



CAMILA DA SILVA FERNANDES SOUZA

**SEQUESTRO E TRANSFERÊNCIA DA PROTEÍNA CRY1F
DO MILHO EM *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J. E. SMITH,
1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E IMPLICAÇÕES
PARA ORGANISMOS NÃO ALVO**

LAVRAS-MG

2017

CAMILA DA SILVA FERNANDES SOUZA

**SEQUESTRO E TRANSFERÊNCIA DA PROTEÍNA CRY1F DO MILHO EM
SPODOPTERA FRUGIPERDA (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)
E IMPLICAÇÕES PARA ORGANISMOS NÃO ALVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

Professor Doutor Luís Cláudio Paterno Silveira
Orientador

Doutora Simone Martins Mendes
Coorientadora

**Lavras-MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Camila da Silva Fernandes.

Sequestro e transferência da proteína Cry1F do milho em
Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)
e implicações para organismos não alvo / Camila da Silva
Fernandes Souza. - 2017.

87 p.

Orientador(a): Luís Cláudio Paterno Silveira.

Coorientador(a): Simone Martins Mendes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Manejo de resistência de insetos. 2. Controle Biológico. 3.
Proteína Cry1F do milho. I. Silveira, Luís Cláudio Paterno. II.
Mendes, Simone Martins. III. Título.

CAMILA DA SILVA FERNANDES SOUZA

**SEQUESTRO E TRANSFERÊNCIA DA PROTEÍNA CRY1F DO MILHO EM
SPODOPTERA FRUGIPERDA (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)
E IMPLICAÇÕES PARA ORGANISMOS NÃO ALVO**

**UPTAKE AND TRANSFER OF CORN PROTEIN CRY1F PROTEIN IN
SPODOPTERA FRUGIPERDA (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)
AND IMPLICATIONS TO NON-TARGET ORGANISMS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Controle Biológico, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2017.
Doutor Marcos Antônio Matiello Fadini (UFSJ)
Doutora Rosângela Cristina Marucci (UFLA)

Prof. Dr. Luís Cláudio Paterno Silveira
Orientador

Doutora Simone Martins Mendes
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2017**

*A Deus e aos meus pais pelo apoio nos estudos,
extrema dedicação e incondicional amor.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por nunca me abandonar.

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de ingressar no programa de Pós Graduação em Entomologia.

A Embrapa Milho e Sorgo por ceder suas dependências para realização do trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de mestrado.

A Doutora Simone Martins Mendes pela dedicada orientação, importantes oportunidades, carinho, apoio, valiosos ensinamentos e ajuda de sempre.

Ao Professor Doutor Luís Cláudio Paterno Silveira pela orientação, apoio, confiança, oportunidade e disponibilidade.

Aos Professores Doutores Rosangela Cristina Marucci e Marcos Antônio Matiello Fadini pela presença na banca, contribuindo grandemente com o trabalho.

A Doutora Débora Pires Paula e ao Doutor David Alan Andow pela dedicada e importante ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, Lorena, Nathália, Michele, Clareana, Caio, Amanda, Camila, Eustáquio, pelas ajudas experimentais e grandes alegrias no convívio no dia-a-dia de trabalho.

Aos meus amados pais Ronaldo e Wania pelo grandioso apoio, e enorme amor.

Aos meus irmãos Raphael, Daniel e Bruno pelo grande apoio, carinho e paciência.

Ao meu namorado Thiago pelo carinho, apoio, paciência, dedicação e amor.

A todos os meus amigos pelos momentos de descontração, apoio e carinho. Aos meus amigos do curso de Entomologia Letícia, Tiago, Flavinha, Morango, Fernanda, Kulian, Alexandra, Dyrrson, Diego e Julius pelo apoio, momentos de descontração, companhia e ajuda nos estudos.

Aos colegas, funcionários, professores e pesquisadores da Universidade Federal de Lavras e Embrapa Milho e Sorgo.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

Um dos principais problemas da utilização da tecnologia Bt é a capacidade dos insetos alvo evoluírem resistência às proteínas tóxicas, além da possibilidade de risco para os organismos não alvo à tecnologia. Portanto, objetivo deste trabalho foi avaliar a passagem da proteína Cry1F presente no milho Bt para os descendentes de *Spodoptera frugiperda*, bem como a ação dessa proteína na capacidade e eficiência de predação de *Orius insidiosus* e *Doru luteipes*, avaliando a compatibilidade do uso desses agentes entomófagos para *S. frugiperda* resistente à proteína Cry1F. Lagartas neonatas resistentes e suscetíveis à proteína Cry1F foram alimentadas com milho não Bt por dez dias e depois com milho Bt TC1507, que expressa a proteína Cry1F até o final do desenvolvimento da fase larval. Foram analisados quatro tratamentos: 1) Lagartas resistentes à proteína Cry1F com ambos os sexos expostos à mesma proteína, 2) lagartas resistentes à Cry1F com apenas o macho exposto à Cry1F, 3) lagartas resistentes com apenas a fêmea exposta e 4) lagartas suscetíveis não expostas à proteína servindo como tratamento controle. A detecção e quantificação da proteína Cry1F foi realizada através do teste Elisa de acordo com o protocolo do Kit Agdia®. O tempo de busca e capacidade de predação de ovos de *S. frugiperda* resistentes à proteína Cry1F foram determinados para ninfas de 1º, 3º e 5º ínstar de *O. insidiosus* e 1º, 3º e 4º de *D. luteipes*. Para a avaliação com lagartas neonatas foram determinados para ninfas de 3º e 5º ínstar de *O. insidiosus* e 3º e 4º de *D. luteipes*. Como testemunha foram utilizados ovos e lagartas de *S. frugiperda* suscetível à esta proteína. Para determinar o tempo de busca foi utilizado um cronômetro disparado até a captura da primeira presa e a capacidade de predação através da contagem das presas remanescentes após 24 horas. Para o experimento de avaliação de injúrias foram utilizados o milho TC1507 e o milho convencional isogênico TC1507 como controle, combinando-se o milho Bt ou convencional com cinco lagartas e um predador *O. insidiosus* e/ou *D. luteipes* por planta. As injúrias foram avaliadas 7, 14 e 21 dias após a infestação de lagartas com escala de injúrias com notas de um a cinco. Verificou-se que as lagartas sequestraram Cry1F expressa no milho Bt e os adultos transferiram para os ovos. Quando ambos os sexos foram expostos à proteína, maior foi a quantidade de proteína detectada nos ovos. A quantidade de Cry1F detectada nos ovos diminuiu quando apenas um dos pais foi exposto. Os predadores não foram capazes de distinguir entre presas resistentes ou suscetíveis nos dois estádios avaliados (ovos e lagartas) considerando o tempo de busca e o consumo. Quanto às injúrias, onde havia a presença dos predadores a nota foi significativamente menor do que na ausência. Assim, na presença dos predadores observaram-se menores injúrias da lagarta mesmo quando essa era resistente à proteína Cry1F, podendo ser, portanto ferramentas para o manejo da resistência desta praga.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho. Manejo da resistência de insetos. Controle biológico.

GENERAL ABSTRACT

One of the main problems with the use of Bt is the ability of target insects to evolve resistance to toxic proteins, in addition the potential risk to non-target organisms. Therefore the goal of this work was evaluate the transfer of the Cry1F protein present in Bt maize to *Spodoptera frugiperda* descendants, as well as this protein action in predation capacity and efficiency of *Orius insidiosus* e *Doru luteipes*, assessing the compatibility of these entomophagous agents use for *S. frugiperda* resistant to the protein Cry1F. Resistant and susceptible neonates larvae to the protein Cry1F, were fed with non-Bt maize for ten days, and after that with Bt TC1507® maize, which expresses the Cry1F protein until the end of the larval development phase. Four treatments were studied a) Resistant larvae to the Cry1F protein with both sex exposed to the same protein, b) Resistant larvae with only the male exposed to Cry1F, c) Resistant larvae with only the female exposed to Cry1F, and g) susceptible larvae non-exposed to the protein, acting as control treatment. Detection and quantification of the Cry1F protein was performed by the Elisa test according to the Agdia® Kit protocol. The search time and capacity of predation of *S. frugiperda* eggs resistant to Cry1F protein were determined for nymphs of first, third and fifth instars for *O. insidiosus* and first, third and fourth for *D. luteipes*. For the evaluation of neonates were determined for nymphs of third and fifth instars for *O. insidiosus* and third and fourth for *D. luteipes*. As control, eggs and larvae of the susceptible *S. frugiperda* were used. To determine the search time, a triggered timer was used until the capture of the first prey and the predation capacity by counting the remaining prey after 24 hours. For the injury evaluation experiment, the maize TC1507 and the isogenic conventional maize TC1507 were used as control, matching the Bt or conventional maize with five neonates larvae and one predator *O. insidiosus* and/or *D. luteipes* per plant. The injuries were assessed 7, 14 e 21 days after larvae infestation, with scale of injuries with notes from one to five. Larvae were found to uptake Cry1F expressed in Bt maize and transferred it into the eggs. When both parents were exposed to the protein, the amount of protein identified in the eggs was higher. The amount of Cry1F detected in the eggs was smaller when just one parent was exposed. The predators were not able to distinguish between resistant preys or susceptible preys on the two evaluated phases (eggs and larvae) considering search time and consume. As for the injuries, where there was predator presence, the grade was significantly smaller than in the absence. Therefore, the use of predators promoted a decrease of larvae injury even when it was resistant to the Cry1F protein, being, this way, an instrument for resistance pest management.

Key-words: Fall armyworm. Insect resistance management. Biological control.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Lagarta-do-cartucho do milho (<i>Spodoptera frugiperda</i>) (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).....	13
2.2 Milho Bt.....	14
2.3 Resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a proteína Cry1F.....	16
2.4 Predador <i>Orius insidiosus</i> (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae)....	18
2.5 O Predador <i>Doru luteipes</i> (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forticulidae).....	19
2.6 Transferência Transovariana.....	20
2.7 Compatibilidade de culturas geneticamente modificadas (Bt) com o controle biológico.....	22
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
SEGUNDA PARTE-ARTIGOS.....	37
ARTIGO 1- SEQUESTRO E TRANSFERÊNCIA DA PROTEÍNA CRY1F ENTRE GERAÇÕES DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> (SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i>	42
2.2 Detecção e quantificação da proteína Cry1F nos ovos de <i>S. frugiperda</i>	43
2.3 Análises Estatísticas.....	44
3 RESULTADOS.....	45
4 DISCUSSÃO.....	50
5 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ARTIGO 2- COMPORTAMENTO DE PREDACÃO DE <i>ORIVS INSIDIOSUS</i> (SAY, 1832) (HEMIPTERA: ANTHOCORIDAE) E <i>DORU LUTEIPES</i> (SCUDDER, 1876) (DERMAPTERA: FORTICULIDAE) SOBRE LAGARTA-DO-CARTUCHO RESISTENTE À PROTEÍNA BT CRY1F.....	59
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
1 INTRODUÇÃO.....	62
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1 Criação dos insetos.....	65
2.2 Tempo de busca e capacidade de predação.....	65
2.3 Injúria causada por <i>S. frugiperda</i> resistentes em milho Bt com e sem predadores.....	67
2.4 Análises Estatística.....	68
3 RESULTADOS.....	69
3.1 Tempo de busca e capacidade de predação.....	69
3.2 Injúria causada por <i>S. frugiperda</i> resistentes em milho Bt com e sem	

	predadores.....	70
4	DISCUSSÃO.....	73
5	CONCLUSÕES.....	78
6	REFERÊNCIAS.....	79
	Anexo.....	85

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os fatores que contribuem para redução da produção em lavouras de milho, o ataque de pragas é um dos mais importantes. Entre as pragas pertencentes à ordem Lepidoptera, encontra-se a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), considerada a principal praga da cultura, com potencial de redução da produção em até 34% (CRUZ; MENDES; VIANA, 2012).

