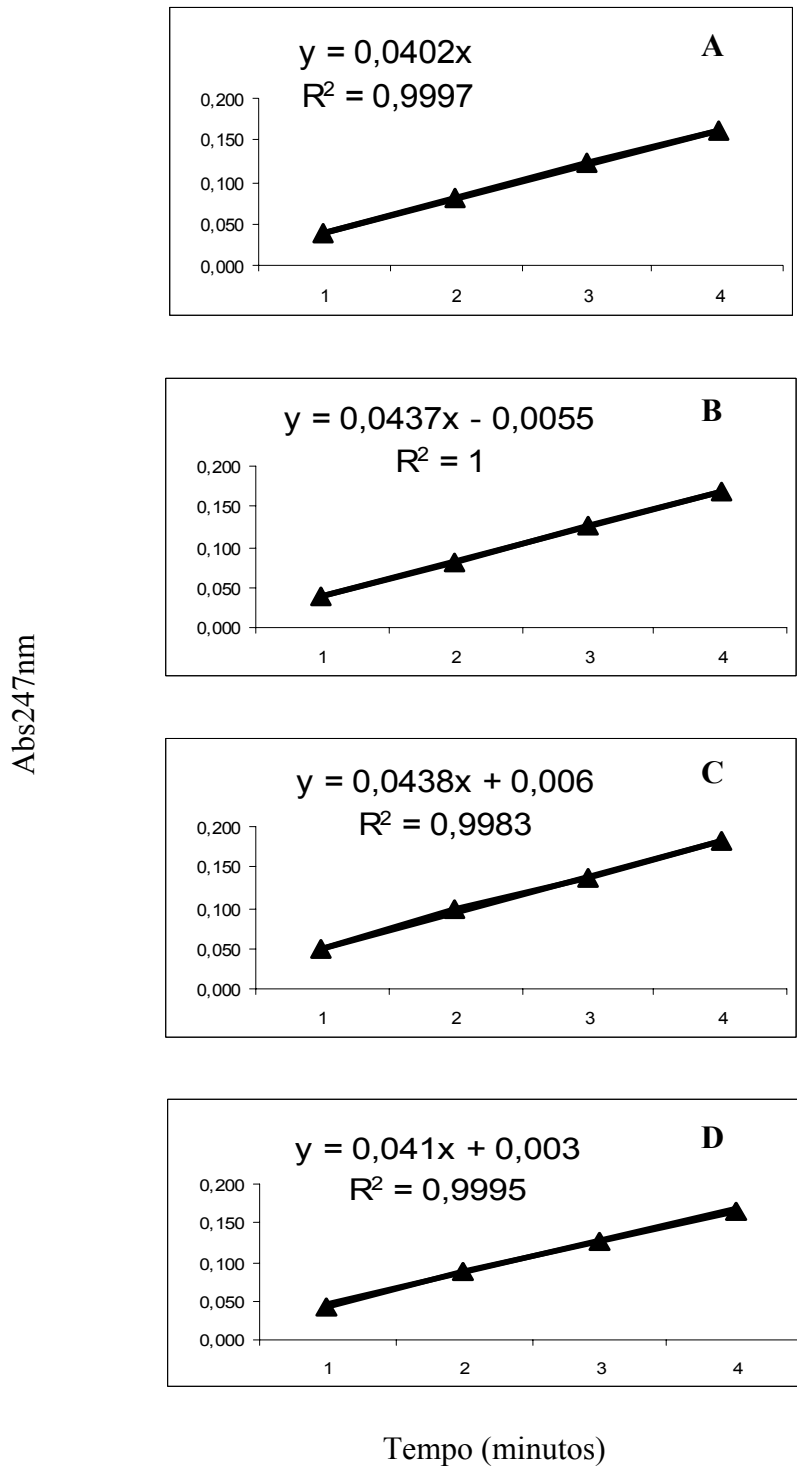


Figura 2.3 - Atividade enzimática da tripsina em folhas senescentes e de variedades transgênicas de cana-de-açúcar expressando inibidores de proteinases e respectivas isolinhas. A) variedade SP80-1842 (IP Kunitz), B) isolinha SP80-1842, C) variedade SP80-3280 (IP BBI) e D) isolinha SP80-3280

2.2.3 Discussão

Os resultados indicam que *S. praeincisus* provavelmente não utiliza proteinases dos tipos tripsina e quimotripsina, já que os inibidores das respectivas proteinases (Kunitz e BBI) nas doses utilizadas não retardaram o desenvolvimento, nem reduziram a sobrevivência dos ácaros, sugerindo que plantas de cana-de-açúcar GM para expressão destes inibidores de proteinases, nas concentrações testadas, não oferecem riscos a esta espécie.

Poucos estudos tentaram identificar as enzimas presentes no trato digestivo de oribatídeos. Dentre as enzimas conhecidas estão as celulases, glucanases e chitinases (para digestão da parede celular de fungos), trealases (para digestão do conteúdo celular de fungos) e carboidrases (LUXTON, 1972; SIEPEL; RUITER-DIJKMAN, 1993). Uma das limitações destes estudos é a dificuldade de isolar as enzimas produzidas pelo ácaro daquelas enzimas obtidas no ambiente junto com o alimento, por exemplo, de fungos no solo ou mesmo através de simbioses (SCHNEIDER et al., 2004).

A eficácia de inibidores de proteinase da soja (Kunitz e BBI) foi confirmada sobre o organismo alvo *Diatraea saccharalis*, principal praga da cana-de-açúcar. Experimentos em laboratório revelaram que estes inibidores semi-purificados extraídos da soja afetam negativamente o crescimento, desenvolvimento e potencial reprodutivo deste lepidóptero (POMPERMAYER et al. 2001; 2003).

A ingestão de concentrações $\geq 0,17$ mg de IP Kunitz /g de folha adicionadas a folhas maceradas de cana reduziu o tempo de desenvolvimento de *S. praeincisus*. Essa aceleração no ciclo de vida (larva – adulto) pode ser resultante do aproveitamento destes inibidores como fonte protéica, em função da baixa qualidade nutricional da dieta oferecida aos ácaros. Isto é indicado pelo fato de que o desenvolvimento dos oribatídeos na presença de BSA não diferiu da dieta com Kunitz. No entanto, os inibidores do tipo BBI, mesmo na concentração de 5mg de IP BBI/g de folha, não favoreceram qualitativamente o substrato alimentar utilizado no experimento, onde os ácaros mantiveram o período de desenvolvimento semelhante àqueles cuja alimentação foi restrita a folhas de cana. Quando os ácaros foram alimentados com folhas de cana GM que expressam inibidores de proteinases do tipo Kunitz, observou-se a redução de apenas 3,9 dias no desenvolvimento da fase imatura, comparada com o desenvolvimento na isolinha. Isto está de acordo com o fato da atividade dos inibidores nas folhas transgênicas ser somente 3,6% maior do

que a atividade de inibição nas folhas da isolinha. O efeito benéfico de maiores concentrações de Kunitz em plantas transgênicas, provavelmente, tenha pouca relevância em campo, já que nestas condições os ácaros oribatídeos têm livre escolha pelo alimento e devem utilizar uma dieta variada, incluindo fungos e outros microrganismos (JORDAN, 2001). As pequenas diferenças entre os tratamentos onde foram utilizados inibidores de proteinases semi- e purificados confirmam a viabilidade do uso de inibidores semi-purificados para o desenvolvimento e execução de estudos futuros, já que estes têm um custo muito reduzido comparado ao custo dos inibidores purificados.

É possível inferir que o consumo de folhas de cana-de-açúcar GM expressando inibidores de proteinases é seguro para *S. praeincisus*, pois esta espécie deve alimentar-se predominantemente de folhas em estágios avançados de decomposição cuja concentração destes inibidores é bastante reduzida em função do processo de senescência, como foi demonstrado neste trabalho através dos ensaios de atividade enzimática nas folhas senescentes de cana GM.

A exposição de *S. praeincisus* a altas concentrações de inibidores pode ocorrer caso estes consumam folhas frescas de outras plantas modificadas geneticamente pela inserção dos mesmos genes que codificam estes inibidores de proteinases. OLIVEIRA et al. (2007) demonstraram que esta espécie de oribatídeo é capaz de se alimentar de folhas verdes de algodão. Folhas de cana apresentaram-se nutricionalmente inferior para o desenvolvimento de *S. praeincisus* em relação a folhas de algodão (OLIVEIRA et al., 2007), pois a duração dos estádios imaturos foi maior na primeira cultura do que na segunda. Estas diferenças podem estar relacionadas a aspectos físicos e/ou químicos das folhas. Mesmo que estes ácaros consumam folhas frescas de plantas GM, não são esperados impactos significativos nas populações, já que os estudos com inibidores de proteinases purificados não revelaram efeitos negativos na biologia de *S. praeincisus*.

2.3 Conclusões

Os inibidores de proteinases dos tipos Kunitz e Bowman-Birk interferem positivamente no desenvolvimento de *S. praeincisus*. Este Oribatida não utiliza proteinases desses tipos para sua digestão, sendo o incremento no seu desenvolvimento explicado pelo uso dos inibidores adicionados à dieta como uma fonte protéica. Além disso, folhas em senescência de cana-de-

açúcar geneticamente modificada para a expressão de inibidores de proteinases, possivelmente utilizadas como alimento por esses ácaros, não apresentam riscos ao seu desenvolvimento.

Referências

BOULTER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. **Biochemistry**, Washington, v. 34, p. 1453-1466, 1993.

CARLINI, C.R.O.; GROSSI-DE-SA, M.F. Plant proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, Oxford, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CHRISPEELS, M.J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; HIGGINS, T.J.V. Genetic engineering with α -amylase inhibitor seed resistant to bruchids. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 257-263, 1998.

COWGILL, S.E.; ATKINSON, H.J. A sequential approach to risk assessment of transgenic plants expressing protease inhibitors: effects on nontarget herbivorous insects. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 12, p. 439-449, 2003.

DONEGAN, K.K.; SEIDLER, R.J.; FIELAND, V.J.; SCHALLER, D.L.; PALM, C.J.; GANIO, L.M.; CARDWELL, D.M.; STEINBERGER, Y. Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 767-777, 1997.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 761-766, 2003.

FALCO, M.C.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 113-122, 2001.

GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, London, v. 52, p. 165-175, 1998.

HARTENSTEIN, R. Soil Oribatei. I. Feeding specificity among forest soil Oribatei (Acarina). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 55, p. 202-206, 1962.

JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 43, p. 885-95, 1997.

JORDAN, M.E. **Population dynamics of oribatida mites (Acari: Oribatida) on horse pastures of North Central Florida**. 2001. 106 p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine) – University of Florida, Gainesville, 2001.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 2, p. 379-84, 1997.

KONAREV, A.V. Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitor and host-parasite co-evolution. **Euphytica**, Wageningen, v. 92, p. 89-94, 1996.

LUXTON, M. Studies on the oribatid mites of a Danish beech wood soil. **Pedobiologia**, Jena, v. 12, p. 434-463, 1972.

OLIVEIRA, A.R.; CASTRO, T.R.; CAPALBO, D.M.F.; DELALIBERA JR., I. Toxicological evaluation of genetically modified cotton (Bollgard®) and Dipel® WP on the non-target soil mite *Scheloribates praeincisus* (Acari: Oribatida). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 191-201, 2007.

OLIVEIRA, A.R.; MORAES, G.J. de; DEMÉTRIO, C.G.B.; DE NARDO, E.A.B. **Efeito do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis* sobre Oribatida edáficos (Arachnida: Acari) em um campo de soja**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 32 p. (Boletim de Pesquisa, 13).

PEFEROEN, M. Progress and perspectives for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 15, p. 173-177, 1997.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 109, p.217-224, 2003.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, p. 79-85, 2001.

PUSZTAI, A. Metabolismo of trypsin-inhibitory proteins in the germination seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Planta**, Berlin, v. 107, p. 121-129, 1972.

RICHARDSON, M. The proteinase inhibitor of plants and microorganisms. **Phytochemistry**, Oxford, v. 16, p. 159-169, 1977.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. **Bioessays**, Cambridge, v. 10, p. 20-24, 1989.