A sua alta incidência em várias regiões do país provocou a dependência de inseticidas organo-sintéticos, que foi a principal forma de controle, levando à seleção da resistência à maioria destes produtos químicos até a primeira década desse século (CARVALHO et al., 2013). No entanto, a partir da safra 2008/2009, uma nova estratégia para o manejo integrado de pragas (MIP) com a utilização do milho Bt que, pouco tempo após a liberação, se tornou a principal estratégia de controle no Brasil (STORER et al., 2010, 2012). A proteína tóxica presente no milho transgênico (Bt) é extraída da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que na esporulação produz inclusões de cristais inseticidas que são formadas por proteínas inseticidas chamadas Cry ou Cyt (BRAVO et al., 2011). Estas proteínas tóxicas atuam no tecido epitelial do tubo digestivo dos insetos, causando o desequilíbrio osmótico das células do intestino, reduzindo a alimentação desses insetos e os levando a morte (ALI et al., 2010). No entanto, desde 2014 tem sido registrado um dos principais problemas da utilização da tecnologia Bt que é a capacidade dos insetos alvo evoluírem resistência às proteínas tóxicas, além da possibilidade de atingir organismos não alvo à tecnologia.

No Brasil cultivam-se lavouras Bt durante todo o ano, concomitantemente, ou em áreas adjacentes e com muitas sucessões por ano. Com isto, a expressão contínua de genes *cry* em plantas transgênicas e com a baixa adesão da área de refúgio, exerce forte pressão de seleção para resistência em populações de pragas alvo (HORIKOSHI et al., 2016a).

Nesse sentido foram relatados casos de resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa em milho por Farias et al. (2014) no Brasil, por Storer et al. (2010) em Porto Rico e Huang et al. (2014) nos EUA. É crescente a demanda por estudos com insetos resistentes às proteínas presentes em plantas Bt, para aumentar o nível de compreensão da complexidade da interação com o ambiente, e para subsidiar novas estratégias de manejo de resistência de insetos (MRI) e MIP.

A cultura do milho abriga não somente os insetos-praga, mas também, vários outros insetos benéficos que desempenham importantes funções como inimigos naturais de pragas. A interação entre esses insetos resistentes e o controle biológico pode ser chave para o manejo

de pragas em campo. Portanto, se faz necessário realizar estudos com proteínas presentes no milho Bt em pragas e seus inimigos naturais, para garantir segurança no manejo integrado de pragas.

Predadores e parasitoides podem estar expostos às proteínas Bt expressas em plantas quando se alimentam de herbívoros que podem conter a proteína, ou pelo consumo de pólen ou exsudatos de plantas (LI et al., 2015). Apesar dos diferentes hábitos alimentares e funções ecológicas das espécies que vivem na lavoura do milho e são expostos a proteína, um dos papéis mais importantes é o controle de insetos-praga feito pelos inimigos naturais, sendo a predação uma das interações ecológicas mais importantes na estabilidade do agroecossistema (SCHRIJVER et al., 2016). Os predadores *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae) e *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forficulidae) ocorrem com frequência na cultura do milho no Brasil, contribuindo para o controle da lagarta-do-cartucho (PICANÇO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2003; FIGUEIREDO; DIAS; CRUZ, 2006; MENDES et al., 2012b).

No Brasil, a espécie do gênero *Orius* mais abundante e de maior potencial para utilização em programas de controle biológico é *O. insidiosus*. Esta espécie é um voraz predador generalista em todas as suas fases de desenvolvimento. Outro fator que o faz um potencial agente em programas de controle biológico é a facilidade de criação em massa (MENDES et al., 2012a; SILVEIRA; BUENO; VAN LENTEREN, 2004). Na cultura do milho, este predador é atraído por voláteis emitidos pela planta e assim são conduzidos a possíveis locais que tenham ovos dos principais lepidópteros pragas do milho como *S. frugiperda*, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabr, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) o que ajuda no forrageamento e conseqüentemente na eficiência do controle (ALDRICH et al., 2007).

A tesourinha *D. luteipes* tem se mostrado um eficiente predador da lagarta-do-cartucho do milho (REIS et al., 1988; CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995; PICANÇO et al., 2003; GUERREIRO et al., 2005; CRUZ, 2007; PASSINI et al., 2010; ARAÚJO et al., 2011). Por ser uma espécie de clima tropical e possuir maior importância no Brasil, é importante que se tenha maiores informações da sua função como inimigo natural da lagarta-do-cartucho em milho Bt.

Mesmo que seja amplamente aceito que as proteínas Cry podem ser transferidas a cadeia trófica (ANDOW; LOVEI; ARPAIA, 2006; ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006; PAULA et al., 2016; SCHRIJVER et al., 2016; SHELTON et al., 2016), continua a haver uma grande incerteza sobre como ocorre a transferência. Uma maneira possível que uma presa

pode transferir proteína Cry, é ter esta proteína em seus tecidos corporais (FERRY et al., 2007). Vários insetos da ordem Lepidoptera são capazes de absorverem metabólitos secundários de plantas e transferirem para os ovos como forma de defesa dos inimigos naturais (NAHRSTEDT; DAVIS, 1985; RAUBENHEIMER, 1989). Apesar do maior peso molecular das proteínas Cry em relação a estes metabólitos esta absorção foi provada por Paula et al. (2104) através da passagem transovariana da proteína Bt, para a espécie *Chlosyne lacinia* (Geyer, 1837) (Lepidoptera: Nymphalidae), contudo não existem estudos nesse sentido para *S. frugiperda* e compreender essa questão pode auxiliar a entender os mecanismos envolvidos na seleção da resistência por essa espécie, além das implicações das interações tróficas que esta passagem pode resultar.

Agentes de controle biológico interagem funcionalmente com culturas GM, mas isso muitas vezes não é facilmente medido, mas são potencialmente importantes para as interações destas tecnologias nos sistemas de manejo integrado de pragas (LUNDGREN et al., 2009). O conhecimento das várias vias através das quais os inimigos naturais estão expostos a estas proteínas podem informar mais seguramente quais os possíveis efeitos deletérios de culturas GM em organismos não alvo. Contudo, estudos dos impactos da proteína para as espécies *O. insidiosus* e *D. luteipes* ainda são incipientes e não retratam a dimensão das interações tróficas das espécies e as possibilidades da utilização dos predadores como agente de controle biológico no milho, sobretudo diante da possibilidade da proteína passar entre os níveis tróficos.

Agentes de controle biológico podem atrasar o aparecimento da resistência à tecnologia Bt em insetos alvo e prolongar a vida da mesma (LEITE et al., 2014). Identificar e compreender as interações predador-praga e como o milho Bt interage com organismos não alvo através de suas presas é fundamental para avaliar a compatibilidade de controle biológico em culturas GM, oferecendo oportunidades para a integração destas duas estratégias eficazes e sustentáveis no MIP (LUNDGREN et al., 2009).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a transferência da proteína Cry1F presente no milho Bt para os descendentes de *S. frugiperda*, bem como a ação dessa proteína na capacidade e eficiência de predação de *O. insidiosus* e *D. luteipes*, avaliando a compatibilidade do uso desses agentes entomófagos com espécimes de *S. frugiperda* resistentes à proteína Cry1F expressa em milho Bt.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Entre as pragas pertencentes á ordem Lepidoptera, a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada uma praga-chave na cultura do milho, possui distribuição geográfica generalizada, causando danos durante praticamente todas as fases do seu desenvolvimento (DEQUECH et al., 2013). A lagarta-do-cartucho é um inseto que possui metamorfose completa (holometabolía), passando pelas fases de ovo, larva (lagarta), pupa (crisálida) e adulta. Essa espécie foi identificada como praga do milho em 1797, na Geórgia, Estados Unidos, inicialmente nomeada *Phalaema frugiperda*. Desde então, mudou de nome várias vezes, até a denominação atual (CRUZ, 1995).

O inseto adulto é uma mariposa com aproximadamente de 3,5 cm de comprimento, coloração pardo-escura nas asas anteriores e branco-acinzentada nas posteriores com longevidade de aproximadamente 15 dias (SANTOS et al., 2004). As posturas são feitas em massa, com média de 150 ovos. O período para eclosão das larvas é de aproximadamente três dias.

As larvas recém-eclodidas alimentam-se da própria casca do ovo e, posteriormente das folhas da planta, provocando o sintoma conhecido como “folhas raspadas”, o que é um sintoma da presença da lagarta na cultura. As lagartas passam por cinco ou seis estádios larvais, atingindo 40 a 50 mm de comprimento e 2,7 a 2,78 mm de largura da cápsula cefálica. À medida que as lagartas crescem, começam a fazer orifícios nas folhas, podendo causar severas injúrias às plantas. É comum também o ataque na base da espiga ou nos grãos leitosos (CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995). A duração da fase larval é de 12 a 30 dias. Após este período as lagartas se direcionam para o solo onde passarão à fase de pupa, que dura entre de 10 a 12 dias. O ciclo biológico desse inseto em plantas de milho completa-se em 25 dias à temperatura de 25°C, aumentando o número de dias quando as temperaturas estão mais baixas (BUSATO; GRUTZMACHER; GARCIA, 2005a; BUSATO; GRUTZMACHER; GARCIA, 2005b).

As perdas no milho podem variar de acordo com a fase de desenvolvimento da planta, onde a infestação ocorre, práticas de cultivo, presença da praga em áreas adjacentes, entre outros (CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995). Condições tropicais de cultivo aliadas a carecterística de grande polifagia da espécie, alta capacidade de reprodução e alta dispersão

do adulto (NAGOSHI; MEAGHER, 2008), favorecem a ocorrência de gerações sobrepostas ao longo do ano, levando a graves infestações em safra agrícola (BERNARDI et al., 2015). Para o manejo da lagarta do cartucho, a presença de inimigos naturais é de extrema relevância para seu controle (FIGUEIREDO; DIAS; CRUZ., 2006). No entanto diversos inseticidas são registrados para o controle da lagarta-do-cartucho, só em milho em 2017, 185 produtos estão registrados (Agrofit, 2017). Com isto para o manejo, devem ser priorizados aqueles seletivos, que não afetem os organismos não alvo (CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995). Para que seja possível a utilização de inimigos naturais para auxiliar no controle, e também o uso de híbridos Bt, para adequar uma estratégia de manejo integrado de pragas, que visa a integração de diferentes métodos de controle com base nos parâmetros econômicos, ecológicos e sociais.

A principal tática de controle de *S. frugiperda* envolve o uso de híbridos de milho transgênicos que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), mas por ter oferta do hospedeiro continuamente faz com que acelere a seleção de populações resistentes aos genótipos Bt (STORER et al., 2010, 2012), um aspecto que está comprometendo a gestão das espécies de pragas e custos de produção. Portanto a correta utilização desta tecnologia, assim como estratégias sustentáveis não poluentes são desejáveis, o manejo só é possível pelo uso conjunto de várias estratégias de controle. Neste contexto, a busca por utilização de métodos de controle combinados tornou-se uma necessidade iminente para manejo integrado de pragas (ANSANTE et al., 2015).

2.2 Milho Bt

A introdução da tecnologia dos transgênicos tem contribuído para uma mudança na redistribuição da importância econômica das espécies-pragas no milho. O alvo das cultivares de milho Bt no Brasil são as lagartas, principalmente a lagarta-do-cartucho (CRUZ; MENDES; VIANA, 2012).

O milho Bt expressa uma ou mais proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Essas proteínas possuem atividade inseticida contra os insetos alvo e são sintetizadas através dos genes *cry*, *vip* e *cyt*. Atualmente já foram liberados comercialmente no Brasil 37 eventos de milho Bt com tolerância a herbicida e/ou resistência à insetos (Tabela 1 em anexo).

A inserção da toxina se dá de forma rápida e irreversível, levando à formação de poros líticos nas microvilosidades da membrana apical (ARONSON; SHAI, 2001; BRAVO et al., 2007). Posteriormente ocorre a lise celular e, muito provavelmente, resulta na permeabilidade

seletiva de cátions. Ocorre então a ruptura do epitélio do intestino médio, liberando o conteúdo da célula, fornecendo um meio com esporos germinando e como consequência uma septicemia grave (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007) e/ou levando a paralisia do intestino, cessando a alimentação e como consequência a morte por inanição, o que ocorre geralmente após 1-3 dias (ALI et al., 2010).

Como os efeitos potenciais das culturas GM no ambiente e, particularmente, sobre organismos não alvo, são um assunto de grande preocupação, a avaliação de segurança tornou-se obrigatória na maioria dos países onde culturas GM estão registradas para o cultivo (ROMEIS et al., 2011). É necessário monitoramentos e estudos sobre a presença destes organismos como os inimigos naturais em milho Bt (COSTA, 2011).

O primeiro evento de milho transgênico foi liberado para uso comercial no Brasil em 2008 (CTNBio, 2016). Atualmente, culturas de milho Bt são plantadas em aproximadamente 12 milhões de hectares por ano, o que representa mais de 80% da área total do cultivo de milho no Brasil (CÉLERES, 2016). As principais vantagens de sua utilização são redução das perdas causadas por pragas e da aplicação de inseticidas, favorecendo a manutenção de inimigos naturais. Estes auxiliam no controle de pragas e contribuem para retardar a evolução da resistência, além de melhorar a rentabilidade do sistema produtivo, utilizando plantas resistentes a insetos com o máximo de eficiência (LOURENÇÃO; FERNANDES, 2013). Além da facilidade na logística dos tratamentos culturais, sobretudo em grandes áreas de cultivo. Por outro lado, problemas como a seleção de populações resistentes à tecnologia tem se mostrado como um dos principais problemas ligados ao milho Bt (HORIKOSHI et al., 2016b). No Brasil, cultivares transgênicas de algodão, milho e soja resistentes a pragas e/ou tolerantes a herbicidas são disponibilizadas após longos estudos e testes. A aprovação das culturas GM é feita pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que é responsável por prestar apoio técnico consultivo ao governo federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a organismos geneticamente modificados (OGM) bem como estabelecer normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (CNTBio, 2016). As aprovações fazem avaliações caso a caso, isso é importante porque para cada organismo o efeito pode ser diferente, além disso, o mesmo organismo em outro ambiente com grandes variações, o risco pode não ser o mesmo (PIRES; SUJII; FONTES, 2003).

2.3 Resistência de *Spodoptera frugiperda* a proteína Cry1F

Com a alta adoção de culturas GM, a exposição prolongada a proteínas Bt no campo sem gestão adequada e a falta de adoção da área de refúgio pode levar à resistência em populações de pragas. O risco potencial para a evolução da resistência é alta para *S. frugiperda* porque o sistema de produção no Brasil tem sobreposição temporal e espacial do milho Bt. No campo estas culturas expostas à população de *S. frugiperda*, a pressão de seleção é intensa em cada geração da praga, aumentando o risco de seleção de indivíduos resistentes (BERNARDI et al., 2014). A resistência é um processo natural na evolução, isto ocorre por características genéticas onde o organismo seleciona a resistência e são capazes de sobreviverem à proteína tóxica expressa na planta e esta característica é transferida para os seus descendentes (BERNARDI et al., 2016). O gene que confere resistência pode estar presente em uma população de insetos, com isto é natural que alguns indivíduos apresentem diferentes reações as proteínas conferindo suscetibilidade ou resistência à determinada proteína devido a forte pressão de seleção imposta no campo, o que aumenta a frequência de indivíduos resistentes ao longo de gerações (TABASHNIK, 2008).

A resistência da *S. frugiperda* à proteína Cry1F foi verificada no Brasil por Farias et al. (2014), esta proteína está presente no milho TC1507 utilizado no Estados Unidos desde 2003 e no Brasil foi liberado em 2008 e utilizado no campo a partir da safra 2009/2010 pela empresa Dow AgroSciences Industrial Ltda (STORER et al., 2012). A resistência da lagarta-do-cartucho à proteína Cry1F foi verificada também por Storer et al., (2010) em Porto Rico e na região litorânea dos EUA por Huang et al., (2014) onde os autores sugerem que pode ter sido pela migração de populações resistentes de Porto Rico através de outras ilhas do Caribe para a Flórida.

A lagarta-do-cartucho possui grande risco de seleção de resistência devido ao sistema de cultivo no Brasil, a chamada ponte verde, onde são disponíveis diferentes hospedeiros durante a maior parte do ano. Como *S. frugiperda* além de ser polífaga, tem grande capacidade reprodutiva, e as proteínas presentes nas diferentes culturas muitas vezes são as mesmas, e a baixa adoção da área de refúgio facilita a seleção da resistência no campo (BERNARDI, et al., 2016).

Esta praga não é a única que selecionou a resistência à proteínas Cry. Outros casos já foram registrados como, *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte, 1868) (Coleoptera: Chrysomelidae) à proteína Cry3Bb1 no milho, nos EUA (GASSMANN et al., 2011), *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1843) (Lepidoptera: Gelechiidae) à proteína Cry1Ac no

algodão, na Índia (DHURUA; GUJAR, 2011), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac no algodão nos EUA (ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006), também à mesma proteína na China, a *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), (LIU et al., 2010) e *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ab no milho, na África do Sul, (VAN RENSBURG, 2007).

Para prolongar a eficácia de culturas Bt como o milho, é essencial desenvolver uma gestão estratégica para atrasar a evolução da resistência de pragas a proteínas Bt. Uma das principais estratégias é a chamada alta dose juntamente com a área de refúgio atrasando a evolução da resistência. Mas para isso, é necessário que a resistência seja recessiva, para que os indivíduos suscetíveis presentes na área de refúgio ao acasalarem com os possíveis raros resistentes na área de plantio de milho Bt, gerem indivíduos suscetíveis, diminuindo a pressão de resistência (CARROLL; HEAD; CAPRIO, 2012; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013).

Outra maneira de manejo de resistência é com a introdução de eventos piramidados que é a combinação de diferentes genes em um só híbrido. As proteínas VIP3A, por exemplo, possuem características importantes como ser resistentes a insetos em que a proteína Cry não faz efeito (ESTRUCH, et al., 1996; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013). Além disso, segundo estudos realizados, possuem sítios de ação diferentes da proteína Cry (LEE et al, 2006; GOUFFON et al, 2011; CHAKROUN; FERRÉ, 2014). Portanto, são interessantes para complementar as proteínas Cry em culturas Bt, ampliar o espectro inseticida e para fins de manejo da resistência.

A evolução da resistência em populações de pragas de insetos alvo pode prejudicar muito os benefícios econômicos e ambientais dos transgênicos Bt (FARIAS et al., 2014). Segundo Lourenção e Fernandes (2013), mesmo mostrando resistência da lagarta-do-cartucho às proteínas Cry1Ab e Cry1F, híbridos expressando essas tecnologias efetuaram controle desta praga, a produtividade foi maior em relação as suas isolinhas e os custos de produção foram semelhantes aos observados em híbridos convencionais sob o manejo com inseticida químico. Como é conhecido, essa espécie possui o que chamamos de haplótipos ou raças (SOUZA et al., 2015). Assim efeito diferenciado dos eventos pode ser esperado em diferentes regiões do país.

A caracterização da resistência de *S. frugiperda* em Porto Rico mostrou ser autossômica e incompletamente resistente. Os autores sugerem que a resistência foi devido a alterações no sítio de ligação no intestino médio (STORER et al., 2010). A resistência relatada por Farias et al. (2014) no Brasil também mostrou ser autossômica e com resistência

completamente recessiva. Esta diferença pode ser explicada pelos diferentes procedimentos na realização dos bioensaios.

Estudos dos mecanismos de resistência têm sido realizados com diferentes fatores, como diferença no modo de ação de proteínas Cry e ligação das proteínas Cry aos receptores (JURAT-FUENTES et al. 2004; FERRÉ; VAN RIE, 2002). Mutações nos genes receptores das proteínas Cry é a principal forma de resistência em Lepidoptera: Noctuidae (TABASHNIK et al., 2003). No entanto, como existem vários fatores para a evolução da resistência, os estudos sobre os mecanismos de resistência devem ser feitos caso a caso e as estratégias de MRI devem ser adaptadas, uma vez que os efeitos podem variar com a cultura, o ambiente, a proteína presente e a fauna associados a esta cultura (FONTES; PIRES; SUJII, 2003; PETERSON; BEZUIDENHOUT; VAN DEN BERG, 2017).

2.4 Predador *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae)

A família Anthocoridae (Hemiptera: Heteroptera) possui cerca de 500 espécies. Entre os vários gêneros que compõem esta família, o *Orius* contém aproximadamente 70 espécies distribuídas mundialmente em diversas culturas. Este gênero é constituído de predadores de pequenos artrópodes como tripes, ácaros, mosca-branca, pulgões e ovos de lepidópteros (BUENO, 2000).

Predadores generalistas são mundialmente conhecidos por sua capacidade de controlar insetos fitófagos e ácaros em muitas culturas cultivadas (SYMONDSON; SUNDERLAND; GREENSTONE, 2002; BIONDI et al., 2012). O predador *Orius insidiosus* possui alta eficiência de busca, habilidade para aumentar a população e se agregar rapidamente quando a oferta de presas é alta, mas também consegue sobreviver em baixa densidade populacional de pragas porque pode se alimentar também de pólen, e presas alternativas. E mesmo com a presença de flores com pólen, a predação não é diminuída (MOSCARDINI et al., 2013). Este fato se faz importante para sua utilização, pois é capaz de sobreviver e se reproduzir mesmo quando a população de pragas não for alta, e quando for, aumentará sua população controlando a praga (WONG; FRANK, 2013). Portanto estas características os tornam promissores agentes de controle biológico.

No Brasil, a espécie do gênero *Orius* mais abundante e de maior potencial para utilização em programas de controle biológico é *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae). Esta espécie é um voraz predador generalista em todas as suas fases de desenvolvimento. Outro fator que faz *O. insidiosus* um agente utilizável em programas de

controle biológico, é a facilidade de criação em massa (MENDES et al., 2012a; SILVEIRA; BUENO; VAN LENTEREN, 2004). Na cultura do milho, este predador é atraído por voláteis emitidos pela planta e assim são conduzidos a possíveis locais que tenham ovos dos principais lepidópteros pragas do milho *S. frugiperda*, *H. zea* e *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae, o que ajuda no forrageamento e conseqüentemente na eficiência do controle (ALDRICH et al., 2007).

O gênero *Orius* spp. representa mais de 40% do total de espécies predadoras presente no milho (ALBAJES; LÓPEZ; PONS, 2003). Em um levantamento da incidência de organismos não alvo em milho Bt, Mendes et al. (2009), encontraram o *O. insidiosus* como um dos predadores mais abundantes. A densidade de *Orius* spp. foi mais elevada em parcelas de milho Bt, em comparação com suas isolinhas, tal como observado por Pons et al. (2005); Jasinski et al. (2003); Musser; Shelton, (2003); De La Poza et al. (2005). Estes estudos comprovam a alta incidência deste predador na cultura do milho Bt, mostrando ser um importante agente no controle biológico de pragas no cultivo de milho Bt.

As interações ecológicas, incluindo as relações toxicológicas, entre agentes de controle biológico como *O. insidiosus* e culturas GM como o milho Bt, tornam-se então importantes para as discussões relativas à compatibilidade dessas culturas com as estratégias de MIP. Embora os impactos de campo das culturas GM no controle biológico são difíceis de prever, eles são uma consideração fundamental ao incorporar as culturas GM em sistemas de manejo de pragas juntamente com o controle biológico (LUNDGREN et al., 2009).

2.5 O predador *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forticulidae)

Estudos com o predador *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forticulidae) tem demonstrado que este é um eficiente inimigo natural da lagarta-do-cartucho e outras pragas do milho se alimentando de seus ovos e lagartas pequenas, chegando a comer uma média de 8276 ovos de *H. zea* ao longo do seu ciclo de vida, aproximadamente 39 ovos por dia, e 3.832 pulgões *Schizaphis graminum* nos dois primeiros meses de vida (CRUZ, 2007). Uma fêmea de *D. luteipes* coloca em média 25 ovos, este inseto possui o ciclo de vida longo e a longevidade do adulto pode chegar a até quase um ano (CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995).

O milho possui condições ideais para permanência do predador em campo durante todo o ano em cultivos Bt e não Bt, e sua presença pode deixar o milho fora do nível de dano econômico. Suas posturas são feitas no cartucho e nas espigas, locais onde se encontram os

lepidópteros-praga mais importantes do milho, lagarta-do-cartucho e lagarta-da-espiga, além de proporcionar alimento alternativo como o pólen (FIGUEIREDO; DIAS; CRUZ 2006; PASSINI; PARRA; LOPES, 2007; ARAÚJO, et al., 2011).

Estudos sobre sua biologia foram realizados nas décadas de 80 e 90 (REIS, et al., 1988; CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995). Este tipo de estudo bem como as condições ótimas de criação de um inimigo natural são procedimentos necessários para a utilização em um programa de controle biológico. Entre as temperaturas testadas para criação de *D. luteipes* a de 25°C foi a ideal (HONÉK, 1996; PASINI et al., 2010).