_____. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

SCHNEIDER, K.; MIGGE, S.; NORTON, R.A.; SCHEU, S.; LANGEL, R.; REINEKING, A.; MARAUN, M. Trophic niche differentiation in oribatid mites (Oribatida, Acari): evidence from stable isotope ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1769-1774, 2004.

SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 16, p. 168-175, 1998.

SIEPEL, H.; RUITER-DIJKMAN, E.M. Feeding guilds of oribatid mites based on their carbohydrase activities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1491-1497, 1993.

TAN-WILSON, A.L.; HARTL, P.M.; DELFEL, N.E.; WILSON, K.A. Differential expression of Kunitz and Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor in plant and callus tissues. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 78, p. 310-314, 1985.

YU, L.; BERRY, R.E. CROFT, B.A. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatida). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p. 113-118, 1997.

3 CRESCIMENTO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae* (MESTCH.) SOROKIN (ASCOMYCETES: HYPOCREALES - FASE ANAMÓRFICA) EM MEIOS DE CULTURA COM INIBIDORES DE PROTEINASES

Resumo

Inibidores de proteinases dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI) foram empregados na construção de plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificadas (GM) visando o controle da principal praga desta cultura, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). A sustentabilidade de plantas GM resistentes a insetos na agricultura é determinada entre outras características, pela sua segurança aos organismos não-alvo e pela estabilidade desta resistência aos organismos alvo. Dentre os organismos não-alvo associados à cultura da cana-de-açúcar destaca-se o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin, que poderá estar exposto ao produto do transgene indiretamente, ao utilizar *D. saccharalis* como hospedeiro, e diretamente, pela co-existência no solo com os restos culturais das plantas GM. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de inibidores de proteinases semi- e purificados dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI) no crescimento e esporulação de *M. anisopliae* em meios de cultura. Inibidores semi-purificados nas concentrações 0,05% e 0,5% (p/v) e inibidores purificados Kunitz e BBI 0,05% (p/v) foram adicionados no meio de cultura completo (MC) e no meio batata dextrose ágar (BDA). Nas placas controles não foram adicionados inibidores. Placas de Petri contendo 25 mL dos meios de cultura testados foram inoculadas com *M. anisopliae* em três pontos equidistantes, com cinco repetições para cada bioensaio. Os diâmetros das colônias foram mensurados sete e dez dias após a inoculação e após esta última avaliação as colônias foram retiradas para a contagem dos conídios produzidos. A adição de 0,5% (p/v) de inibidores de proteinases semi-purificados e 0,05% (p/v) de inibidores purificados do tipo Kunitz nos meios de cultura (MC e BDA) resultaram em maior crescimento vegetativo e maior produção de conídios de *M. anisopliae*. Os inibidores purificados do tipo BBI não alteraram a esporulação do fungo. A esporulação de *M. anisopliae* foi maior no MC quando comparado ao BDA em todos os tratamentos. Estes resultados indicam que a atividade proteolítica da tripsina não foi afetada em *M. anisopliae* e pode-se inferir que não são esperados impactos diretos de plantas geneticamente modificadas para superexpressão de inibidores de proteinases dos tipos Kunitz e BBI na sobrevivência de *M. anisopliae*.

Palavras-chave: Inibidores de proteinases; Kunitz; Bowman-Birk; Cana-de-açúcar; *Diatraea saccharalis*; Organismos não-alvo; *Metarhizium anisopliae*

Abstract

Kunitz and Bowman-Birk (BBI) type proteinase inhibitors were employed in the transformation of genetically modified (GM) sugarcane plants aiming to prevent damage of sugarcane major pest, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). The sustainability of GM plants resistant to insects is determined, among other characteristics, by its resistance stability to target species and

by its safety to non-target organisms. Among non-target organisms associated to sugarcane is the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin. This fungus could be undirectly exposed to the product of the transgene when using *D. saccharalis* as a host, and directly exposed to the GM plant crop residue in the soil. This objective of this study was to evaluate the effects on semi-purified and purified Kunitz and BBI type proteinase inhibitors on growth and sporulation of *M. anisopliae* in culture media. Semi-purified inhibitors 0.05% and 0.5% (w/v) and Kunitz and PPB purified inhibitors 0.05% (w/v) were added to complete culture media (CM) and to potato dextrose agar (PDA). On control plates, inhibitors were not added. Petri dishes containing 25 mL of culture media were inoculated with *M. anisopliae* in three equidistant points, with five replicates to each bioassay. The colony diameter was measured seven and ten days after inoculation and after this last evaluation the colonies were collected to count the produced conidia. The addition of 0.5 % (w/v) of semi-purified proteinase inhibitors and 0.05% (w/v) of Kunitz type purified inhibitors on culture media (CM and PDA), resulted in bigger vegetative growth and production of conidia. BBI type purified inhibitors did not change the fungus sporulation. Sporulation was greater on MC than on PDA in all treatments. These results indicate that the *M. anisopliae* trypsin proteolytic activity was not affected and it is possible to suppose that a direct impact of genetically modified plants that overexpress Kunitz and BBI types of proteinase inhibitors is not expected on *M. anisopliae* survival.

Keywords: Proteases inhibitors; Kunitz; Bowman-Birk; Sugarcane; *Diatraea saccharalis*; Non-target organisms; *Metarhizium anisopliae*

3.1 Introdução

A manipulação de genes codificando inibidores de proteinases (IPs) derivados de plantas para tornar culturas de importância econômica mais resistentes ao ataque de insetos tem sido considerada como uma alternativa ao uso de endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (HILDER et al., 1987), visto que os inibidores de proteinases são parte do sistema natural de defesa de plantas contra a herbivoria (FALCO; SILVA-FILHO, 2003).

Plantas de cana-de-açúcar foram transformadas geneticamente para expressão de inibidores de proteinases de soja dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI), visando resistência à broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr.), principal praga desta cultura no Brasil (FALCO; SILVA-FILHO, 2003). Para utilização de variedades geneticamente modificadas é necessário avaliar a segurança destas a organismos não-alvo como polinizadores, agentes naturais de controle biológico e microorganismos de solo. A análise de risco deve ser feita caso a caso, de acordo com os tipos de genes inseridos.

De modo geral, o acúmulo de proteínas transgênicas no solo é influenciado pela quantidade contida nos tecidos da planta, pela resistência da proteína à degradação e pelas condições físico-químicas do solo, permitindo que, durante a decomposição da matéria vegetal, algumas destas proteínas liguem-se à superfície de partículas, e desta forma, afetem o desenvolvimento de microorganismos (LIU et al., 2005).

Alguns inibidores de proteinase extraídos de plantas vêm sendo reportados como uma nova classe de fungicidas por influenciarem a síntese de quitina *in vitro* (ADAMS et al., 1993), inibirem a germinação de esporos e alongação de tubos germinativos (LORITO et al., 1994), produzirem alterações morfológicas em hifas (CHILOSI et al., 2000) e assumirem caráter antinutricional devido ao decréscimo da atividade das proteases desses microorganismos (MOLOSOV et al., 1976). Apesar dos estudos com inibidores estarem restritos a fungos fitopatogênicos, Chilosi et al. (2000) afirmam que os inibidores de proteinases não devem atuar somente sobre este grupo, sugerindo que há baixa especificidade entre fungos e tais proteínas.

Metarhizium anisopliae (Mestch.) Sorokin é um dos fungos mais utilizados para o controle de insetos no mundo, principalmente para pragas das ordens Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Diptera e Isoptera. *M. anisopliae* apresenta parte do seu ciclo de vida no solo, onde permanece protegido de condições ambientais adversas (BOUCIAS; PENDLAND, 1998), sendo o solo um reservatório natural também de outros fungos que infectam insetos (LANZA et al., 2004). Este fungo é utilizado no nordeste do Brasil desde 1970 para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (ALVES et al., 1984), além de ser aplicado no controle de outras pragas dessa cultura como a *D. saccharalis*. Outras formas de interação de inibidores de proteinases com este patógeno pode ocorrer durante a produção do fungo em laboratório. *M. anisopliae* é produzido no Brasil e no mundo, quase que exclusivamente, utilizando-se arroz autoclavado como substrato. O arroz, assim como sementes de outras plantas, apresenta inibidores de proteinases como função de defesa constitutiva, que é uma característica destes órgãos de reserva. Entretanto, ainda são desconhecidos os efeitos destes inibidores no crescimento de *M. anisopliae* e outros entomopatógenos. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos diretos de inibidores de proteinases de soja (semi-purificados e purificados dos tipos Kunitz e Bowman-Birk) no crescimento vegetativo e esporulação de *M. anisopliae* (Ascomycetes: Hypocreales - fase anamórfica).

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ/USP, utilizando-se a cepa ESALQ 1037 do fungo *M. anisopliae*. Os efeitos diretos de inibidores de proteinases (IPs) foram medidos no crescimento e na esporulação deste entomopatógeno em diferentes meios de cultura. Foram utilizados como meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Meio Completo (MC) (ALVES et al., 1998), ambos acrescidos com 0,5 g de antibiótico (Streptomicina) por litro, com o objetivo de observar variações no desenvolvimento do fungo em função da interação entre os inibidores e a disponibilidade de nutrientes (meio de cultura menos rico e mais rico nutricionalmente, respectivamente).

Os meios de cultura foram compostos por:

- Meio Completo: 0,36 g de Fosfato de Potássio; 1,05 g de Fosfato de Sódio; 0,6 g de Sulfato de Magnésio; 1 g de Cloreto de Potássio; 10g de Glucose; 1,58 g de Nitrato de Sódio; 5 g de extrato de levedura; 20 g de Ágar e 1000 mL de água destilada;

- BDA: 15 g de Ágar; 15 g de Glucose; 200 g de batata e 1000 mL de água destilada.

O experimento foi realizado em duas etapas:

A – Inibidores de proteinases (IPs) semi-purificados em diferentes concentrações

Neste estudo foram utilizados seis tratamentos com cinco repetições cada, sendo 1) BDA + 0,05% de inibidores de proteinases (IPs) semipurificados (p/v); 2) BDA + 0,5% de IPs semi-purificado; 3) BDA (controle); 4) MC + 0,05% de IPs semi-purificado; 5) MC + 0,5% de IPs semi-purificado e 6) MC (controle). Os inibidores presentes em sementes de soja foram extraídos no Departamento de Genética, Esalq/USP, segundo metodologia de Pompermayer et al. (2003) (descrita no capítulo 2). Os inibidores de proteinases semi-purificados apresentam atividade estimada de inibição enzimática de tripsina e de quimotripsina de 10% e 1%, respectivamente, referente ao total da proteína retirada da semente de soja.

B – Inibidores de proteinases (IPs) purificados dos tipos Kunitz e BBI

Foram utilizados seis tratamentos com cinco repetições cada, sendo 1) BDA + 0,05% de Kunitz (Sigma Chemical CO. St Louis, MO, USA) (p/v); 2) BDA + 0,05% de BBI (Sigma Chemical CO. St Louis, MO, USA) (p/v); 3) BDA (controle); 4) MC + 0,05% de Kunitz; 5) MC + 0,05% de BBI e 6) MC (controle).

Em ambas as etapas, os inibidores de proteinases foram adicionados aos meios de cultura à temperatura de 45°C, sendo distribuídas alíquotas de 25 mL de cada meio em placas de Petri de vidro (100 x 15 mm). Após solidificação do meio, realizaram-se 3 inoculações pontuais eqüidistantes de *M. anisopliae*. As placas foram mantidas em B.O.D. à temperatura de 26 ± 1°C e fotofase de 12h.

Os parâmetros mensurados foram tamanho das colônias (crescimento vegetativo radial) e número de conídios (esporulação). O crescimento vegetativo foi obtido através da determinação do diâmetro das colônias 7 e 10 dias após a inoculação. Para a realização da contagem de conídios as colônias foram retiradas por completo rente ao meio de cultura no 10º dia e transferidas para tubos de vidro (85 x 25 mm) contendo 10 mL de água destilada com 0,05% do espalhante adesivo Tween 80 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil). O número de conídios em suspensão foi determinado através de contagens realizadas em câmara de Neubauer.

Cada etapa do experimento foi repetida duas vezes, não apresentando diferenças significativas entre os resultados. Sendo assim, as médias obtidas na segunda repetição do experimento foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% pelo programa estatístico Sisvar DEX/UFLA (versão 4.6, 2003).

3.2.2 Resultados

O crescimento radial de *M. anisopliae* foi maior na presença da concentração mais elevada de inibidores de proteinases (IPs) semi-purificados (0,5% p/v), independente do meio de cultura (Tabela 3.1). Foi observado maior crescimento do fungo no meio completo em relação ao BDA ($F_{2, 182} = 0,15$; $P = 0,86$), considerando-se o controle e o tratamento com 0,05% (p/v) de IP semi-purificados. O acréscimo de 0,5% de inibidores semi-purificados promoveu maior

crescimento vegetativo do fungo em BDA do que em MC, aumentando o diâmetro das colônias de *M. anisopliae* em 9,4% no meio MC ($F = 22,48$; $P < 0,0001$; $GL = 2$) e em 15,0% em BDA ($F_{2, 39} = 58,39$; $P < 0,0001$), quando comparado ao controle sem inibidores de proteinases semi-purificados após 10 dias da inoculação (Figura 3.1).

Foi constatado maior produção de conídios nos meios de cultura com maior concentração de IPs semi-purificados (0,5%), atingindo em média $23,39 \times 10^8$ e $13,75 \times 10^8$ conídios/colônia em MC ($F_{2, 33} = 13,39$; $P = 0,0001$) e BDA ($F_{2, 33} = 34,43$; $P < 0,0001$), respectivamente (Tabela 3.1). A adição de 0,5% de inibidores semi-purificados aumentou em 55% a quantidade de conídios produzidos por *M. anisopliae* em meio MC e em 119% no meio BDA. A esporulação do fungo foi maior no meio mais rico, MC, em relação ao meio BDA ($F_{2, 66} = 1,56$; $P = 0,22$).

Tabela 3.1 - Crescimento vegetativo (cm), 7 e 10 dias após a inoculação, e esporulação (conídios/colônia), após 10 dias, de *Metarhizium anisopliae* em meio completo (MC) e BDA sem (controle) e com adição de 0,05% e 0,5% (p/v) de inibidores de proteinases semi-purificados de soja, contendo os tipos Kunitz e Bowman-Birk, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$

Tratamento	Diâmetro (cm) \pm EP				Conídios/colônia ($\times 10^8$) \pm EP	
	MC		BDA		MC	BDA
	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias		
Controle	2,47 \pm 0,02 a	3,74 \pm 0,03 a	2,38 \pm 0,02 a	3,61 \pm 0,00 a	15,08 \pm 1,1 a	6,28 \pm 0,4 a
0,05% IP	2,51 \pm 0,03 a	3,80 \pm 0,03 a	2,45 \pm 0,03 a	3,67 \pm 0,01 a	18,77 \pm 0,6 a	6,20 \pm 0,5 a
0,5% IP	2,74 \pm 0,03 b	4,09 \pm 0,05 b	2,89 \pm 0,04 b	4,15 \pm 0,04 b	23,39 \pm 1,5 b	13,75 \pm 1,1 b

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 3.2 - Crescimento vegetativo (cm), 7 e 10 dias após a inoculação, e esporulação (conídios/colônia), após 10 dias, de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura completo (MC) e BDA sem (controle) e com a adição de 0,05% (p/v) de inibidores de proteinases purificados dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI) a 26°C

Tratamento	Diâmetro (cm) \pm EP				Conídios/colônia ($\times 10^8$) \pm EP	
	MC		BDA		MC	BDA
	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias		
Controle	2,13 \pm 0,03 b	3,68 \pm 0,03 b	1,96 \pm 0,10 a	3,53 \pm 0,06 a	14,93 \pm 2,4 a	5,66 \pm 0,4 a
Kunitz	2,12 \pm 0,02 b	3,69 \pm 0,03 b	2,16 \pm 0,03 b	3,59 \pm 0,09 a	21,35 \pm 1,3 b	7,65 \pm 0,8 a
BBI	1,81 \pm 0,10 a	3,40 \pm 0,07 a	2,03 \pm 0,03 ab	3,53 \pm 0,02 a	17,05 \pm 1,2 ab	6,38 \pm 0,3 a

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

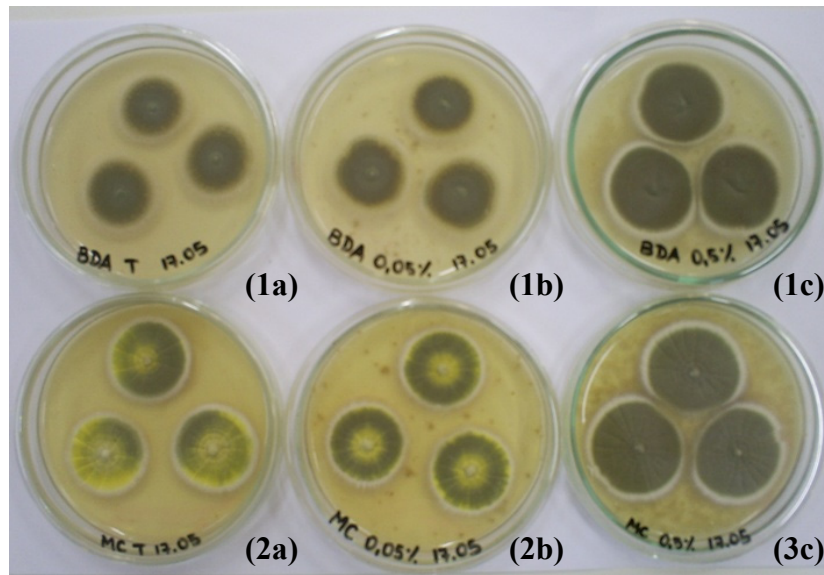


Figura 3.1 - *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura acrescidos de inibidores de proteinases semi-purificados contendo os tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI) 10 dias após a inoculação a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. BDA sem (1a) e com adição de inibidores semi-purificados a 0,05% (1b) e 0,5% (1c) (p/v) e Meio completo (MC) sem (2a) e com adição de inibidores semi-purificados a 0,05% (2b) e 0,5% (2c) (p/v)

A adição de inibidores de quimotripsina purificados (BBI) afetou negativamente o crescimento vegetativo do fungo *M. anisopliae* em meio completo (MC) quando comparado aos demais tratamentos (controle e IP do tipo Kunitz) após 7 ($F_{2,50} = 8,46$; $P = 0,0007$) e 10 dias da inoculação ($F_{2,50} = 11,97$; $P = 0,0001$) (Tabela 3.2). No entanto, o crescimento do fungo no meio BDA não foi alterado pela adição destes inibidores em ambos os intervalos, 7 ($F_{2,51} = 3,00$; $P = 0,06$) e 10 dias ($F_{2,51} = 0,31$; $P = 0,73$).

A presença de IPs do tipo Kunitz em MC não resultou em alteração no crescimento do fungo em relação ao controle, exceto pela tendência de aumento no diâmetro das colônias observada em BDA no 7º dia de desenvolvimento do fungo. Foi constatado maior crescimento vegetativo de *M. anisopliae* no meio mais rico (MC), quando comparado ao crescimento no meio BDA, na ausência de inibidores de proteinases purificados ($F_{2,202} = 0,52$; $P = 0,60$).

A adição de inibidor de tripsina (Kunitz) favoreceu a esporulação do fungo (Figuras 3.2 e 3.3), resultando em aumento médio na produção de conídios de 43,0% em meio completo ($F_{2,}$

$F_{24} = 3,92$; $P = 0,03$) e 35,2% em BDA ($F_{2, 24} = 3,08$; $P = 0,06$), apesar do número médio de conídios em BDA não diferir estatisticamente dentre os tratamentos. No entanto, o acréscimo de IPs do tipo BBI aos meios MC e BDA não acarretou diferenças significativas quanto ao número de conídios de *M. anisopliae* em relação ao controle destes meios. A esporulação de *M. anisopliae* é maior no meio completo quando comparado ao BDA em todos os tratamentos ($F_{2, 48} = 1,73$; $P = 0,19$) (Tabela 3.2).

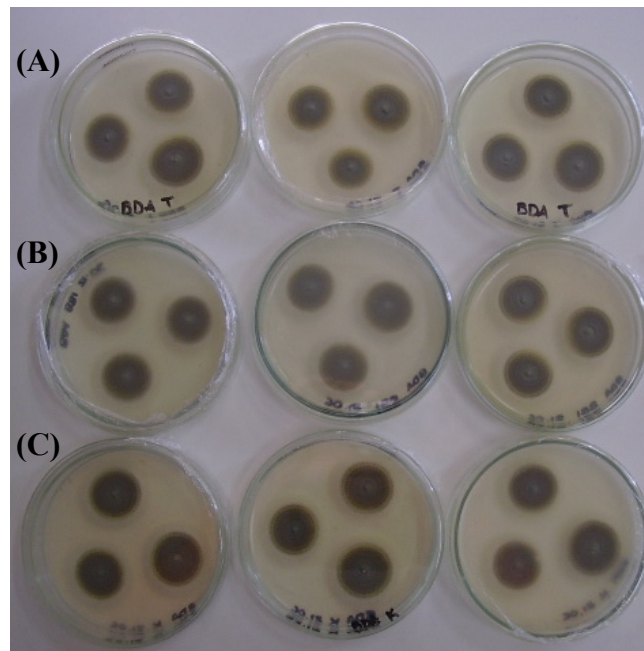


Figura 3.2 - *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura BDA sem (controle) (A) e com adição de 0,05% (p/v) de inibidores de proteinases purificados dos tipos Bowman-Birk (B) e Kunitz (C) 10 dias após a inoculação a $26 \pm 1^\circ\text{C}$

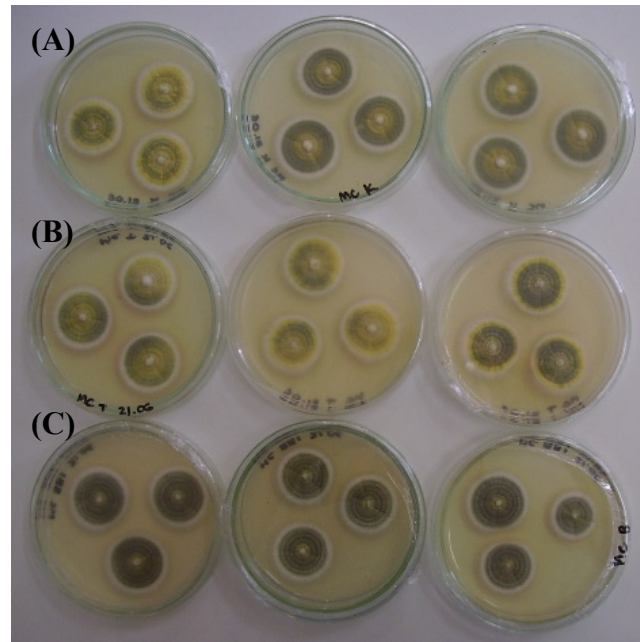


Figura 3.3 - *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura completo (MC) sem (controle) (B) e com adição de 0,05% (p/v) de inibidores de proteinases purificados dos tipos Kunitz (A) e Bowman-Birk (C) 10 dias após a inoculação a $26 \pm 1^\circ\text{C}$

3.2.3 Discussão

As proteases da classe tripsina desempenham inúmeras funções fisiológicas em animais, mas suas funções em fungos são pouco conhecidas. Em entomopatógenos, além da degradação proteolítica da cutícula de insetos, as proteases atuam, possivelmente, na utilização das proteínas do hospedeiro para nutrição, na destruição de proteínas antifúngicas do hospedeiro e na quebra de aminoácidos para elevação de pH (St LEGER et al., 1988). Um dos efeitos esperados da adição de IPs em meios de cultura, seria a sua atuação como antinutriente, inibindo enzimas proteolíticas específicas e, conseqüentemente, reduzindo a digestão das proteínas do meio, como tem sido demonstrado para alguns fungos fitopatogênicos (LORITO et al., 1994; CHILOSI et al., 2000; DUNAEVSKY et al., 2005). Entretanto estes efeitos não foram observados em *M. anisopliae* nos testes realizados como os inibidores purificados e semi-purificados.