Atualmente o milho Bt é o mais utilizado, mas pela seleção de resistência pelos insetos praga, a integralização de diferentes métodos de controle é almejado. O inseticida Triflumurom (24 g i.a. ha⁻¹) foi o mais seletivo para *D. luteipes* entre os testados por REDOAN et al., (2013), e os inseticidas cholorantraniliprole e etofenprox foram os mais promissores devido a baixa toxicidade para *D. luteipes* (CAMPOS et al., 2011). Além disso, a ação conjunta de produtos biológicos como bioinseticidas à base de entomopatógenos deve ser fomentada ou o controle biológico através de entomófagos juntamente com cultivos Bt, seriam mais compatíveis com o ambiente e os organismos não alvo. A resistência induzida da planta através da aplicação de silício no milho favoreceu a ocorrência de *D. luteipes* (ANTUNES et al., 2010). O *Baculovirus spodoptera* utilizado na cultura do milho juntamente com o predador *D. luteipes* proporcionaram um bom controle de *S. frugiperda*, reduzindo o dano foliar (CRUZ et al., 2009).

No entanto, são necessários mais estudos das diferentes formas de interação entre inimigo natural e o milho Bt. A maioria dos trabalhos realizados com milho Bt e o predador *D. luteipes* são avaliações da abundância destes predadores em milho Bt comparados com não Bt (CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995; PIKANÇO et al., 2003; FIGUEIREDO; DIAS; CRUZ, 2006; ARAÚJO et al., 2011; FRIZZAS et al., 2014; RESENDE et al., 2016). Assim trabalhos sobre a interação planta-presa-predador, assim como estudos comportamentais deste predador da lagarta-do-cartucho em milho Bt, sobretudo lagartas resistentes para avaliar possíveis impactos são necessários, uma vez que um dos maiores problemas do milho Bt é a seleção da resistência.

2.6 Transferência Transovariana

Os insetos podem sequestrar metabólitos de plantas que se deposita em tecidos ou glândulas do organismo que absorveu este produto. Estes compostos são absorvidos através

da membrana peritrófica do mesêntero, transportados através da hemolinfa e depositados no corpo gorduroso onde formam corpos multivesiculares dentro dos trofócitos. O corpo gorduroso tem a função de sintetizar, armazenar e mobilizar glicogênio, lipídeos e proteínas. (LOCKE; COLLINS, 1968; DUFFEY, 1980; TELFER; KUNKEL, 1991; HEGEDUS et al., 2009). Por exemplo, *Utetheisa ornatix* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebididae) sequestra alcaloides de plantas na fase larval e ambos os sexos na fase adulta transferem para os ovos como forma de proteção contra predadores (DUSSOURD, et al., 1988).

Pratissoli, et al. (2004), verificaram que fêmeas de *S. frugiperda* na fase adulta ao se alimentar de solução contendo o inseticida químico Lufenuron, teve ação transovariana. Afetou consideravelmente a viabilidade de ovos em relação a testemunha. O mesmo foi verificado para *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), quando os casais se alimentaram de folhas de feijão tratadas com Lufenuron apresentaram considerável redução da fecundidade consideravelmente em relação aos casais que não ingeriram o regulador de crescimento. Os autores sugerem que o produto ingerido pela fêmea, foi através da passagem transovariana para o embrião, afetando o seu desenvolvimento e impedindo a eclosão das larvas (ÁVILA; NAKANO, 1999).

Quando a proteína ou o composto ingerido vai da hemolinfa para o corpo gorduroso nos trofócitos, então se dá a passagem para os ovos, uma vez que os trofócitos são células que desempenham função na vitelogenia, neste processo a proteína pode ser depositada nos ovos (CRUZ-LANDIM, 1983; RAIKHEL; LEA, 1986; RAIKHEL; DHADIALLA, 1992).

Apesar das proteínas Cry possuírem maior peso molecular do que normalmente alguns metabólitos de plantas sequestrados por Lepidópteros possuem, esta absorção foi observada por Paula et al. (2014) pela passagem transovariana da proteína Cry1Ac para a espécie *Chlosyne lacinia* (Geyer, 1837) (Lepidoptera: Nymphalidae), que é um inseto-praga na cultura do girassol e não alvo em algodão. Este sequestro foi demonstrado também no predador *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) ao se alimentar do pulgão *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) que ingeriu a proteína Cry1Ac e Cry1F (PAULA; ANDOW, 2016). Em um trabalho semelhante, foi possível detectar as proteínas Cry1Ac e Cry1Ab em *Propylaea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae) que se alimentaram de *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (Hemiptera: Aphididae) alimentados com estas proteínas, e a quantidade aumentou à medida que o período de predação foi maior (ZHANG, et al., 2006). Compreender essa questão pode auxiliar a entender os mecanismos envolvidos na seleção da resistência por espécies alvo, além das implicações das interações tróficas que esta passagem pode resultar.

2.7 Compatibilidade de culturas geneticamente modificadas (Bt) com o controle biológico

O interesse mundial em produção agrícola sustentável reforçou a importância da conservação da biodiversidade e do agroecossistema, através da utilização de organismos benéficos para a proteção fitossanitária. (TALEBI; KAVOUSI; SABAHI, 2008; TAVARES; WANG; HOOKS, 2015).

A agricultura causa impacto ambiental pela remoção da vegetação nativa e implementação de outra, simplificando o ambiente. Com isto um dos impactos causados é o surgimento de pragas. Dentre estas, se destacam os insetos, que possuem sucesso habitacional, vivem praticamente em todos os locais e se adaptam facilmente às diversidades ambientais. Portanto, há necessidade de controle de populações de insetos praga de forma eficiente e sustentável (MACHADO, 2009).

Inimigos naturais como predadores e parasitoides fornecem um serviço essencial na conservação do controle biológico de pragas que mantém a estabilidade e resistência dos ecossistemas agrícolas, proporcionando benefícios ambientais, de saúde e econômicos diretos e indiretos para os agricultores e para a sociedade (ZHANG et al, 2007; BIANCHI; BOOIJ; TSCHARNTKE, 2006; ÖSTMAN; EKBOM; BENGTSSON, 2003; STALLMAN; JAMES JR, 2015).

Em um experimento realizado para avaliar os danos causados por *S. frugiperda* protegida da ação dos inimigos naturais e em situação de livre acesso dos inimigos naturais, FIGUEIREDO; DIAS; CRUZ (2006) verificaram que com a ausência destes organismos o dano foi muito maior, chegando á mais de 50% de perda no rendimento de grãos e 48% de perda de matéria seca, A demanda pública e preferência de consumidores para encontrar soluções com base em controle biológico é um dos principais motivos para o crescimento da utilização de inimigos naturais no controle de pragas (ROMEIS et al., 2008). Contudo, o controle biológico deve ser considerado como um dos pilares de sustentação do MIP. Diante disso, além do controle biológico, outras formas de controle devem ser implementadas. Atualmente a principal forma de controle da lagarta-do-cartucho e outros lepidópteros-praga do milho é através do milho Bt. Diante disto, os efeitos potenciais das culturas GM no ambiente e, particularmente, sobre organismos não alvo, ainda são um assunto de grande preocupação e que deve ser considerada caso a caso. A avaliação de segurança tornou-se obrigatória na maioria dos países onde culturas GM estão registradas para o cultivo (ROMEIS; MEISSLE, 2011). Um organismo não alvo é qualquer indivíduo que possa estar

presente no ambiente da cultura, mas que não tenha a intenção de controlar. Pode ser um inimigo natural, um detritívoro, polinizadores, bem como uma praga secundária da cultura. Isto faz parte da biodiversidade que é de fundamental importância em todas as interações ecológicas, para que o agroecossistema tenha um equilíbrio (FONTES; PIRES; SUJII, 2003).

No entanto, estudar o impacto de culturas GM em organismo não alvo como os inimigos naturais possui uma importância ecológica e econômica pela função que desempenham nas interações tróficas. Portanto, os estudos sobre os potenciais efeitos negativos de plantas Bt em inimigos naturais, foram realizados para avaliar os riscos envolvidos no seu acompanhamento de liberação comercial e pós-mercado (NARANJO, 2009; LOVEI; ANDOW; ARPAIA, 2009). É necessário monitoramentos e estudos sobre a presença destes organismos como os inimigos naturais em plantas Bt (COSTA, 2011). Estes organismos podem ser afetados por culturas GM quando a quantidade, a qualidade ou a adequação nutricional é reduzida. Muitos inimigos naturais necessitam de partes da planta pra suprir suas necessidades nutricionais além das presas, esta é uma forma de exposição direta do organismo não alvo à proteína tóxica expressa na planta, como por exemplo, pólen e néctar. Se o perigo de uma toxina transgênica ou herbicida para um inimigo natural é detectado, então o conhecimento das várias vias através das quais os inimigos naturais estão expostos a estas toxinas podem informar uma avaliação mais precisa dos potenciais efeitos deletérios de culturas GM (HILBECK; SCHMIDT, 2006; ANDOW; LÖVEI; ARPAIA, 2006; SCHRIJVER, et al., 2016).

A avaliação de risco é feita por etapas, primeiramente é realizada em laboratório onde se avalia os efeitos adversos sobre o organismo não alvo. Isto então é estendido para semi-campo para aumentar as condições reais com uma maior complexidade ecológica e reduzindo a generalização, e por fim, em campo para avaliação das consequências dos efeitos adversos (ROMEIS; MEISSLE, 2011). Esse fluxo de estudos preconiza que em testes de laboratório podem ser suficientes desde que não sejam detectados efeitos sobre organismos não alvo em alta dose. (LUNDGREN et al., 2009). Contudo efeitos em campo são possíveis, uma vez que não se estudou o comportamento dos insetos e não se estudou os efeitos sobre a cadeia trófica (Mendes et al., 2012b). Mesmo que a avaliação dos efeitos das proteínas Bt sobre as variáveis biológicas em laboratório e a densidade populacional em campo seja importante, talvez o mais crítico seja os impactos sobre a função do controle biológico como as taxas de predação e parasitismo e efeitos sobre a dinâmica das pragas (TIAN et al., 2015).

Na escolha do inimigo natural a ser estudado neste contexto de risco de culturas GM sobre o organismo, deve-se levar em consideração a importância da espécie na região de

estudo, conhecer bem a espécie alvo para a realização de amostragens e bioensaios corretos, certificar-se de que a proteína realmente está sendo expressa durante o experimento, avaliar variáveis biológicas e comportamentais e comparar com outros métodos de controle como, por exemplo, o químico (PIRES; SUJII; FONTES, 2003).

Duan et al. (2008) elaboraram um banco de dados de 25 estudos de laboratório sobre a abelha, *Apis mellifera*, e uma meta-análise desses estudos revelaram que Proteínas Bt encontradas em culturas resistentes a lepidópteros e coleópteros não teve nenhum efeito sobre a sobrevivência de larvas ou adultos. Alguns estudos têm afirmado que culturas Bt possuem efeitos negativos sobre importantes inimigos, principalmente os parasitoides, mas muito mais estudos demonstraram que as culturas Bt não prejudicam os inimigos naturais (TIAN et al., 2015). No entanto, os poucos trabalhos que mostram algum efeito negativo da proteína Bt em inimigos naturais, não é considerado impactante em comparação com os efeitos de inseticidas organo-sintéticos especialmente os de amplo espectro. Desta forma culturas GM podem ter um efeito positivo quanto a biodiversidade se integrada com outros métodos de controle alternativo ao controle químico (FONTES; PIRES; SUJII, 2003).

Os inimigos naturais são altamente sensíveis á aplicação de inseticidas organo-sintéticos, e influenciam na composição e abundância de espécies benéficas em agroecossistemas (ZHANG et al., 2007; LU et al., 2012; MARTINOU; SERAPHIDES; STAVRINIDES, 2014). Portanto, a manutenção de insetos benéficos pode ser desafiadora quando se utiliza inseticidas de amplo espectro, além de prejudicar o meio ambiente e os organismos não alvo, há uma dificuldade em atingir principalmente pragas que se encontram nas espigas, colmos e até mesmo dentro do cartucho do milho como a *S. frugiperda* através de pulverizações (CRUZ et al., 2009).

A maioria dos trabalhos que relatam risco de culturas GM para os inimigos naturais é a menor abundância no campo. Mas isto é em função do menor número de presas e hospedeiros uma vez que a maioria é controlada pela proteína tóxica expressa na planta (ROMEIS et al., 2006). Para avaliação de efeitos diretos é importante avaliar como o organismo vai ser exposto à proteína tóxica, saber os grupos intraguildd que ocorrem na cultura GM e quais são os mais vulneráveis e expostos às proteínas (ROMEIS et al., 2013). Esta abordagem pode ser válida também para plantas transgênicas baseadas em RNA de interferência (RNAi). Para as plantas RNAi, o conhecimento da sequência do genoma específico que seja alvo é uma informação importante para a seleção de espécies através da bioinformática, para estudos de expressões específicas que seja seguro para os organismos não alvo (DILLES et al., 2013; LI et al., 2013).

Diante da seleção de resistência dos insetos alvo à proteínas tóxicas, vários estudos foram feitos com diferentes proteínas em estudos tri-tróficos realizados com herbívoros resistentes e susceptíveis demonstrando não haver efeitos negativos para o inimigos naturais (TIAN et al., 2012; ROMEIS; MCLEAN; SHELTON, 2013; SHELTON et al., 2016). A presença de inimigos naturais pode retardar a resistência de insetos alvo à culturas Bt, uma vez que estes agentes se alimentam de presas resistentes, diminuindo os alelos de resistência da população (LIU et al., 2014).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lagartas de *S. frugiperda* foram capazes de sequestrar a proteína Cry1F e transferir para os ovos (geração F1). Ambos os sexos viabilizaram o sequestro e transferência da proteína para os ovos, mas quando ambos os pais foram expostos à proteína, maior foi a quantidade identificada nos ovos. A quantidade de Cry1F detectada nos ovos não reduziu para os cinco primeiros dias de postura quando ambos os pais foram expostos à toxina, mas reduziu quando apenas um dos pais foi exposto. A quantidade de Cry1F detectada nos ovos foi menor do que na folha. A quantidade de ovos produzida foi maior no tratamento em que ambos os sexos e somente a fêmea foram expostos à Cry1F, comparado a quando somente o macho foi exposto e ao grupo controle, onde as lagartas suscetíveis não foram expostas à proteína Cry1F.

O fato de a lagarta ser resistente não alterou o comportamento de busca e predação de *O. insidiosus* e *D. luteipes*. A capacidade de predação aumentou com o desenvolvimento do predador. A integração de milho Bt TC1507 com os predadores *O. insidiosus* e *D. luteipes* reduz significativamente as injúrias causadas por *S. frugiperda*, mesmo quando as lagartas são resistentes ao evento. O fato de que quando ambos os sexos quando resistentes transferem maior concentração da proteína para os ovos, mostra que a utilização da área de refúgio e controle biológico pode ser eficiente no manejo da resistência desta lagarta, uma vez que diminuirá a pressão de seleção no embrião quando apenas um dos sexos for resistente. Como ambos os predadores não foram capazes de identificar a proteína nas presas e a nota de injúria foi reduzida na presença deles, estes podem ser utilizados como agentes de manejo de controle e resistência de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT- **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 20 de março de 2017.
- ALBAJES, R.; LÓPEZ, C.; PONS, X. Predatory fauna in corn fields and response to imidacloprid seed treatment. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 6, p. 1805–1813, Dec. 2003.
- ALDRICH, J. R. et al. Semiochemical Investigations of the Insidious Flower Bug, *Orius insidiosus* (Say). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 33, n. 8, p. 1477- 1493, Jun. 2007.
- ALI, S. et al. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture African. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 9, n. 14, Apr. 2010.
- ALI, M. I.; LUTTRELL, R. G.; YOUNG, S.Y. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 1, p. 164- 175, Feb. 2006.
- ANDOW, D. A.; LÖVEI, G.L.; ARPAIA, S. Ecological risk assessment for Bt crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 7 p. 749–751, jul. 2006.
- ANSANTE, T. F. et al. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 74, p. 969–976, Nov. 2015.
- ANTUNES, C. S. et al. Influência da aplicação de silício na ocorrência de lagartas (Lepidoptera) e de seus inimigos naturais chaves em milho (*Zea Mays* L.) e em girassol (*Helianthus annuus* L.). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 619-625, July-Aug. 2010.
- ARAÚJO, L. F. de. et al. Flutuação populacional de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH), *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Doru luteipes* (Scdder) em milho convencional e transgênico Bt. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 10, n. 3, p. 205-214, 2011.
- ARONSON, A. I.; SHAI, Y.; Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 1-8, Feb. 2001.
- ÁVILA, C. J.; NAKANO, O. Efeito do Regulador de Crescimento Lufenuron na Reprodução de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293- 299, jun. 1999.
- BERNARDI, O. et al. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, Oct. 2015.

BERNARDI, O. et al. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection**, Guildford, v. 58, p. 33-40, Apr. 2014.

BERNARDI, O. et al. **Manejo da resistência de insetos a plantas Bt**. In: BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. (Eds.). 1º Ed., 2016, 45 p.

BIANCHI, F.; BOOIJ, C. J. H.; TSCHARNTKE, T. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, Washington, v. 273, n. 1595, p. 1595-1715, Jul. 2006.

BIONDI, A. et al. Using organic certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 87, n. 7, p. 803–812, May. 2012.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 423-431, Feb. 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Elmsford, v. 49, n. 4, p. 423-435, Mar. 2007.

BUENO, V.H.P. 2000. **Desenvolvimento e multiplicação de percevejos predadores do gênero *Orius* Wolff**, p. 69-90. In: V.H.P. Bueno (ed.), Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de qualidade. Lavras, Editora UFLA, 207p.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.5, Sept-Oct. 2005a.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações dos bióticas ‘milho’ e ‘arroz’ de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.4, Apr. 2005b.

CAMPOS, M.R. et al. Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p. 1535-1540, Aug. 2011.

CARROLL, M. W.; HEAD, G.; CAPRIO, M. When and where a seed mix refuge makes sense for managing insect resistance to Bt plants. **Crop Protection**, Guildford v. 38, p. 74-79, Aug. 2012.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 4, e62268, Apr. 2013.

CÉLERES, 2016. **Segundo Acompanhamento da adoção da biotecnologia agrícola para a safra 2016/17**. Disponível em < <http://www.celeres.com.br/>>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

COSTA, M. L. M. **Caracterização molecular de genes cyt de cepas de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2011. 71 p. Dissertação (mestrado em Biotecnologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CRUZ, I. et al. **Monitoramento de Parasitoides de Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Municípios de Minas Gerais, Brasil**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, dez. 2009. 33 p. Documentos 92, Embrapa Milho e Sorgo.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, nov. 1995. 45 p. Circular Técnica 21, Embrapa Milho e Sorgo.

CRUZ, I. **Controle Biológico de pragas na cultura de milho na produção de conservas (mini-milho), por meio de parasitoides e predadores**. Ago. 2007. 16 p. Circular Técnica 91, Embrapa Milho e Sorgo.

CRUZ, I.; ALVARENGA, C. D.; FIGUEIREDO, P. E. F. **Biologia de *Doru luteipes* (Scudder) e sua capacidade predatória de ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie)**. **Anais da sociedade entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 273-278, May. 1995.

CRUZ, I.; MENDES, S. M.; VIANA, P. A. **Importância econômica e manejo de insetos sugadores associados à parte aérea de plantas de milho Bt**. Circular técnica 175. Sete Lagoas, MG, Dezembro, 2012. ISSN 1679-1150.

CRUZ-LANDIM, C. **O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP (Apida, Meliponinae)**. **Naturalia**, São Paulo, v.8, [S.I.], p.7-23, 1983.

CTNBio - **Conselho Técnico Nacional de Biossegurança**. Disponível em < <http://www.ctnbio.gov.br/>>. Acesso em 20 de março de 2017.

DE LA POZA, M. et al. **Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain**. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, n. 7, p. 677–684, Jul. 2005.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world**. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 193-199, Apr. 2001.

DEQUECH, S. T. B. et al. **Population fluctuation of *Spodoptera frugiperda* eggs and natural parasitism by *Trichogramma* in maize**. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 295–300, July-Sept. 2013.

DHURUA, S.; GUJAR, G. T. **Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India**. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, n. 8, p. 898-903, Mar. 2011.

DILLIES, M. A. et al. **A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis**. **Briefings in bioinformatics**, London, v. 14, n. 6, p. 671- 683, Nov. 2013.

DUAN, J.J. et al. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 1, e1415, Jan. 2008.

DUFFEY, S. S. Sequestration of plant natural products by insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 25, p. 447-477, 1980.

DUSSOURD, D. E. et al. Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 85, n. 16, p. 5992-5996, Aug. 1988.

ESTRUCH J. J. et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389–5394, May. 1996.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, n. 0261-2194, p.150-158, June 2014.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 501-533, Jan. 2002.

FERRY, N. et al. Biotrophic and tritrophic effects of Bt Cry3A transgenic potato on beneficial, non-target, beetles. **Transgenic Research**, London, v. 16, n. 6, p. 795–812, Dec. 2007.

FIGUEIREDO, M.L.C.; DIAS, A.M.P.M.; CRUZ, I. Associação entre inimigos naturais e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 3, p. 340-350, dez. 2006.

FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S.; SUJI, E. R.; **O impacto de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos sobre a biodiversidade**. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJI, E. R. (Eds.). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas- O lagão resistente a insetos como estudo de caso. 1º Ed., 2003. P. 65-83.

FRIZZAS, M. R. et al. Milho geneticamente modificado e sua ação sobre a lagarta-do-cartucho e tesourinha em condições de campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 203-209, fev. 2014.

GASSMANN, A. J. et al. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 7, e22629, Jul. 2011.

GUERREIRO, J. C. et al. Distribuição espacial do predador *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forficulidae) na cultura do milho. **Revista científica eletrônica de agronomia**, Garça, v. 4, n. 7, p. 1-11, jun. 2005.

GOUFFON, C. et al. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 10, p. 3182–3188, May. 2011.

HEGEDUS, D. et al. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 54, p. 285-302, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. et al. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 113, n. 1, p. 78–81, May. 2013.

HILBECK, A.; SCHMIDT, J. E. U. Another view on Bt proteins – how specific are they and what else might they do? **Biopesticides International**, Jalandar, v. 2, n. 1, p. 1–50, 2006.

HONÉK, A. Geographical variation in thermal requirements for insect development. **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 93, n. 3, p. 303-312, Sept. 1996.

HORIKOSHI, R. J. et al. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports**, Ahmedabad, v. 6, n. 34864, p. 1-8, Oct. 2016a.

HORIKOSHI, R. J. et al. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 109, n. 2, p. 854-859, Apr. 2016b.

HUANG, F. et al. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 11, e112958, Nov. 2014.

JASINSKI, J.R. et al. Select nontarget arthropod abundance in transgenic and no transgenic field crops in Ohio. **Environmental Entomology**, College Park, v. 32, n. 2, p. 407–413, Apr. 2003.

JURAT-FUENTES, J. L. et al. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Biochemistry**, New Haven, v. 43, n.44, p. 14299- 14305, Nov. 2004.

LEE M. K.; MILES, P.; CHEN J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Pasadena, v. 339, n. 4, p. 1043-1047, Jan. 2006.

LEITE, N. A. et al. Does Cry1Ab maize interfere in the biology and behavioural traits of *Podisus nigrispinus*? **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 67, n. 2, p. 265-271, Dez. 2014.

LI, J. et al. Advances in the use of the RNA interference technique in Hemiptera. **Insect Science**, Elmsford, v. 20, n. 1, p. 31-39, Feb. 2013.

LI, Y. et al. Consumption of Bt rice pollen containing Cry1C or Cry2A does not pose a risk to *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). **Scientific Reports**, Ahmedabad, v. 5, n. 7679, p. 1-6, Jan, 2015.

LIU, F. et al. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, n. 2, p. 155-161, Feb. 2010.

LIU, X. et al. Natural Enemies Delay Insect Resistance to Bt Crops. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, e90366, Mar. 2014.

LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 36, n. 3, Mar. 1968.

LOURENÇÃO, A. L. F.; FERNANDES, M. G. Avaliação do Milho Bt Cry1Ab e Cry1F no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em condições de campo. **Científica**, Jaboticabal, v.41, n.2, p.164–188, 2013.

LOVEI G. L.; ANDOW D. A.; ARPAIA S. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 2, p. 293-306, Apr. 2009.

LU, Y. et al. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. **Nature**, New York, v. 487, n. 7407, p. 362–365, Jun. 2012.