A adição de 0,5% de inibidores de proteínases semi-purificados resultou em aumento do diâmetro das colônias de *M. anisopliae* nos dois meios testados. Este aumento foi maior no meio mais pobre do que no meio mais rico. Isto sugere que os componentes extraídos de sementes de soja estariam atuando como fonte protéica para o crescimento vegetativo do fungo. Interessante é que a adição de 0,5% de IPs semi-purificados no meio BDA resultou num crescimento 11% superior ao crescimento no meio mais rico (MC) que contém como fonte protéica 0,5% de extrato de levedura. Tal tendência também foi observada quanto à esporulação de *M. anisopliae*, pois, apesar do número de conídios ser maior no MC, o acréscimo na produção devido à adição de inibidores semi-purificados foi mais expressivo em BDA.

Os resultados com inibidores purificados indicaram que *M. anisopliae* não apresenta proteases que sejam bloqueadas por inibidores de tripsina (Kunitz). Apenas foi verificada uma redução no crescimento deste fungo quando 0,05% do inibidor purificado BBI foi adicionado ao meio completo. Entretanto, esta alteração no crescimento não resultou em redução na esporulação de *M. anisopliae* e também não foram detectadas alterações quando BBI foi adicionado ao meio BDA. Desta forma, pode-se inferir que não são esperados impactos diretos de plantas geneticamente modificadas para expressão de IPs dos tipos Kunitz e BBI na sobrevivência de *M. anisopliae* no solo.

Em geral a qualidade nutricional dos meios de culturas utilizados para produção de *M. anisopliae* têm um efeito mais acentuado na esporulação do que no crescimento vegetativo, não havendo relação direta entre estes parâmetros. Rohde et al. (2006) e Batista Filho et al. (2001), avaliando o crescimento vegetativo e a esporulação de *M. anisopliae* em meio de cultura desenvolvido por Alves et al. (1998), relataram diâmetros (3,8 e 3,5 cm) próximos aos mensurados nas colônias dos tratamentos controle do presente trabalho. No entanto, os mesmos autores observaram diferenças quanto à esporulação, $14,1 \times 10^8$ e $33,5 \times 10^8$ conídios/colônia, apesar de o entomopatógeno ser submetido a condições semelhantes para produção de conídios em ambas as pesquisas.

Carlie et al. (2001) afirmam que a exaustão de um ou vários nutrientes utilizados durante o crescimento vegetativo é um pré-requisito para a esporulação de muitas espécies de fungos. Todavia, o que se observou nesta pesquisa foi que apesar de diâmetros de colônias semelhantes entre tratamentos, houve maior esporulação de *M. anisopliae* no meio mais rico, comparado ao

meio mais pobre, sendo também observada esta superior produção de conídios no meio MC quando foram adicionados inibidores de tripsina do tipo Kunitz. Os resultados dos testes com os inibidores semi-purificados na maior concentração também resultaram em aumento na esporulação, concordando com o fato de que a atividade de inibidores de tripsina no extrato semi-purificado é 10 vezes maior do que a atividade inibitória de quimotripsina.

A adição de 0,05% de kunitz aos meios resultou em uma produção de conídios mais elevada do que a adição de 0,05% de inibidores de proteinases semi-purificados, quando comparada a produção em seus tratamentos controles. Os fatores determinantes do estímulo à esporulação de *M. anisopliae* por Kunitz é uma questão científica a ser investigada. O sistema de produção de *M. anisopliae* é feito em arroz autoclavado que tem baixo teor protéico e alto teor de carboidratos. Estes resultados levantam questionamentos referentes à necessidade de estudos mais detalhados a fim de determinar as exigências nutricionais de *M. anisopliae* e a relação entre custo e benefício ao utilizarem-se substratos com maiores teores de proteína.

3.3 Conclusões

O acréscimo de 0,5% (p/v) de inibidores de proteinases semi-purificados nos meios de cultura (MC e BDA) aumenta o crescimento vegetativo e a esporulação do fungo *M. anisopliae*. Há redução nos diâmetros das colônias deste entomopatógeno em MC com 0,05% (p/v) de inibidores purificados BBI. A adição de 0,05% (p/v) de inibidores purificados Kunitz em MC e BDA não altera o crescimento vegetativo do fungo, mas elava a produção de conídios de *M. anisopliae*.

Referências

ADAMS, D.J.; CAUSIER, B.E.; MELLOR, K.J.; KEER, V.; MILLING, R.; DADA, J. Regulation of chitin synthase and chitinase in fungi. In: MUZZARELLI, R.A.A. (Ed.). **Chitin enzymology**. Lyon: European Chitin Society, 1993. p. 15-16.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO Jr., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289–370.

ALVES, S.B.; RISCO, S.H.; SILVEIRA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. to *Diatraea saccharalis* (Fabr.). **Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie**, Berlin, v.97, n.4, p. 403-406, 1984.

BATISTA FILHO, A.B.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Entomopathogenic fungi: fungi imperfecti. In: _____. **Principles of insect pathology**. 2nd ed. Boston: Kluwer Academic, 1998. chap. 10, p. 321-364.

CARLIE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G.W. Spores, dormancy and dispersal. In: _____. **The fungi**. 2nd ed. London: Academic Press, 2001. chap. 4, p. 185-243.

CHILOSI, G.; CARUSO, C.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; BUZI, A.; NOBILE, M.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Antifungal activity of a Bowman-Birk-type trypsin inhibitor from wheat kernel. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 477-481, 2000.

DUNAEVSKY, Y.A.E.; ELPIDINA, E.N.; VINOKUROV, K.S.; BELOZERSKY, M.A. Protease inhibitor in improvement of plant resistance to pathogens and insects. **Molecular Biology**, New York, v. 34, n. 4, p. 608-613, 2005.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p.761-766, 2003.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, London, v. 330, p.160-163, 1987.

LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1757-1762, 2004.

LIU, B.; ZENG, Q.; YAN, F.; XU, H.; XU, C. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 271, p.1-13, 2005.

LORITO, M.; BROADWAY, R.M.; HAYES, C.K.; WOO, S.L.; NOVIELLO, C.; WILLIAMS, D.L.; HARMAN, G.E. Proteinase inhibitors from plants as a novel class de fungicides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 7, p. 525-527, 1994.

MOLOSOV, V.V.; LOGINOVA, M.D.; FEDURKINA, N.V.; BENKEN, I.I. The biological significance of proteinase inhibitors in plants. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 7, p. 77-80, 1976.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 109, p.217-224, 2003.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; SILVA, E.R.L. da; ALMEIDA, J.E.M. de. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Coleoptera:Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 231-240, 2006.

St LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, p. 285-293, 1988.

4 INIBIDORES DE PROTEINASES AFETANDO A PROPORÇÃO SEXUAL DE *Cotesia flavipes* (Cameron) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Resumo

O parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) é comumente utilizado no controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Com a utilização de técnicas moleculares na engenharia genética de plantas para torná-las mais resistentes ao ataque de insetos, tornaram-se necessários estudos para avaliar a segurança das variedades geneticamente modificadas (GM) em organismos benéficos. Estes estudos devem ser conduzidos caso a caso, de acordo com o tipo de modificação genética inserida. Variedades de cana GM expressando inibidores de proteinases dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI) foram desenvolvidas para reduzir os danos causados por *D. saccharalis*. A exposição de *C. flavipes* aos inibidores poderá ocorrer quando estes se alimentarem diretamente de seiva ou conteúdo celular extravasado da cana cortada ou queimada, ou poderão ser afetados indiretamente ao ingerir a substância açucarada (honeydew) liberada por sugadores ou ao parasitar hospedeiro que tenha se desenvolvido em plantas GM. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos diretos e indiretos de inibidores de proteinases (IPs) semi- e purificados extraídos de soja (Kunitz e Bowman-Birk - BBI) nos parâmetros biológicos de *C. flavipes* em *D. saccharalis*. Lagartas de *D. saccharalis* foram alimentadas em dieta sem e com 0,05% e 0,5% (p/p) de inibidores semi-purificados e então oferecidas a fêmeas de *C. flavipes*. Em outro experimento, inibidores purificados dos tipos Kunitz e BBI (0,5% p/v) foram adicionados a solução de mel a 50% e oferecidos diretamente a fêmeas do parasitóide que foram depois utilizadas para parasitar lagartas. Ambos experimentos foram compostos por quatro repetições com 25 lagartas cada. Após o parasitismo as lagartas permaneceram individualizadas em placas de Petri contendo dieta artificial, até a eclosão e pupação das larvas dos parasitóides. Os inibidores de proteinases semi-purificados e purificados não afetaram a duração dos períodos larval e pupal do parasitóide *C. flavipes* em *D. saccharalis*, o peso e número de pupas e percentual de emergência. Por outro lado, o percentual de parasitismo e a proporção de fêmeas em relação a machos de *C. flavipes* foi maior no tratamento onde as lagartas foram alimentadas com dieta contendo 0,5% de inibidores semi-purificados quando comparado à testemunha. A proporção fêmea:macho foi significativamente maior também quando os parasitóides foram alimentados com o inibidor do tipo Kunitz quando comparado ao controle e aos parasitóides alimentados com BBI.

Palavras-chave: Inibidores de proteinases; Kunitz; Bowman-Birk; Cana-de-açúcar; *Diatraea saccharalis*; Parasitóide; *Cotesia flavipes*

Abstract

The larval parasitoid *C. flavipes* is commonly used in biological control of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. The current use of insect-resistant genetically engineered plants makes necessary to evaluate its effects on beneficial organisms. These studies should be conducted according to introduced genetic modification. Genetically modified (GM) sugarcane varieties expressing Kunitz and Bowman-Birk (BBI) type proteinase inhibitors were developed to reduce the damage caused by *D. saccharalis*. *C. flavipes* exposition to the inhibitors could occur when they fed directly on sap or cellular contents of sugarcane, or could be indirectly affected when taking aphid honeydew or when parasiting hosts developed on GM plants. The objective of this study was to evaluate the direct and indirect effects of semi-purified and purified inhibitors, extracted from soybean (Kunitz and BBI) on biological parameters of *C. flavipes* in *D. saccharalis*. *D. saccharalis* caterpillars were fed to diet without and with 0.05% and 0.5% (w/w) of semi-purified inhibitors, and then offered to *C. flavipes* females. In another experiment, purified inhibitors (0.5% w/v) were added to a 50% honey solution and directly given to female parasitoids. Afterwards, those females parasitized caterpillars. Both experiments had four replicates with 25 caterpillars each. After parasitism, caterpillars were kept in individual Petri dishes containing artificial diet, until eclosion and pupation of parasitoid larvae. The semi-purified and purified proteinases inhibitors did not affect either the duration of larval and pupal stages of *C. flavipes* on *D. saccharalis*, or weight and number of pupae and emergence percentage. In other hand, the parasitism percentage and female proportion was bigger on the treatment where caterpillar were fed with diet containing 0.5% of semi-purified inhibitors, comparing to control. The ratio female:male was significantly higher also when parasitoids were fed to the Kunitz type inhibitor when compared to control and BBI.

Keywords: Proteases inhibitors; Kunitz; Bowman-Birk; Sugarcane; *Diatraea saccharalis*; Parasitoid; *Cotesia flavipes*

4.1 Introdução

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr.), é considerada a praga mais importante da cana-de-açúcar no Brasil, sendo responsável por danos diretos, com a abertura de galerias nos colmos, e indiretos, ao favorecer a penetração de fungos oportunistas na planta (GALLO et al., 1988), que podem inverter o açúcar da cana ou contaminar o caldo, ocasionando perdas tanto à produção de açúcar quanto à de álcool (MACEDO; BOTELHO, 1988). Dentre os métodos de controle da *D. saccharalis*, destaca-se o emprego da *Cotesia flavipes* (Cam.), um endoparasitóide larval gregário e cenobionte introdução no Brasil em 1974. Este parasitóide deposita seus ovos na hemocele da larva sendo capaz de manipular a fisiologia do hospedeiro a fim de permitir seu desenvolvimento larval (SCAGLIA et al., 2005).