LUNDGREN, J. G. et al. Ecological compatibility of GM crops and biological control. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 12, p. 1017–1030, Dez. 2009.

MACHADO, R.C.M. **Interação inseto-planta e suas implicações no manejo integrado de pragas**. 2009. 53 p. Dissertação (Pós-graduação *latu sensu*) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MARTINOU, A. F.; SERAPHIDES, N.; STAVRINIDES, M. C. Lethal and behavioral effects of pesticides on the insect predator *Macrolophus pygmaeus*. **Chemosphere**, Oxford, v. 96, p. 167–173, Feb. 2014.

MENDES, S. M. et al. **Avaliação da incidência de organismos alvo e não alvo em milho Bt (Cry 1Ab) em condições de campo em Sete Lagoas-MG. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS**, dez. 2009. 6p. Circular Técnica 128. Embrapa Milho e Sorgo.

MENDES, S. M. et al. **Avaliação de variáveis comportamentais como metodologia para estudo de organismos não alvo em milho Bt**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, dez. 2012b, 7 p. Circular Técnica 21, Embrapa Milho e Sorgo.

MENDES, S. M. et al. Biological and behavioral aspects of predator, *Orius insidiosus* (SAY, 1832) in Bt and non-Bt maize. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 753-761, Oct. 2012a.

MOSCARDINI, V. F. et al. Toxicity and sublethal effects of seven insecticides to eggs of the flower bug *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). **Chemosphere**, Oxford, v. 92, n. 5, p. 490-496, Jul. 2013.

MUSSER, F. R.; SHELTON, A. M. Bt sweet corn and selective insecticides: impacts on pests and predators. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 1, p. 71–80, Feb. 2003.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 4, p. 546-554, Dec. 2008.

NAHRSTEDT, A.; DAVIS, R. H. Biosynthesis and quantitative relationships of the cyanogenic glucosides, linamarin and lotaustralin, in genera of the *Heliconiini* (Insecta: Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Comparative biochemistry**. Oxford, v. 82, n. 4, p. 745- 749, Dec. 1985.

NARANJO, S. E. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns.- **CAB reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Wallingford, v. 4, n. 11, p. 1-11, Jan. 2009.

ÖSTMAN, Ö.; EKBOM, B.; BENGTSSON, J. Yield increase attributable to aphid predation by ground-living polyphagous natural enemies in spring barley in Sweden. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 149-158, Apr. 2003.

PASSINI, A. et al. Exigências térmicas de *Doru lineare* Eschs. e *Doru luteipes* Scudder em laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1562- 1568, Jul. 2010.

PASSINI, A.; PARRA, J. R. P.; LOPES, J. M. Dieta artificial para criação de *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae), predador da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 308-311, Mar-Apr. 2007.

PAULA, D. P.; ANDOW, D. A. Uptake and bioaccumulation of Cry toxins by an aphidophagous predator. **Environmental Pollution**, London, v. 209, p. 164-168, Feb, 2016.

PAULA, D. P. et al. Uptake and Transfer of a Bt Toxin by a Lepidoptera to Its Eggs and Effects on Its Offspring. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 4, e95422, Apr. 2014.

PAULA, D. P. et al. Limitations in dose–response and surrogate species methodologies for risk assessment of Cry toxins on arthropod natural enemies. **Ecotoxicology**, New York, v. 25, n. 3, p. 601-607, Feb. 2016.

PETERSON, B.; BEZUIDENHOUT, C. C.; VAN DEN BERG, J. An Overview of Mechanisms of Cry Toxin Resistance in Lepidopteran Insects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 0, n. 0, p. 1-16, Feb. 2017.

PICANÇO, M. C. et al. Intensidades de perdas, ataque de insetos-praga e incidência de inimigos naturais em cultivares de milho em cultivo de safrinha. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.2, p. 339-347, mar-abr. 2003.

PIRES, C. S. S.; SUJI, E. R.; FONTES, E. M. G. **Avaliação de risco de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos sobre inimigos naturais**. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJI, E. R. (Eds.). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas- O algodão resistente a insetos como estudo de caso. 1º Ed., 2003. P. 85-115.

PONS, X. et al. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: a farm scale study. **European Journal of Entomology**, Branisovska, v. 102, n. 1, p. 73–79, Mar. 2005.

PRATISSOLI, D. et al. Ação transovariana de lufenuron (50 g/l) sobre adultos de *Spodoptera frugiperda* (j. e. smith) (lepidoptera: noctuidae) e seu efeito sobre o parasitóide de ovos

Trichogramma pretiosum riley (hymenoptera: trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 9-14, jan./fev., 2004.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA TS. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A. S.; LEA, A. O. Internalized proteins directed into accumulative compartments of mosquito oocytes by the specific ligand, vitellogenin. **Tissue and Cell**, Essex, v. 18, n. 4, p. 559-574, Apr. 1986.

RAUBENHEIMER, D. Cyanoglycoside gynocardin from *Acraea horta* (L.) (Lepidoptera: Acraeinae): possible implications for evolution of acraeine host choice. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, n. 8, p. 2177–2189, Aug. 1989.

REDOAN, A. C. et al. Seletividade fisiológica de inseticidas para adultos de *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forficulidae). **Revista Ciência Agrônômia**, Fortaleza, v. 44, n. 4, p. 842-850, out-dez. 2013.

REIS, L. L.; OLIVEIRA, L. J.; CRUZ, I. Biologia e potencial de *Doru luteipes* no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 333-342, Apr. 1988.

RESENDE, D. C. et al., Does Bt maize cultivation affect the non-target insect community in the agro ecosystem?. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, n. 1, p. 82-93, Jan-Mar. 2016.

ROMEIS J. et al. Assesment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 203-208, Feb, 2008.

ROMEIS, J. et al. Deriving criteria to select arthropod species for laboratory tests to assess the ecological risks from cultivating arthropod-resistant genetically engineered crops. **Chemosphere**. Oxford, v. 90, n. 3, p. 901-909, Jan. 2013.

ROMEIS, J et al. Recommendations for the design of laboratory studies on non-target arthropods for risk assessment of genetically engineered plants. **Transgenic Research**, London, v. 20, n. 1, p. 1–22, Feb. 2011.

ROMEIS J.; MEISSLE M. Non-target risk assessment of Bt crops-Cry protein uptake by aphids. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 135, n. 1-2, p. 1–6, Jun. 2011.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 1, p. 63–71, Jan. 2006.

ROMEIS, J.; MCLEAN, M. A.; SHELTON, A. M. When bad science makes good headlines: Bt maize and regulatory bans. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 5, p. 386-387, May, 2013.

SANTOS, L. M. et al. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 345-350, Mar-Apr. 2004.

SCHRIJVER, A. D. et al. Quality of laboratory studies assessing effects of Bt-proteins on non-target organisms: minimal criteria for acceptability. **Transgenic Research**, London, v. 25, n. 4, p. 395-411, Mar. 2016.

SHELTON, A. M. et al. Use of Bt-resistant caterpillars to assess the effect of Cry proteins on beneficial natural enemies. **GMOs in Integrated Plant Production**, Suíça, v. 114, p. 51-55, Jun, 2016.

SHELTON, A. M. et al. Use of Bt-resistant caterpillars to assess the effect of Cry proteins on beneficial natural enemies. **GMOs in Integrated Plant Production**, Suíça, v. 114, p. 51-55, Jun, 2016.

SILVEIRA, L. C.P. et al. Plantas cultivadas e invasoras como habitat para predadores do gênero *Orius* (Wolff) (Heteroptera: anthocoridae). **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 261-265, 2003.

SILVEIRA, L.C.P.; BUENO, V.H.P.; VAN LENTEREN, J.C. *Orius insidiosus* as biological control agent of thrips in greenhouse chrysanthemums in the tropics. **Bulletin Insectology**, Bologna, v. 57, n. 2, p. 103–109, 2004.

SOUZA, I. R. P. DE. et al. Population structure of *Spodoptera frugiperda* collected in maize from different brazilian geographic regions. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 14, n. 3, p. 300-315, 2015.

STALLMAN, H. R.; JAMES, H. S. J. Determinants affecting farmers' willingness to cooperate to control pests. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 117, p. 182–192, Sept. 2015.

STORER, N.P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, Aug. 2010.

STORER, N.P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, Lanham, v. 110, n. 3, p. 294-300, Jul. 2012.

SYMONDSON, W. O .C.; SUNDERLAND, K. D.; GREENSTONE, M.H. Can generalista predators be effective biocontrol agents? **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 561–594, Jan. 2002.

TABASHNIK, B. E. Delaying insect resistance to transgenic crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 105, n. 49, p. 19029-19030, 2008.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, n. 6, p. 510- 521, June, 2013.

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 4, p. 1031- 1038, Aug, 2003.

TALEBI, K.; KAVOUSI, A.; SABAHI, Q. Impacts of pesticides on arthropod biological control agents. **Pest Technology**, Kagawa, v. 2, n. 2, p. 87–97, Sept. 2008.

TAVARES, J.; WANG, K. H.; HOOKS, C. R. R. An evaluation of insectary plants for management of insect pests in a hydroponic cropping system. **Biological Control**, Orlando, v. 91, p. 1–9, Dec. 2015.

TELFER, W. H.; KUNKEL, J. G. The function and evolution of insect storage hexamer. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 205-228, 1991.

TIAN, J. et al. Bt crops benefit natural enemies to control non-target pests. **Scientific Reports**, Tokyo, v. 5, n. 16636, p. 1-6, Nov. 2015.

TIAN, J. et al. Using field-evolved resistance to Cry1F maize in a lepidopteran pest to demonstrate no adverse effects of Cry1F on one of its major predators. **Transgenic Research**, London, v. 21, n. 6, p.1303-1310, Dec. 2012.

VAN RENSBURG, J. B. J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, Pretoria, v. 24, p. 147-151, 2007.

WONG, S. K.; FRANK, S. D. Pollen increases fitness and abundance of *Orius insidiosus* Say (Heteroptera: Anthocoridae) on banker plants. **Biological Control**, Orlando, v. 64, n. 1, p. 45-50, Jan. 2013.

ZHANG, G. et al. Transmission of Bt Toxin to the Predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) Through Its Aphid Prey Feeding on Transgenic Bt Cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v. 35, n. 1, p. 143-150, Feb. 2006.

ZHANG, W. et al. Ecosystem services and Dis-services to agriculture. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 253–260, Dec. 2007.

ARTIGO 1

**SEQUESTRO E TRANSFERÊNCIA DA PROTEÍNA CRY1F ENTRE GERAÇÕES
DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

**UPTAKE AND TRANSFER OF CRY1F PROTEIN BETWEEN GENERATIONS OF
SPODOPTERA FRUGIPERDA (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

RESUMO

A seleção de resistência de *Spodoptera frugiperda* a proteínas Cry em plantas transgênicas ainda não foi bem elucidada. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o sequestro da proteína Cry1F no milho Bt por lagartas de *S. frugiperda* e transferência para os seus descendentes. Para tanto, lagartas neonatas resistentes e suscetíveis à proteína Cry1F foram alimentadas com milho não Bt por dez dias, e depois com milho Bt TC1507, que expressa a proteína Cry1F até o final do desenvolvimento da fase larval. Foram analisados quatro tratamentos: 1) Lagartas resistentes à proteína Cry1F com ambos os sexos expostos à mesma proteína, 2) lagartas resistentes à Cry1F com apenas o macho exposto à Cry1F, 3) lagartas resistentes com apenas a fêmea exposta e 4) lagartas suscetíveis não expostas à proteína servindo como tratamento controle. A detecção e quantificação da proteína Cry1F foram realizadas através do teste Elisa de acordo com o protocolo do Kit Agdia®. Os adultos foram separados em casais e então colocados em gaiolas para a reprodução e obtenção das massas de ovos. As posturas foram retiradas diariamente. Para cada tratamento foram analisados 10 casais com cinco massas de ovos por casal, do primeiro ao quinto dia de oviposição. Para as lagartas suscetíveis expostas à Cry1F, a mortalidade foi de 100%. Para as lagartas resistentes que foram expostas a proteína Cry1F, a sobrevivência ficou entre 85% e 90%. A biomassa de lagartas do tratamento controle, que se alimentaram de milho não Bt, foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos, o que mostra inibição do crescimento. O número de ovos por postura foi maior quando ambos os sexos foram expostos à proteína Cry1F. Verificou-se que as lagartas sequestraram a proteína Cry1F expressa no milho Bt e a transferiram para os ovos (geração F1). Quando ambos os sexos foram expostos à proteína, maior foi a quantidade de proteína detectada nos ovos, o que sugere que a transmissão se deu por ambos os sexos. A quantidade de proteína detectada nos ovos não diminuiu nos cinco primeiros dias de postura quando ambos os pais foram expostos à proteína, mas sim quando apenas um dos sexos foi exposto. A quantidade de Cry1F detectada no segundo nível trófico foi menor do que no primeiro nível trófico. A quantidade de ovos produzida foi maior nos tratamentos em que ambos os sexos ou somente a fêmea foi exposta à Cry1F. Estes resultados trazem subsídios para confirmar que a utilização da área de refúgio pode ajudar no manejo da resistência de *S. frugiperda* em milho Bt.

Palavras-chave: Manejo da resistência de insetos. Lagarta-do-cartucho. Cry1F.

ABSTRACT

The mechanisms involved in *Spodoptera frugiperda* resistance selection to Cry proteins in transgenic plants are still not well elucidated. So, this study aims to verify the Cry1F protein uptake and transfer to *S. frugiperda* offspring. Resistant and susceptible neonates to the protein Cry1F, were fed with non-Bt maize for ten days, and after that with Bt TC1507 ® maize, which expresses the Cry1F protein until the end of the larval development phase. Four treatments were studied a) Resistant larvae to the Cry1F protein with both sex exposed to the same protein, b) Resistant larvae with only the male exposed to Cry1F, c) Resistant larvae with only the female exposed to Cry1F, and g) susceptible larvae non-exposed to the protein, acting as control treatment. Detection and quantification of the Cry1F protein was performed by the Elisa test according to the Agdia® Kit protocol. The adult individuals were separated in couples, and then put in cage for reproduction and egg mass acquisition. The egg laying was removed daily. For each treatment, 10 couples with five egg masses each, were analyzed from the first to the fifth day of egg laying. For susceptible larvae exposed to Cry1F, the mortality was 100%. For resistant larvae exposed to Cry1F, the survival rate was between 85% and 90%. The susceptible larvae biomass (control treatment), fed with non-Bt maize, was significantly higher compared to the other treatments, which shows a growth inhibition. The amount of eggs per egg laying was higher when both sex were exposed to the Cry1F protein. Larvae were found to uptake Cry1F expressed in Bt maize and transferred it into the eggs (first generation). When both parents were exposed to the protein, the amount of protein identified in the eggs was higher, which indicates that the transference was made by both sex. The amount of Cry1F detected in the eggs did not decrease for the first five days of egg laying when both parents were exposed to the protein, but decreased when only one parent was exposed. The amount of Cry1F detected on the second trophic level was smaller than on the first trophic level. The quantity of eggs produced was higher in the treatments where both sex and only the female were exposed to Cry1F. These results provide insight to confirm that the use of the refuge area may help in the management of *S. frugiperda* resistance in Bt maize.

Key-words: Insect resistance management. Fall armyworm. Cry1F.

1 INTRODUÇÃO

O milho Bt expressa uma ou mais proteínas da bactéria *Bacillus thuringiensis* que na esporulação produz inclusões de cristais inseticidas formados por proteínas tóxicas (BRAVO et al., 2011). Essas proteínas possuem atividade inseticida contra os insetos alvo, a protoxina liga-se as moléculas receptoras do intestino, ocasionando oligomerização, inserção da membrana e formação de poros, reduzindo a alimentação e levando os insetos a morte (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). No entanto, um dos principais problemas da utilização do milho Bt é seleção de insetos alvo resistentes às proteínas tóxicas. A expressão contínua de genes *cry* em plantas transgênicas exerce forte seleção para resistência em populações de pragas alvo (HORIKOSHI et al., 2016b).

O evento TC1507, que possui a proteína Cry1F, teve ampla utilização por ser o segundo evento Bt liberado no Brasil e devido a boa eficiência de controle da de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (BERNARDI et al., 2015). No entanto, quatro anos após a sua liberação, já se constatou populações resistentes à toxina. Um dos possíveis motivos para esta rápida evolução da resistência é que o evento TC1507 não expressa a proteína Cry1F em alta dose para esta praga (STORER et al., 2010; FARIAS, et al., 2016). Já foram relatadas a resistência da lagarta-do-cartucho à proteína Cry F expressa em milho por Storer et al. (2010) em Porto Rico, Huang et al. (2014) nos EUA e Farias et al. (2014) no Brasil.

No Brasil, a resistência foi registrada em campo do Oeste da Bahia em 2011, sendo este o Estado onde se encontrou a maior frequência de alelos de resistência à proteína Cry1F, mas a resistência também foi encontrada em cinco estados: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás e Paraná (FARIAS et al., 2016). Estudos com populações resistentes em diferentes regiões do Brasil mostraram que a resistência de *S. frugiperda* à proteína Cry1F é incompletamente recessiva, autossômica e com herança monogênica (FARIAS et al., 2014; FARIAS et al., 2015; LEITE et al., 2016).

Horikoshi et al. (2016b) mostraram que o homocigoto é suscetível, nesse sentido é necessário aumentar o nível de compreensão dos mecanismos de resistência e a complexidade da interação com o ambiente para subsidiar novas estratégias de manejo de resistência de insetos (MRI) e manejo integrado de pragas (MIP).

Entender como se procede a evolução da resistência é essencial para aumentar a vida útil da tecnologia, evitando ou retardando a resistência e prever seu acontecimento. Para isto,

é fundamental compreender os mecanismos de resistência envolvidos (BLANCO et al., 2016), bem como aspectos da bioecologia e fisiologia do inseto. Mesmo que seja amplamente aceito que as proteínas Cry podem ser transferidas a cadeia trófica (ANDOW; LOVEI; ARPAIA, 2006; ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006; PAULA et al., 2016; SCHRIJVER et al., 2016; SHELTON et al., 2016), continua a incerteza sobre como ocorre a transferência. Uma maneira possível através da qual uma presa pode transferir proteína Cry para o inimigo natural é ter esta proteína nos seus tecidos corporais (FERRY et al., 2007).

O sequestro é o acúmulo de uma substância química que se deposita em tecidos ou glândulas do organismo que absorveu este produto. Por exemplo, metabólitos secundários de plantas podem ser absorvidos por insetos. Estes compostos são absorvidos através da membrana peritrófica do mesêntero, transportados através da hemolinfa e depositados no corpo gorduroso onde formam corpos multivesiculares dentro dos trofócitos (LOCKE; COLLINS, 1968; DUFFEY, 1980; CRUZ-LANDIM, 1983; TELFER; KUNKEL, 1991; HEGEDUS et al., 2009). E apesar das proteínas Cry possuírem maior peso molecular do que normalmente estes metabólitos sequestrados por Lepidópteros possuem, esta absorção foi observada por Paula et al. (2014) pela passagem transovariana da proteína Cry1Ac para a espécie *Chlosyne lacinia* (Geyer, 1837) (Lepidoptera: Nymphalidae). Contudo esses aspectos ainda precisam ser melhor elucidados para *S. frugiperda*, principal praga alvo do milho Bt uma vez que essa compreensão pode auxiliar a entender os mecanismos envolvidos na seleção da resistência por essa espécie, além das implicações das interações tróficas que esta passagem pode resultar.

Assim o presente estudo visa avaliar o sequestro da proteína Cry1 F por *S. frugiperda* e a transferência para os seus descendentes, além de verificar as alterações nas variáveis biológicas da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Criação de *Spodoptera frugiperda*

A população de *S. frugiperda* selecionada quanto à resistência à proteína Cry1F, por Leite et al. (2016) foram mantidas no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos (Embrapa Milho e Sorgo), de acordo com a metodologia usada pelo mesmo autor, em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa. Lagartas neonatas resistentes e suscetíveis à proteína Cry1F foram mantidas individualizadas em copos plásticos de 50 ml se alimentado de folhas de milho não Bt por dez dias, e depois com milho Bt TC1507, que expressa a proteína Cry1F até o final do desenvolvimento da fase larval. Foram analisados quatro tratamentos: 1) Lagartas resistentes à proteína Cry1F com ambos os sexos expostos à mesma proteína, 2) lagartas resistentes à Cry1F com apenas o macho exposto à Cry1F, 3) lagartas resistentes com apenas a fêmea exposta e 4) lagartas suscetíveis não expostos à proteína servindo como tratamento controle.

Ambas as populações avaliadas, resistentes e susceptíveis à proteína Cry1F foram expostas a esta proteína no final da fase de desenvolvimento larval, aos 10 dias de idade para não haver diferença quanto à quantidade de proteína ingerida. Segundo Rosa et al. (2012), o desenvolvimento larval ocorre em média de 10,7 a 21,7 dias. Para a quantificação aproximada do número de ovos por postura foi feita uma média da biomassa de 10 ovos e a partir disso convertido em número de acordo com o peso de cada postura.

A sexagem foi realizada na fase adulta, então os casais foram individualizados e colocados em gaiolas de tubos de PVC (30 cm de diâmetro e 20 cm de altura) para a reprodução e obtenção das posturas. Dentro de cada gaiola foram inseridas folhas de papel sulfite A4 para oviposição. Em cada gaiola foi colocado um casal de cada tratamento, considerado uma repetição, onde foram coletados os ovos e anotado o número de posturas diariamente, até a morte das fêmeas.

Para cada tratamento foi registrado a sobrevivência e biomassa das lagartas com dez dias de idade, os períodos de pré-oviposição, oviposição e longevidade, número de posturas total e por dia para cada tratamento e número de ovos por postura/dia/fêmea. Para cada tratamento foram analisados 10 casais (repetições) com cinco posturas por casal, do primeiro ao quinto dia de oviposição. As posturas foram retiradas, identificadas e congeladas para detecção e quantificação da proteína Cry1F.

2.2 Detecção e quantificação da proteína Cry1F nos ovos de *S. frugiperda*

Para detecção da proteína nos ovos, consideraram-se os mesmos tratamentos supracitados, contudo para lagartas suscetíveis que foram expostas à proteína Cry1F não houve sobreviventes, restando quatro tratamentos. Para cada tratamento, selecionou-se 10 casais, considerados 10 repetições, para os quais retirou-se as posturas do primeiro ao quinto dia de oviposição totalizando cinco posturas por casal. Essas posturas foram congeladas a temperatura média de -5°C e posteriormente avaliadas.

A quantificação da proteína Cry1F nos ovos foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do departamento de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF. As posturas de cada tratamento e de cada casal por dia de oviposição foram lavadas com tampão PBST 1x (Fosfato-salino com *tween*) e transferidas para microtubos de 1,5 ml identificados de acordo com a amostra. Foi verificada a biomassa de cada amostra em balança de precisão 0,0001mg.

Os microtubos com as amostras foram submetidos a um banho de nitrogênio líquido na caixa de armazenamento para facilitar a maceração dos ovos. Estes ovos foram macerados com bastão de vidro ou agulha de tricô, e adicionou-se o volume de tampão PBST 1x correspondente. Para as amostras com até 10 miligramas (mg) foram utilizados 250 μL de tampão; para as outras amostras com biomassa superior, o volume de tampão foi proporcional. Os microtubos foram também passados pelo *vortex* por cinco segundos. Em seguida foram centrifugados a 4°C à 20 K rcf (força centrífuga relativa) por 20 minutos, e transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos devidamente identificados.

Para o procedimento do teste de ELISA para detecção da proteína Cry 1F foi realizado em quintuplicata de acordo com o protocolo do Kit Agdia® (<https://d163axztg8am2h.cloudfront.net/static/doc/dc/73/218118e9416cb73882218ceb496e.pdf>), usando os padrões de Cry1F para a curva de calibração de 0; 2,5; 5; 10 e 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$, replicados também cinco vezes, e a leitura foi realizada a 630 nm no leitor de absorvância Bio-Rad®.

2.3 Análises Estatísticas

Para as variáveis, sobrevivência, biomassa, períodos de pré-oviposição, oviposição e longevidade e o número total de massas de ovos, os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade e à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o número de posturas por dia por fêmea de *S. frugiperda* e o número de ovos por postura as médias foram discriminadas pelo intervalo de confiança a 5% de probabilidade.