Embora o controle de *D. saccharalis* seja realizado com sucesso por *C. flavipes*, existe um dano residual de 10% (BOTELHO et al., 1999), levando os pesquisadores a buscar formas complementares de controle como aumentar a resistência das variedades de cana.

Experimentos em laboratório revelaram que os inibidores da soja do tipo Kunitz e Bowman-Birk (BBI) afetam negativamente o crescimento, desenvolvimento e potencial reprodutivo de *D. saccharalis* (POMPERMAYER et al., 2001). Posteriormente, foi demonstrado que estes efeitos também ocorrem quando as lagartas se alimentam de plantas transgênicas de cana que expressam os inibidores de proteinases (IPs) (FALCO; SILVA-FILHO, 2003). Embora os resultados preliminares indiquem que os IPs isoladamente não foram suficientes para prevenir danos nas plantas de cana, as plantas transgênicas apresentam certo grau de resistência, indicando a viabilidade do uso desta técnica como fonte alternativa para aumento da resistência a *D. saccharalis*.

Plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos que expressam genes derivados de plantas como inibidores de proteases, ureases, inibidores de amilases e lecitinas foram testadas em um número limitado de espécies não-alvo, apesar dos inibidores apresentarem um espectro de atividade maior do que endotoxinas de *B. thuringiensis*, e, portanto, terem maior chance de afetar organismos não-alvo.

Os poucos estudos com plantas transgênicas que expressam inibidores de proteases e lectinas revelaram que não são significantes os efeitos diretos e indiretos em inimigos naturais (O'CALLAGHAN et al., 2005). Estudos com parasitóides têm sido feitos com hospedeiros mantidos em plantas transgênicas ou em dietas artificiais contendo o produto purificado. Em alguns casos foram detectados efeitos negativos em inimigos naturais quando as presas ou hospedeiros foram criados em dietas artificiais contendo estas substâncias, mas os mesmos resultados não foram reproduzidos quando plantas transformadas foram utilizadas. Este é o caso, por exemplo, da lectina *Galanthus nivalis* aglutinina (GNA) nos parasitóides *Aphidius ervi* (COUTY et al., 2001) e *Cotesia flavipes* (SÉTAMOU et al., 2002a).

É uma tarefa extremamente difícil avaliar o risco de plantas GM na biodiversidade. Uma estratégia que tem sido utilizada é a seleção de espécies de maior importância e maior risco potencial dentro de cada grupo funcional das espécies não-alvo. Vários inimigos naturais estão associados a cana-de-açúcar e poderão estar expostos aos inibidores de proteinases em cana GM.

Uma importante espécie dentre estes inimigos naturais é o parasitóide *C. flavipes*. A exposição de *C. flavipes* poderá ocorrer diretamente quando este alimentar de substâncias açucaradas na cana cortada ou extravasada após a queimada ou de forma indireta ao parasitar as lagartas de *D. saccharalis*. A fim de suprir suas necessidades energéticas, adultos de Hymenoptera procuram por alimentos ricos em açúcares (FARIA et al., 2007), podendo utilizar a seiva e o conteúdo celular extravasado por danos físicos na planta ou até mesmo o honeydew liberado por insetos sugadores como afídeos. Os efeitos indiretos poderão ainda ocorrer devido à redução do número de hospedeiros ou mesmo da sua qualidade nutricional ou através de alterações não intencionais das características da planta em consequência da transformação genética, denominado efeito pleiotrópico (FARIA et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis efeitos diretos e indiretos de inibidores de proteinase no desenvolvimento e parasitismo de *C. flavipes* em *D. saccharalis*.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Avaliação dos efeitos indiretos de inibidores de proteinases semi-purificados em *Cotesia flavipes*

4.2.1.1.1 Criação de *D. saccharalis* com inibidores de proteinases semi-purificados

Foram utilizadas lagartas recém eclodidas de *D. saccharalis* provenientes da criação de manutenção do Laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP), sendo transferidas cinco lagartas para cada tubo de vidro (25 mm de diâmetro x 85 mm de altura) contendo 15 mL de dieta artificial de alimentação de King e Hartley (1985) (Tabela 4.1), posteriormente tampados com algodão.

O experimento foi composto por três tratamentos: dieta artificial sem e com adição de inibidores de proteinases semi-purificados em duas concentrações 0,05% e 0,5% (p/p), com 4 repetições constituídas por 25 lagartas cada. Os IPs semi-purificados utilizado foram extraídos de sementes de soja no Departamento de Genética, Esalq/USP, segundo metodologia de Pompermayer et al. (2003) (descrita no capítulo 2), com atividade de inibição enzimática para tripsina e quimotripsina de 10% e 1%, respectivamente, referente ao total da proteína extraída. As

alíquotas equivalentes a cada tratamento foram incorporadas na dieta artificial à temperatura de 50°C.

As lagartas permaneceram em prateleiras de madeira no Laboratório de Biologia de Insetos durante seu desenvolvimento, sendo mantidas em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $75 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Após 16 dias da inoculação, as lagartas foram retiradas da dieta e submetidas à medição das cápsulas cefálicas, sendo selecionadas para o experimento apenas indivíduos no 5º instar larval. Tais lagartas foram pesadas antes de parasitadas por *C. flavipes*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% pelo programa estatístico Sisvar DEX/UFLA (versão 4.6, 2003).

Tabela 4.1 - Composição da dieta artificial de King e Hartley (1985) usada na alimentação de *Diatraea saccharalis* antes (Dieta 1) e após (Dieta 2) o parasitismo por *Cotesia flavipes*

Componetes	Dieta 1	Dieta 2
Germe de trigo	35 g	20 g
Farelo de soja	120 g	100 g
Açúcar	120 g	80 g
Sais de Wesson	17 g	-
Ácido ascórbico	4,2 g	2 g
Cloreto de colina	0,9 g	1 g
Vita Gold	0,9 mL	-
Solução vitamínica	25 mL	7,5 mL
Nipagin	7 g	3 g
Formol	1,7 mL	2 mL
Ácido acético	-	7,5 mL
Ágar	25 g	20 g
Água destilada	2000 mL	1100 mL
Tetraciclina	0,3 g	0,4 ou 1 g

4.2.1.1.2 Parasitismo de *D. saccharalis* alimentada com IPs semi-purificados pelo parasitóide *C. flavipes*

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Acarologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola – ESALQ/USP (Piracicaba, SP). Foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* de quinto ínstar, provenientes da criação em dieta artificial sem e com inibidores de proteinases semi-purificados do Laboratório de Biologia de Insetos (ESALQ/USP), e pupas do parasitóide *C. flavipes*, adquiridas no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Piracicaba, SP.

Após a emergência, os parasitóides foram mantidos em B.O.D. a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h por 24h, para que ocorresse a fertilização das fêmeas. As lagartas foram oferecidas individualmente a uma única fêmea de *C. flavipes*, permitindo-se apenas uma oviposição. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento sendo cada repetição constituída por 25 lagartas (item 4.2.1.1.1). Posteriormente, cada lagarta foi transferida para placas de Petri descartáveis (60 x 15 mm) contendo 4 cm² de dieta artificial 2 para manutenção das lagartas após o parasitismo por *C. flavipes* (Tabela 4.1) (Figura 4.2).

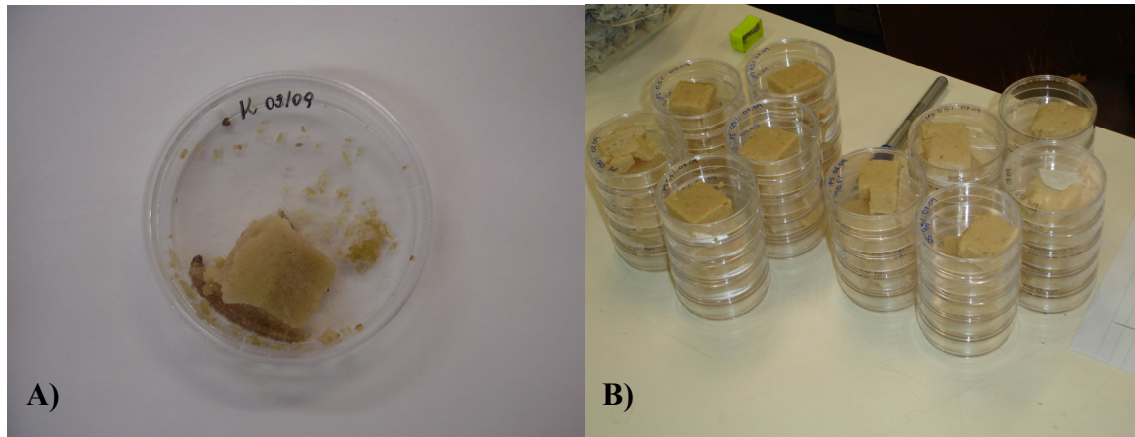


Figura 4.2 - A) Lagarta de *Diatraea saccharalis* após parasitada por *Cotesia flavipes*. B) dieta de King e Hartley (1985) para realimentação contendo inibidores de proteinases semi-purificados

As lagartas parasitadas foram mantidas em condições controladas com temperatura de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h, sendo realizadas observações diárias e troca da dieta a cada sete dias,

retirando-se, eventualmente, lagartas mortas e pupas de *D. saccharalis*, até a fase adulta dos parasitóides.

Os casulos de *C. flavipes* oriundos de cada lagarta foram pesados e transferidos para placas de Petri descartáveis (60 x 15 mm), permanecendo sob as condições ambientais descritas anteriormente. Após a emergência dos adultos, os números de fêmeas, de machos e de pupas inviáveis foram quantificados.

A duração dos períodos larval e pupal, peso e número de pupas, percentual de emergência e de parasitismo e proporção sexual (fêmea:macho) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% pelo programa estatístico Sisvar DEX/UFLA (versão 4.6, 2003), sendo os dados referentes ao último parâmetro transformados em $\sqrt{x+1}$ antes de serem analisados.

4.2.1.2 Efeito direto de inibidores de proteinases purificados dos tipos Bowman-Birk (BBI) e Kunitz em *C. flavipes*

O experimento foi desenvolvido utilizando-se lagartas de quinto instar de *D. saccharalis* e pupas do parasitóides *C. flavipes* a temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa média de $70\% \pm$ e fotofase de 14h. Adultos de *C. flavipes* recém emergidos foram alimentados através de algodão embebido em solução de mel (50%) sem e com inibidores de proteinases purificados (IPs) dos tipos BBI e Kunitz durante 48h, permitindo durante este período a fecundação das fêmeas do parasitóide. Sendo assim, o experimento foi composto por três tratamentos: A) alimentação com solução de mel; B) alimentação com solução de mel + 0,5% de IPs do tipo BBI (p/v) e C) alimentação com solução de mel + 0,5% de IPs do tipo Kunitz (p/v). Foram utilizadas quatro repetições constituídas por 25 lagartas cada.

A metodologia referente ao parasitismo das lagartas de *D. saccharalis* por *C. flavipes*, os parâmetros de avaliação e as análises estatísticas realizados neste experimento foram semelhantes aos descritos anteriormente no item 4.2.1.1.2.

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Avaliação dos efeitos indiretos de inibidores de proteinases semi-purificados em *Cotesia flavipes*

O peso das lagartas de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial com maior concentração de inibidores de proteinases semi-purificados (0,5% p/p) foi significativamente inferior ($F_{2, 297} = 6,72$; $P = 0,0014$) em relação ao peso das criadas em dieta sem IPs semi-purificados ou com menor concentração (0,05% p/v) (Tabela 4.2).

Os parâmetros biológicos duração das fases larval ($F_{2, 253} = 1,06$; $P = 0,35$) e pupal ($F_{2, 250} = 0,85$; $P = 0,43$), peso ($F_{2, 253} = 0,01$; $P = 0,99$) e número de pupas ($F_{2, 253} = 1,23$; $P = 0,29$) e percentual de emergência ($F_{2, 253} = 0,85$; $P = 0,43$) de *C. flavipes* não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. O percentual de parasitismo por *C. flavipes* foi menor nas lagartas alimentadas sem inibidores de proteinases do que com inibidores de proteinases semi-purificados (0,05%), mas não diferiu significativamente do tratamento com inibidores semi-purificados (0,5%) ($F_{2, 9} = 4,96$; $P = 0,035$) (Tabela 4.2).

No entanto, a proporção de fêmeas em relação a machos foi 78% maior no tratamento onde as brocas parasitadas foram submetidas à dieta com maior concentração de IPs semi-purificados, quando comparada à proporção observada na testemunha ($F_{2, 222} = 3,5$; $P = 0,032$) (Tabela 4.2).

4.2.2.2 Efeito direto de inibidores de proteinases purificados dos tipos Bowman-Birk (BBI) e Kunitz em *C. flavipes*

Foi observado que a utilização de inibidores de tripsina e quimotripsina na alimentação de *C. flavipes* não alterou o parasitismo em *D. saccharalis* nem os parâmetros biológicos do parasitóide avaliados (duração das fases larval - $F_{2, 223} = 1,97$; $P = 0,14$ e pupal - $F_{2, 204} = 2,39$; $P = 0,09$; peso - $F_{2, 223} = 1,54$; $P = 0,22$ e número de pupas - $F_{2, 223} = 0,01$; $P = 0,99$ e percentual de emergência - $F_{2, 223} = 0,29$; $P = 0,75$) de *C. flavipes* exceto pela proporção sexual. A proporção fêmea:macho foi estatisticamente maior quando o parasitóide foi alimentado com inibidor do tipo Kunitz (tripsina) quando comparado aos alimentados com BBI e ao controle ($F_{2, 201} = 8,11$; $P = 0,0004$) (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 - Média* (\pm EP) da duração das fases larval e pupal, do peso e número de pupas, do percentual de emergência e parasitismo e da proporção sexual (fêmea : macho) de *Cotesia flavipes* em *Diatraea saccharalis* alimentada em dieta sem e com inibidores de proteinases semi-purificados (0,05% e 0,5%) e média (\pm EP) do peso das lagartas de *D. saccharalis* submetidas ao parasitismo

Tratamento	Duração da fase larval (dias)	Fase pupal			% de Emergência	Proporção sexual	% de Parasitismo
		Duração (dias)	Peso de pupas ¹ (mg)	Nº de pupas			
Controle	11,5 \pm 0,12 a	5,1 \pm 0,05 a	52,2 \pm 1,8 a	56,2 \pm 1,9 a	93,4 \pm 1,6 a	1,59 \pm 0,6 a	83,0 \pm 1,3 a
0,05% IPS	11,4 \pm 0,10 a	5,1 \pm 0,04 a	52,1 \pm 1,6 a	58,6 \pm 1,9 a	95,5 \pm 1,0 a	2,37 \pm 0,5 ab	95,0 \pm 1,5 b
0,5% IPS	11,7 \pm 0,13 a	5,0 \pm 0,04 a	52,4 \pm 1,7 a	59,7 \pm 2,0 a	92,7 \pm 2,1 a	2,83 \pm 0,5 b	90,0 \pm 1,3 ab

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

¹ Peso de pupas do parasitóide por lagarta

Tabela 4.3 - Média (\pm EP) da duração das fases larval e pupal, do peso e número de pupas, do percentual de emergência e parasitismo e da proporção sexual (fêmea : macho) de *Cotesia flavipes* alimentada com solução de mel (50%) sem e com 0,5% (p/v) de inibidores de proteinase purificados (BBI e Kunitz) parasitando *Diatraea saccharalis*

Tratamento	Duração da fase larval (dias)	Fase pupal			% de Emergência	Proporção sexual	% de Parasitismo
		Duração (dias)	Peso de pupas ¹ (mg)	Nº de pupas			
Controle	11,4 \pm 0,08 a	5,7 \pm 0,07 a	54,8 \pm 2,4 a	55,7 \pm 3,0 a	86,0 \pm 3,7 a	3,0 \pm 0,4 a	79,0 \pm 2,5 a
0,5% BBI	11,4 \pm 0,07 a	5,7 \pm 0,07 a	52,6 \pm 2,6 a	51,4 \pm 3,1 a	87,6 \pm 3,4 a	4,3 \pm 0,3 a	77,0 \pm 1,7 a
0,5% Kunitz	11,2 \pm 0,09 a	5,7 \pm 0,09 a	58,5 \pm 2,4 a	60,2 \pm 2,6 a	84,0 \pm 3,2 a	6,8 \pm 0,4 b	90,0 \pm 1,7 a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

¹ Peso de pupas do parasitóide por lagarta

4.2.3 Discussão

Os resultados mostram que os inibidores de proteinases semi-purificados e purificados, não afetam de forma indireta e direta, a maioria dos parâmetros biológicos como a duração dos períodos larval e pupal do parasitóide *C. flavipes* em *D. saccharalis*, bem como peso, número de pupas e percentual de emergência.

Lövei e Arpaia (2005) fizeram uma revisão sobre o impacto de plantas transgênicas em inimigos naturais, relatando um total de 97 estudos quantificando parâmetros em parasitóides associados à plantas/dieta contendo lectinas ou inibidores de proteinases, dentre os quais fecundidade, longevidade do adulto, parasitismo, tamanho corpóreo, mortalidade e duração do desenvolvimento larval. Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, os autores relataram impactos significativamente negativos em 32% dos estudos realizados.

Sétamou et al. (2002b, 2002c) observaram que há variabilidade nos resultados referentes aos parâmetros biológicos de *C. flavipes* de acordo com a exposição dos organismos aos inibidores empregados nos experimentos, pois ao utilizarem dieta artificial contendo 0,5% de GNA e tecidos de cana transgênica (0,9% GNA) na alimentação de *D. saccharalis*, obtiveram, respectivamente, efeitos negativos e nenhum efeito na biologia do parasitóide desenvolvendo-se em tais lagartas.

No presente trabalho observou-se que lagartas de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial contendo 0,5% (p/p) de inibidores de proteinases semi-purificados, apresentaram redução de peso, o que corrobora com os resultados obtidos por Pompermayer et al. (2001). O consumo de IPs pelas lagartas, afetam indiretamente os parasitóides, pois alteram a qualidade nutricional do hospedeiro e/ou sua capacidade de resposta imunológica ao ser parasitado.

As maiores taxas de parasitismo por *C. flavipes*, constatadas nas lagartas alimentadas com inibidores, podem estar relacionadas aos efeitos dos IPs no metabolismo e desenvolvimento da *D. saccharalis*. Testes envolvendo livre escolha de *C. flavipes* em relação a lagartas de *D. saccharalis* criadas em plantas transgênicas expressando GNA e em plantas não transgênicas, apresentaram percentual de parasitismo mais elevado nas lagartas expostas à transgenia. Neste caso, o parasitismo está associado a fatores que aumentaram a atratividade das fêmeas do parasitóide às lagartas, como por exemplo, o aumento dos danos e galerias ocasionados pela broca durante sua alimentação na cana transgênica e, conseqüentemente, maior produção de

fezes, devido à ação do GNA que reduz o aproveitamento dos nutrientes disponíveis nas plantas (SÉTAMOU et al., 2002c).

Esta tendência também pode ser vista nas lagartas parasitadas por *C. flavipes* quando o parasitóide foi alimentado com Kunitz que é um inibidor de tripsina puro ($F_{2,9} = 3,02$; $P = 0,099$), não ocorrendo, todavia, interferência dos inibidores na fisiologia do hospedeiro. No entanto, o parasitóide pode estar utilizando os inibidores, juntamente com a solução de mel, em sua nutrição e conseqüente melhoria em sua performance. De forma semelhante, Faria et al. (2007) pesquisaram a suscetibilidade de afideos ao milho Bt e a performance de um parasitóide de Lepidoptera ao utilizar o honeydew liberado por esses afideos, constatando que o honeydew produzido a partir das plantas GM afeta positivamente a sobrevivência e o parasitismo de *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) sobre *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae).

A proporção sexual é um dos parâmetros mais estudados em análises de impacto de plantas geneticamente modificadas ou de produtos equivalentes adicionados a dietas artificiais em parasitóides (LÖVEI; ARPAIA, 2005). No desenvolvimento deste trabalho observou-se que fêmeas adultas de *C. flavipes* expostas diretamente a IPs do tipo Kunitz via alimentação deram origem a uma prole composta principalmente de fêmeas; enquanto que, no bioensaio a fim de avaliar efeitos indiretos de IPs nos parasitóides, as lagartas alimentadas em dieta com maior concentração de IPs semi-purificados, cujo peso foi inferior aos demais tratamentos, foram os hospedeiros que originaram a maior proporção de fêmeas em relação a machos de *C. flavipes* (Tabela 3.2).

Van Leerdam (1981) citado por Wiedenmann et al. (1992), encontrou proporções sexuais em *C. flavipes* variando de 1,2:1 a 5,8:1, afirmando que a proporção de fêmeas na progênie decresce com o aumento do tamanho do corpo das lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com cana-de-açúcar. No entanto, Wiedenmann et al. (1992) relataram proporções para a mesma espécie de parasitóide de 5,21:1 a 8,25:1, não estabelecendo relação entre proporção sexual e ínstar do hospedeiro. Diversos trabalhos relatam proporções sexuais em *C. flavipes* muito variáveis, devido a fatores como tamanho e ínstar do hospedeiro (WIEDENMANN et al., 1992; CAMPOS-FARINHA; CHAUD-NETTO, 2000), e, principalmente, pela oviposição de fêmeas copuladas. Vetorelli et al. (1999) afirmam que fêmeas

de *C. flavipes* são originadas a partir de ovos fertilizados, enquanto que os machos são produzidos por partenogênese arrenótoca, ou seja, de ovos não fertilizados.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3 deste trabalho, é possível observar que as fêmeas de *C. flavipes* que tiveram acesso à solução de mel geraram proles com maiores proporções de fêmeas quando comparadas às proles oriundas de fêmeas não alimentadas, por exemplo, as fêmeas testemunhas que receberam alimentação originaram 47% mais fêmeas do que as testemunhas não alimentadas. De acordo com Faria et al. (2006) citado por Faria et al. (2007), para alcançar padrões ótimos de sobrevivência e reprodução, *C. marginiventris* necessita alimentar-se repetidamente em uma fonte de açúcar, podendo este fato ser relevante para determinar a proporção sexual de parasitóides desse gênero.

Cultivares resistentes a insetos, incluindo plantas transgênicas, podem ser compatíveis com outras táticas de manejo de pragas de forma efetiva e sustentável (SÉTAMOU et al., 2002a), fato que corrobora com a importância dos estudos sobre o impacto de cultivares geneticamente modificadas nos inimigos naturais do inseto-alvo ou mesmo sobre possíveis agentes de controle de pragas secundárias tolerantes à transgenia. Será necessária a realização de experimentos que comprovem os efeitos dos inibidores de proteinases purificados (Kunitz) observados na proporção sexual e no parasitismo de *C. flavipes* alimentadas com mel a 50%, desenvolvendo-se no hospedeiro *D. saccharalis*. Para isso, seriam utilizadas fontes protéicas neutras, como por exemplo, albumina de soro bovino (BSA) na mesma concentração de IPs adicionada à solução de mel.

4.3 Conclusões

Inibidores de proteinases semi- e purificados (Kunitz e BBI) não afetam os parâmetros biológicos duração larval e pupal, número e peso de pupas e percentual de emergência do parasitóide *C. flavipes* em *D. saccharalis*. A proporção de fêmeas de *C. flavipes* em relação a machos nas proles é maior quando os parasitóides utilizam como hospedeiro *D. saccharalis* alimentadas com inibidores semi-purificados e quando as fêmeas de *C. flavipes* são alimentadas com 0,5% de IPs purificados do tipo Kunitz.

Referências

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGA NETO, J.F. das; OLIVEIRA, C.P.B. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zicchi (Hymenoptera: Traichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Vacaria, v. 28, n. 3, p. 591-496, 1999.

CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; CHAUD-NETTO, J. Biologia reprodutiva de *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) V. Avaliação do número de posturas, prole e razão sexual do parasitóide em relação ao tamanho do hospedeiro *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 249-252, 2000.

COUTY, A.; DOWN, R.E.; GATEHOUSE, A.M.R.; KAISER, L.; PHAM-DEL'EGUE, M.H.; POPPY, G.M. Effects of artificial diet containing GNA and GNA-expressing potatoes on the development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, p. 1357–1366, 2001.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 761-766, 2003.

FARIA, C.A.; WÄCKERS, 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, n. 7, e600. doi:10.1371/journal.pone.0000600, 2007. Disponível em: <<http://www.plosone.org/doi/pone.0000600>>. Acesso em: 21 out. 2007.

GALLO, D; NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B. Pragas das plantas e seu controle. In: _____. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: Agrônoma Ceres, 2002. cap. 12, p. 397-912.

LÖVEI, G.L.; ARPAIA, S. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 114, p. 1-14, 2005.

MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 160, n. 2-14, 1988.

O'CALLAGHAN M.; GLARE, T.R.; BURGESS, E.P.J.; MALONE, L.A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 50, p. 271–292, 2005.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 109, p. 217-224, 2003.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, p. 79-85, 2001.

SCAGLIA, M.; CHAUD-NETTO, J.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; CEREGATO, S.A.; GOBBI, N.; RODRIGUES, A. Oviposition sequence and offspring of mated and virgin females of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Diatraea saccharalis* larvae (Lepidoptera: Crambidae). **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 283-298, 2005.

SETAMOU, M.; BERNAL, J.S.; LEGASPI, J.C.; MIRKOV, T.E. Effects of snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin) expressed in transgenic sugarcane on fitness of *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the nontarget pest *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 95, p. 75–83, 2002a.

_____. Parasitism and location borer (Lepidoptera: Pyralidae) by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) on transgenic and conventional sugarcane. **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, n. 6, p. 1219-1225, 2002b.

SETAMOU, M.; BERNAL, J.S.; LEGASPI, J.C.; MIRKOV, T.E.; LEGASPI JR., B.C. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters and damage. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 95, p. 469-477, 2002c.

VETORELLI, M.P.; MASCHIO, L.R.; ALMEIDA, J.C.B. Dados parciais sobre as diferenças sexuais da prole de *Cotesia flavipes* Cameron, 1981 (Hymenoptera: Braconidae) em condições laboratoriais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS BIOLÓGICAS, 1999, Rio Preto. **Anais eletrônicos...** Rio Preto, 1999. Disponível em: <<http://www.unirpnet.com.br/Pesquisa/Anais/bio.html>. > Acesso em: 21 out. 2007.

WIEDENMANN, R.N.; SMITH JR., J.W.; DARNELL, P.O. Laboratory rearing and *biology of the parasite Cotesia flavipes (Hymenoptera: Braconidae) using Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Pyralidae) as a host. Environmental Entomology*, College Park, v. 21, p. 1160-1167, 1992.

5 IMPACTO DE INIBIDORES DE PROTEINASES DE SOJA NO DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE)

Resumo

Apis mellifera L. é uma das espécies mais utilizadas em estudos que envolvem análises de risco de plantas transgênicas. Esta espécie tem a importante função ecológica de polinização de plantas e é utilizada comercialmente para produção de mel. Efeitos negativos de inibidores de proteinases na biologia e comportamento de adultos de *A. mellifera* já foram relatados. Entretanto, quase todos os testes de toxicidade de inibidores em abelhas foram realizados em nível individual e em curto prazo. O objetivo deste trabalho foi verificar o impacto do consumo de inibidores de proteinases semi-purificados no crescimento de colônias de *A. mellifera* e na formação e reposição de abelhas-rainha. Estes estudos têm o objetivo de fornecer subsídios sobre a segurança de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificadas (GM) com níveis aumentados de resistência à broca da cana, *Diatraea saccharalis* pela expressão de inibidores de proteinase dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI). As abelhas são freqüentes em canaviais e estarão expostas ao produto do transgene devido ao fato de utilizarem como substrato alimentar a sacarose liberada após o corte das plantas durante a colheita. Os tratamentos consistiram de solução de mel a 40% acrescidos de: *i*) 0,4% de inibidores semi-purificados (p/v); *ii*) 0,4% de albumina de soro bovino (p/v) (BSA) e *iii*) controle (somente solução de mel). Cada tratamento foi composto por quatro repetições representadas por uma colméia cada. Os parâmetros avaliados foram: área destinada aos imaturos (ovos, larvas e pupas) (mensurada com auxílio de gabarito) e capacidade de reposição de rainhas. Várias colônias abandonaram as colméias no decorrer do experimento, e devido ao reduzido número de repetições remanescentes não foi possível realizar comparações estatísticas em nenhum dos parâmetros avaliados. Os resultados preliminares obtidos indicaram uma tendência de aumento no crescimento populacional das colméias pelo consumo de BSA. Observações referentes ao consumo de inibidores semi-purificados, embora não conclusivas, justificam a necessidade da realização de estudos de análise de riscos de cana-de-açúcar GM que expressam inibidores de proteinases.

Palavras-chave: Inibidores de proteinases; Cana-de-açúcar; Organismos não-alvo; Polinizadores;
Apis mellifera

Abstract

Apis mellifera L. is one of the most used species in risk analysis studies of transgenic plants. This species has the important ecological function of plant pollination and it is used commercially for the production of honey. Negative effects of proteinases inhibitors in the biology and behavior of adults of *A. mellifera* have been reported. However, the majority of toxicity tests of inhibitors in bees were held on individual basis and in evaluated in short-term period. The objective of this study was to verify the impact of the consumption of semi-purified proteinase inhibitors in the growth of colonies of *A. mellifera* and in the replacement of the

queen. These studies were designed to provide subsidies on the safety of varieties of sugarcane genetically modified (GM) with increased levels of resistance to the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* by the expression of Kunitz and Bowman-Birk (BBI) types of proteinase inhibitors. Bees are frequent in sugarcane fields and will be exposed to the transgene product when they feed on sucrose released after cutting of cane during the harvest. The treatments consisted of a 40% honey solution plus one of the following: i) 0.4% of semi-purified inhibitor (w/v), ii) 0.4% bovine serum albumin (w/v) (BSA) and iii) control (only solution of honey). Each treatment was composed of four repetitions each represented by a honeycomb. The parameters evaluated were: area for the immature (eggs, larvae and pupae), and ability to replace the queen. Several colonies abandoned the hives during the course of the experiment, and due to the low number of repetitions remaining, it was not possible to perform statistical comparisons in any of the parameters evaluated. Preliminary results obtained indicated a trend of increased population growth on the hives due to the consumption of BSA. Observations on the effects of proteinase inhibitors on *A. mellifera*, though not conclusive, justify the necessity of risk analysis studies on sugarcane GM that over express proteinases inhibitors.

Keywords: Proteases inhibitors; Sugarcane; Non-target organisms; Pollinators; *Apis mellifera*

5.1 Introdução

Uma das maiores preocupações públicas sobre o uso de plantas transgênicas são os seus efeitos potenciais em organismos não-alvo (SHARMA et al., 2004). Dentre as principais espécies não-alvo selecionadas para análises de riscos da maioria das plantas modificadas geneticamente (GM) estão representantes do grupo dos polinizadores, destacando-se as abelhas *Apis mellifera* L. Até mesmo onde estes insetos não atuam essencialmente como polinizadores nas culturas agrícolas, eles apresentam adicional importância devido à produção de mel (O'CALLAGHAN et al., 2005).

Plantas GM que expressam inibidores de proteinases (IPs) vêm sendo estudadas como alternativa no controle de insetos praga, particularmente das ordens Lepidoptera e Coleoptera (RYAN, 1989; 1990; SCHULER et al., 1998, FALCO et al., 2001). Como estratégia para conferir resistência à broca *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), principal praga da cultura da cana-de-açúcar, foram introduzidos genes que expressam inibidores de proteinases dos tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI), extraídos de sementes de soja (*Glycine max* L.), em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (FALCO; SILVA-FILHO, 2003).

A. mellifera é uma espécie encontrada frequentemente na cultura da cana-de-açúcar e, por isso, deve ser incluída nas análises de risco de cana GM para expressão de inibidores de

proteínases. Estes organismos estão expostos diretamente aos inibidores de proteínases, pois são atraídos pela sacarose liberada após o corte da cana crua, durante a colheita mecanizada, ou após a queimada das plantas, na colheita manual.

Abelhas das espécies *A. mellifera* e *Bombus terrestris* L. utilizam enzimas proteolíticas no processo de digestão das proteínas que compõem sua dieta (MALONE et al., 2000), tendo-se demonstrado efeitos negativos de inibidores de proteínases na sobrevivência, na digestão de proteínas, no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, na habilidade de aprendizagem, na atividade de vôo e nas estratégias na busca por alimento destas espécies (BURGESS et al., 1996; GIRARD et al., 1998; MALONE et al., 2000; 2001; BABENDREIER et al., 2005; DECHAUME-MONCHARMONT et al., 2005).

Em geral, testes com inibidores de proteínases são realizados como bioensaios convencionais de toxicidade por ingestão ou por contato, similares aos desenvolvidos com pesticidas químicos, onde abelhas são avaliadas individualmente (MALONE; PHAM-DELÈGUE, 2001). Malone et al. (2001) avaliaram os efeitos da ingestão de um inibidor de tripsina (aprotinina) adicionado ao pólen em colônias de *A. mellifera*, constatando redução na longevidade de adultos. Na metodologia utilizada por esses autores, indivíduos recém emergidos foram separados das colônias, identificados, submetidos à alimentação com inibidor de tripsina e posteriormente liberados, sendo observados por apenas 7 dias.

O impacto de inibidores de proteínases em colônias de *A. mellifera* em campo ou mesmo a exposição destes insetos a doses subletais a longo prazo ainda são desconhecidos. Outra questão científica que precisa ser investigada refere-se ao efeito destes inibidores na formação de abelhas-rainha, já que uma nutrição com dieta rica em proteínas é fator determinante para reposição destes indivíduos. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar o efeito do consumo de inibidores de proteínases semi-purificados (contendo Kunitz e Bowman-Birk) no aumento populacional de colônias de *A. mellifera*, através da medição das áreas destinadas aos imaturos (ovos, larvas e pupas) e na reposição de rainhas após sua remoção das colméias.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Centro Ecológico “Flora Guimarães Guidotti” da Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, entre os meses de maio e setembro de 2007 (Figura 5.1).

Foram utilizadas colméias de *A. mellifera* destinadas à produção comercial de mel, instaladas na área experimental e seccionadas segundo Silva e Freitas (2004) a fim de padronizá-las, mantendo-se como núcleo dois quadros de cria operculada com aproximadamente 3000 abelhas cada (ALBARRACÍN; FURARI, 2006), um quadro com alimento (mel) e um quadro com cera alveolada (Figura 5.2).



Figura 5.1 - Vista geral dos núcleos de *Apis mellifera* instalados no Centro Ecológico “Flora Guimarães Guidotti”/FEALQ/ESALQ, Piracicaba-SP

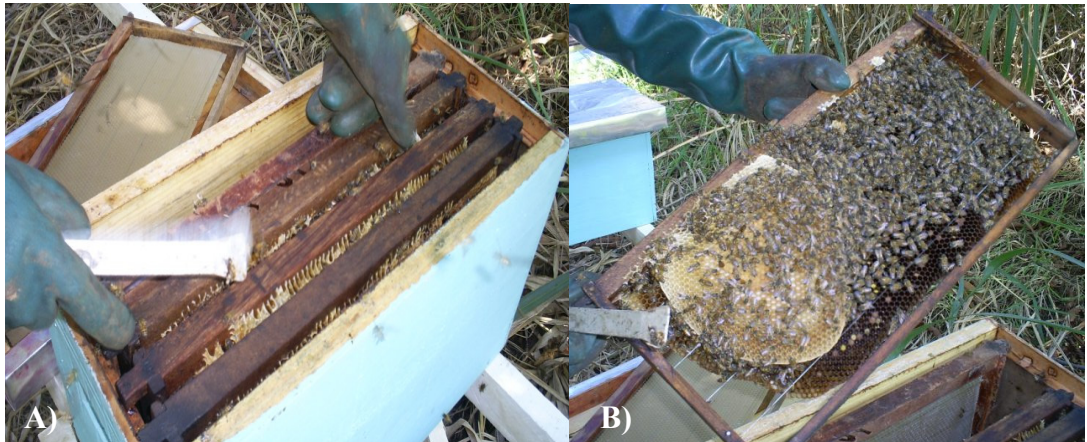


Figura 5.2 - A) Quadros compondo os núcleos de *Apis mellifera*; B) Quadro contendo áreas de cria (ovos, larvas e pupas) de *A. mellifera*

Para estabilização dos núcleos foi fornecida às abelhas dieta suplementar (solução açucarada 40%) semanalmente durante 30 dias, através de alimentadores internos (Figura 5.3). Após esse período as colméias tiveram suas áreas de cria (ovos, larvas e pupas) dimensionadas de acordo com metodologia de Silva e Freitas (2004), com a utilização de gabarito subdividido em áreas com dimensão de 4 cm² cada.



Figura 5.3 - Alimentadores internos para fornecimento das soluções de mel (40%), acrescidas com inibidores de proteinases semi-purificados (0,4% p/v), testadas nos núcleos de *Apis mellifera*

Após este período as colméias foram submetidas aos diferentes tratamentos. O experimento foi composto por três tratamentos, com 4 repetições cada: i) solução açucarada 40%

contendo 0,4% de inibidores de proteinases semi-purificados (p/v); *ii*) solução açucarada 40% contendo 0,4% de BSA (Albumina de Soro Bovino – Inlab, São Paulo) (p/v) e *iii*) solução açucarada 40% sem aditivos. A inclusão de tratamento com adição de proteína neutra BSA à solução açucarada serviu como controle positivo, já que os inibidores de proteinases, por tratar-se de uma fonte protéica, poderiam aumentar a atratividade das abelhas (PHAM-DELÈGUE et al., 2000). Os inibidores de proteinases semi-purificados contendo os tipos Kunitz e Bowman-Birk (BBI), foram extraídos de sementes de soja (POMPERMAYER et al., 2001) no Departamento de Genética da ESALQ (método de extração descrito no capítulo 1), com atividade enzimática para inibição de tripsina e quimotripsina equivalentes a 10% e 1% do total de proteína retirada das sementes, respectivamente.

A solução açucarada foi oferecida às abelhas quinzenalmente através de alimentadores internos, fornecendo-se o volume de 500 mL por colméia. No entanto, 15 dias após o início do experimento, devido à fermentação da solução açucarada, foram realizadas alterações na metodologia empregada. A solução inicial foi substituída por mel a 40%, sendo disponibilizado semanalmente a cada colméia 250 mL de solução.

O tamanho das áreas de cria das colméias foi dimensionado a cada 15 dias. Após 45 dias, foram retiradas as rainhas a fim de constatar a capacidade de reposição das mesmas nas colméias em estudo. As médias das diferenças entre medições finais e iniciais seriam submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% pelo programa estatístico Sisvar DEX/UFLA (versão 4.6, 2003). Em função de problemas ocasionados por invasão de formigas nas colméias e outros fatores de causas desconhecidas, ocorreu o abandono de alguns núcleos, inviabilizando a realização de análises estatísticas, devido ao número restrito de repetições.

5.2.2 Resultados

O acréscimo de 0,4% de proteína neutra (BSA) à solução de mel (40%), utilizada para alimentação das colméias de *A. mellifera*, resultou no aumento de 65,6% da área de imaturos (ovos, larvas e pupas) após 45 dias de consumo. No entanto, os núcleos expostos ao alimento com 0,4% de inibidores de proteinases semi-purificados (p/v) e aqueles destinados ao controle

apresentaram, respectivamente, uma redução de 23,4% e 14,7% no crescimento populacional, referente ao mesmo período de avaliação (Figura 5.4).

Foi constatada, em todas as colméias avaliadas durante o experimento, capacidade de reposição de abelhas-rainha, entretanto o pequeno número de repetições inviabilizou comparações estatísticas sobre este parâmetro.

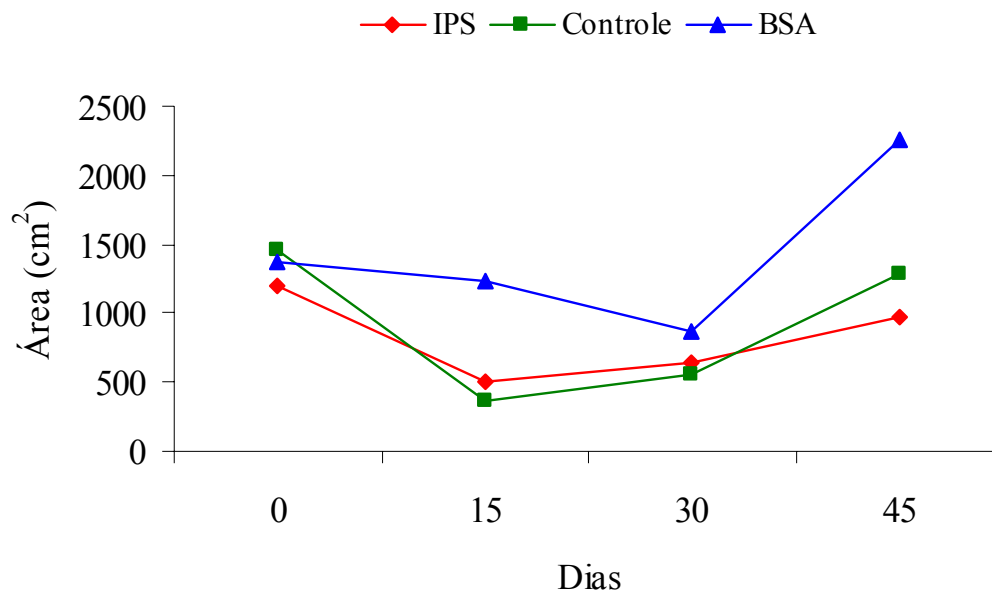


Figura 5.4 – Área de imaturos (ovos, larvas e pupas) nas colônias de *Apis mellifera* submetidas à alimentação com solução de mel (40%) sem e com adição de 0,4% de BSA (Albumina de Soro Bovino) e 0,4% de inibidores de proteinases semi-purificados (IPS) durante 45 dias

5.2.3 Discussão

Os resultados observados com o fornecimento de inibidores de tripsina e quimotripsina (extrato semi-purificado) a colônias de *A. mellifera*, adicionados à dieta suplementar, não são conclusivos devido ao reduzido número de repetições avaliado até o final do experimento. Resultados de testes com abelhas e produtos transgênicos constataram que os efeitos diretos de plantas GM em *A. mellifera* e *Bombus* sp. variam em função do tipo de transgenia e da atividade

biológica da proteína expressa (MALONE; PHAM-DELEÈGUE, 2001). Diferentes tipos de inibidores de proteinases apresentaram efeitos negativos no desempenho, comportamento e fisiologia destes insetos (BURGESS et al., 1996; GIRARD et al., 1998; MALONE et al., 2000; 2001; BABENDREIER et al., 2005; DECHAUME-MONCHARMONT et al., 2005).

O presente estudo difere das metodologias encontradas na literatura, principalmente pelos objetivos referirem-se aos efeitos em populações e não em indivíduos, além de diferir quanto ao tempo de avaliação do experimento. Entretanto, a metodologia empregada não se mostrou adequada. Foram encontradas dificuldades referentes ao veículo utilizado para o fornecimento dos inibidores. A administração de 500 mL de solução açucarada (40%) a cada 15 dias permitiu o desenvolvimento de microrganismos fermentadores, tendo que ser substituída por 250 mL de mel a 40% em intervalos semanais. A manipulação freqüente das colméias (quinzenalmente) pode ter sido um dos fatores que contribuíra para o abandono de várias colméias pelas abelhas. Além disso, em função da atratividade do substrato alimentar numa época de escassez de alimento (inverno) e do uso de enxames relativamente reduzidos, ocorreu a invasão dos núcleos por insetos como formigas e outros polinizadores, podendo também ter ocasionado o abandono dos ninhos pelos adultos de *A. mellifera*. Tais entraves inviabilizaram a análise dos dados referentes ao experimento. É possível também que o odor da solução contendo inibidores de proteinases semi-purificados seja menos atraente às abelhas que as soluções dos demais tratamentos. Desta forma, torna-se fundamental a repetição do bioensaio ajustando-se a metodologia. O ideal seria a utilização do caldo de cana de variedades GM e suas isolinhas nos experimentos, mas devido às dificuldades para obtenção de autorização legal para estudos de campo com OGM, não será possível adotar tal metodologia num futuro próximo.

5.3 Considerações Finais

Serão necessárias novas investigações para obtenção de resultados conclusivos quanto aos efeitos potenciais de inibidores de proteinase em colônias de *A. mellifera*, adotando-se os devidos ajustes à metodologia científica sugerida neste trabalho.

Referências

ALBARRACÍN, V.N.; FURARI, S.R.C. Aceitação de larvas de diferentes grupos genéticos de *Apis mellifera* na produção de abelhas rainhas. **Archivos Latinoamericano de Producción Animal**, Mayaguez, v. 14, n. 2, p. 33-41, 2006.

BABENDREIER, D.; KALBERER, N.M.; ROMEIS, J.; FLURI, P.; MULLIGAN, E.; BIGLER, F. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. **Apidologie**, Paris, v. 36, p. 585-594, 2005.

BURGESS, E.P.J.; MALONE, L.A.; CHRISTELLER, J.T. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, n. 9, p. 823-828, 1996.

DECHAUME-MONCHARMONT, F.X.; AZZOUZ, H.; PONS, O.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Soybean proteinase inhibitor and foraging strategy of free flying honeybees. **Apidologie**, Paris, v. 36, p. 421-430, 2005.

FALCO, M.C.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 113-122, 2001.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Plant Physiology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 761-766, 2003.

GIRARD, C.; PICARD-NIZOU, A.L.; GRALLIEN, E.; ZACCOMER, B.; JOUANIN, L.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 7, p. 239-246, 1998.

MALONE, L.A.; PHAM-DELÈGUE, M. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera* L.) and bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, Paris, v. 32, p. 1-18, 2001.

MALONE, L.A.; BURGESS, E.P.J.; STEFANOVIC, D.; GATEHOUSE, H.S. Effects of four proteinase inhibitors on the survival of worker bumblebees, *Bombus terrestris* L. **Apidologie**, Paris, v. 31, p. 25-38, 2000.

MALONE, L.A.; BURGESS, E.P.J.; GATEHOUSE, H.S.; VOISEY, C.R.; TREGIDGA, E.L.; PHILIP, B.A. Effects of ingestion of *Bacillus thuringiensis* toxin and trypsin inhibitors on honey bee flight activity and longevity. **Apidologie**, Paris, v. 32, p. 57-68, 2001.

NOGUEIRA-COUTO, R.H. Produção de geléia real utilizando dietas artificiais em regiões canavieiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., Teresina, 1996. **Anais ...** Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996. p. 383.

O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T.R.; BURGESS, E.P.J.; MALONE, L.A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 50, p. 271-292, 2005.

PHAM-DELÈGUE, M.H.; GIRARD, C.; Le METAYER, M.; PICARD-NIZOU, A.L.; HENNEQUET, C.; PONS, O.; JOUANIN, L. Long-term effects of soybean proteases inhibitor on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 95, p. 21-29, 2000.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, p. 79-85, 2001.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. **Bioessays**, Cambridge, v. 10, p. 20-24, 1989.

_____. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 16, p. 168-175, 1998.

SHARMA, H.C.; SHARMA, K.K.; CROUCH, J.H. Genetic transformation of crops for insect resistance: potential and limitations. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 23, n. 1, p. 47-72, 2004.

SILVA, R.H.D.; FREITAS, B.M. Produção e desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) a partir de diferentes áreas e idades de cria. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 545-549, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)