Para detecção e quantificação da proteína Cry1F em cada amostra foi estimada com o declive médio das curvas de calibração, e a absorvância foi normalizada para cada amostra de acordo com a biomassa de ovos. Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade e à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

Houve diferença significativa entre os tratamentos para a biomassa das lagartas aos 10 dias. No tratamento controle, formado por *S. frugiperda* suscetível sem exposição à proteína, a biomassa foi maior, diferindo estatisticamente dos outros três tratamentos, onde somente o macho foi exposto à proteína, somente a fêmea foi exposta e ambos foram expostos a proteína Cry1F, sendo que os três últimos não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (TABELA 1). Quando observada a longevidade, também se verificou diferença significativa entre os tratamentos. Para o tratamento controle este período foi estatisticamente maior quando comparado aos demais tratamentos, onde havia macho, fêmea ou ambos oriundos de linhagem resistente à proteína (TABELA 1).

Em relação aos períodos de pré-oviposição e oviposição a diferença foi significativa entre o tratamento em que ambos os sexos foram expostos à proteína Cry1F sendo estes períodos menores em relação ao tratamento controle (TABELA 1). Quando a variável observada foi o número total de posturas, também verificou-se diferença significativa entre os tratamentos, no tratamento controle, o número de posturas/fêmea foi maior. Para todos os outros tratamentos onde machos, fêmeas ou ambos oriundos de linhagem resistente à proteína, o número de posturas foi significativamente menor (TABELA 1).

Tabela 1 - Biomassa larval (mg) (n=20), períodos de pré-oviposição, oviposição, longevidade e número total de posturas (\pm ep) por fêmea de *Spodoptera frugiperda* (n=10) expostos ou não à proteína Cry1F na fase larval. Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ UR.

Tratamentos	Biomassa larval	Pré-oviposição	Oviposição	Longevidade	Nº de posturas
♂ e ♀ suscetíveis não expostos	270,3 \pm	2,44 \pm	7,94 \pm	12,94 \pm	12,83 \pm
	19,91 a	0,17 a	0,55 a	0,34 a	0,18 a
♀ resistente exposta	170,3 \pm	1,88 \pm	6,38 \pm	11,38 \pm	9,00 \pm
	19,16 b	0,20 ab	0,34 ab	0,16 b	0,65 b
♂ resistente exposto	167,8 \pm	1,90 \pm	5,83 \pm	9,77 \pm	7,88 \pm
	17,03 b	0,16 ab	0,33 ab	0,32 b	0,36 b
♂ e ♀ resistentes expostos	148,7 \pm	1,72 \pm	6,61 \pm	9,33 \pm	9,83 \pm
	14,26 b	0,16 b	0,41 b	0,45 b	0,73 b

Médias seguidas pela mesma letra, não se diferem na mesma variável pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).
Fonte: Do autor (2017).

Houve diferença significativa para sobrevivência larval quando lagartas resistentes e suscetíveis foram expostas a proteína Cry1F. Onde lagartas suscetíveis foram expostas à Cry1F a mortalidade foi de 100%. Para as lagartas resistentes em que ambos os sexos ou somente o macho ou a fêmea foram expostos à Cry1F e o tratamento controle, a sobrevivência variou em média de 85 a 90% (TABELA 2). A população de *S. frugiperda* resistente à proteína Cry1F exposta à mesma proteína e para o tratamento controle, os insetos completaram o ciclo de desenvolvimento. Assim foi possível obter adultos para formação de casais apenas com lagartas resistentes, mesmo havendo exposição às folhas com proteína Bt no final da fase larval.

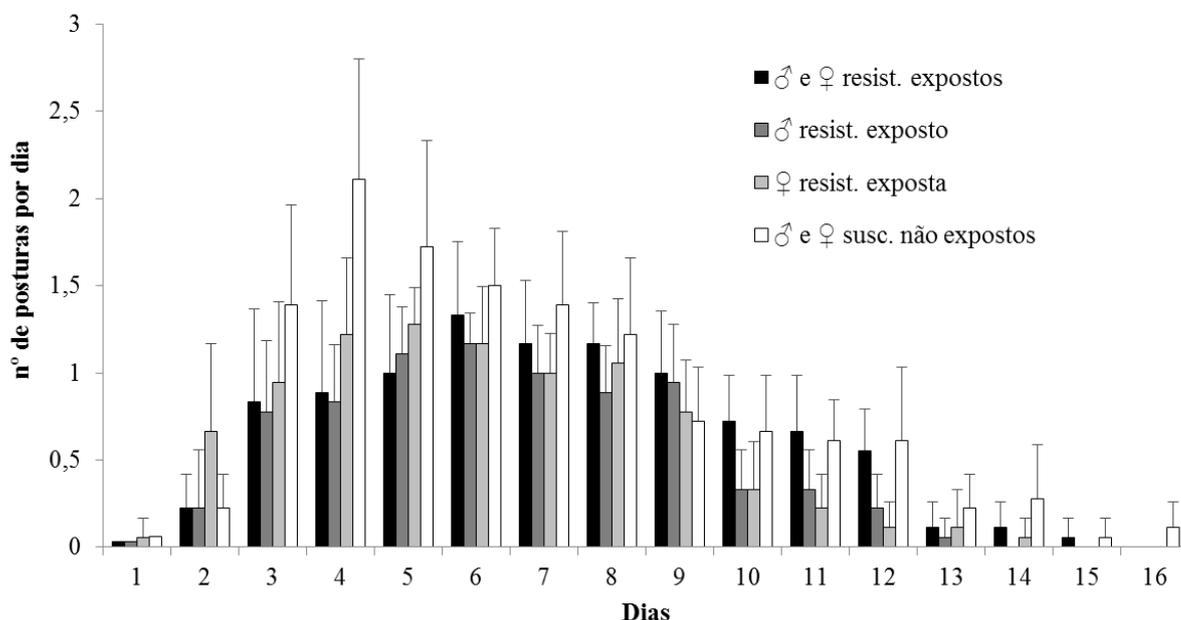
Tabela 2 - Porcentagem de sobrevivência (\pm ep) de *Spodoptera frugiperda* expostos ou não à proteína Cry1F. Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ UR.

Tratamentos	% sobrevivência larval
♂ e ♀ resistentes expostos à Cry1F	90,27 \pm 2,78 a
♂ resistente exposto à Cry1F	90,11 \pm 3,47 a
♂ e ♀ suscetíveis não expostos à Cry1F	86,11 \pm 3,26 a
♀ resistente exposta à Cry1F	84,72 \pm 4,05 a
♂ e ♀ suscetíveis expostos à Cry1F	0,00 \pm 0,00 b
♂ suscetível exposto à Cry1F	0,00 \pm 0,00 b
♀ suscetível exposta à Cry1F	0,00 \pm 0,00 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); n=9.
Fonte: Do autor (2017).

O número de posturas diárias para o tratamento controle foi em média maior em relação aos tratamentos que apenas um dos sexos resistentes foi exposto à proteína Cry1F (FIGURA 1). O pico de postura para todos os tratamentos ocorreu entre o quarto e sexto dia, reduzindo a partir do sétimo dia. O pico de posturas para o tratamento controle ocorreu no quarto dia de oviposição. Para o tratamento onde somente o macho e quando ambos os sexos foram expostos à proteína Cry1F, no sexto dia houve o pico de posturas e quando somente a fêmea foi exposta a proteína Cry1F esse pico foi no quinto dia.

Figura 1 -Número médio de posturas por dia por fêmea de *Spodoptera frugiperda* expostas ou não à proteína Cry1F (\pm ic, $P=0,05$). Temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ UR.

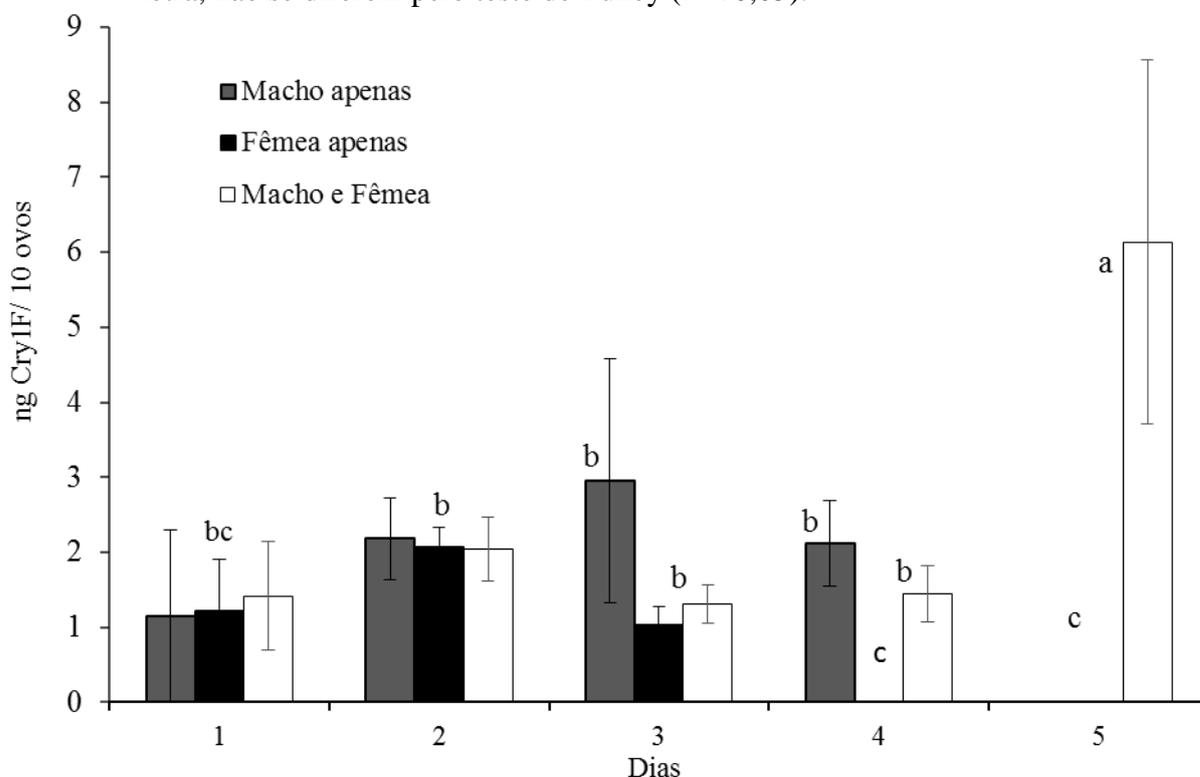


Fonte: Do autor (2017).

Até o quinto dia de oviposição o número de posturas acumulados para o tratamento controle foi de 66% das posturas. Para o tratamento em que ambos foram expostos a proteína no quinto dia de oviposição chegou a 53% das posturas totais. Quando somente o macho foi exposto, 61% das posturas foram realizadas até o quinto dia de oviposição, e o tratamento onde somente a fêmea foi exposta à proteína Cry1F, 69% das posturas foram colocadas até o quinto dia de oviposição.

Quando somente o macho foi exposto à proteína Cry1F a concentração de Cry1F observada nos ovos foi crescente até o terceiro dia onde ocorreu o pico da concentração, e no quinto dia não foi detectado. No tratamento em que somente a fêmea foi exposta, o pico de proteína Cry1F nos ovos foi registrado no segundo dia, após o qual se registrou queda e no quarto dia de oviposição não foi mais possível detectar a proteína. Quando ambos os sexos foram expostos à proteína Cry1F, o pico de detecção da proteína foi verificado no quinto dia. Assim, a concentração de Cry1F detectada nos ovos quando ambos parentais foram expostos à proteína foi maior no quinto dia. O contrário ocorreu para quando apenas o macho ou a fêmea foram expostos à proteína Cry1F, onde a quantidade registrada foi significativamente menor nas últimas posturas (FIGURA 2).

Figura 2 -Concentração da proteína Cry1F (ng/10 ovos) sequestrada por *Spodoptera frugiperda* e transferida para os ovos, durante cinco dias de oviposição, em diferentes tratamentos, dez casais por tratamento. Barras seguidas pela mesma letra, não se diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).



Fonte: Do autor (2017).

Quando ambos os pais foram expostos à proteína, a concentração de proteína sequestrada nos ovos foi significativamente maior em relação a quando apenas o macho ou a fêmea foram expostos à proteína Cry1F (TABELA 4).

Tabela 4 - Quantidade da proteína Cry1F encontrada em ng/massa de dez ovos de *Spodoptera frugiperda* (\pm ep). Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotoperíodo e $60 \pm 10\%$ UR.

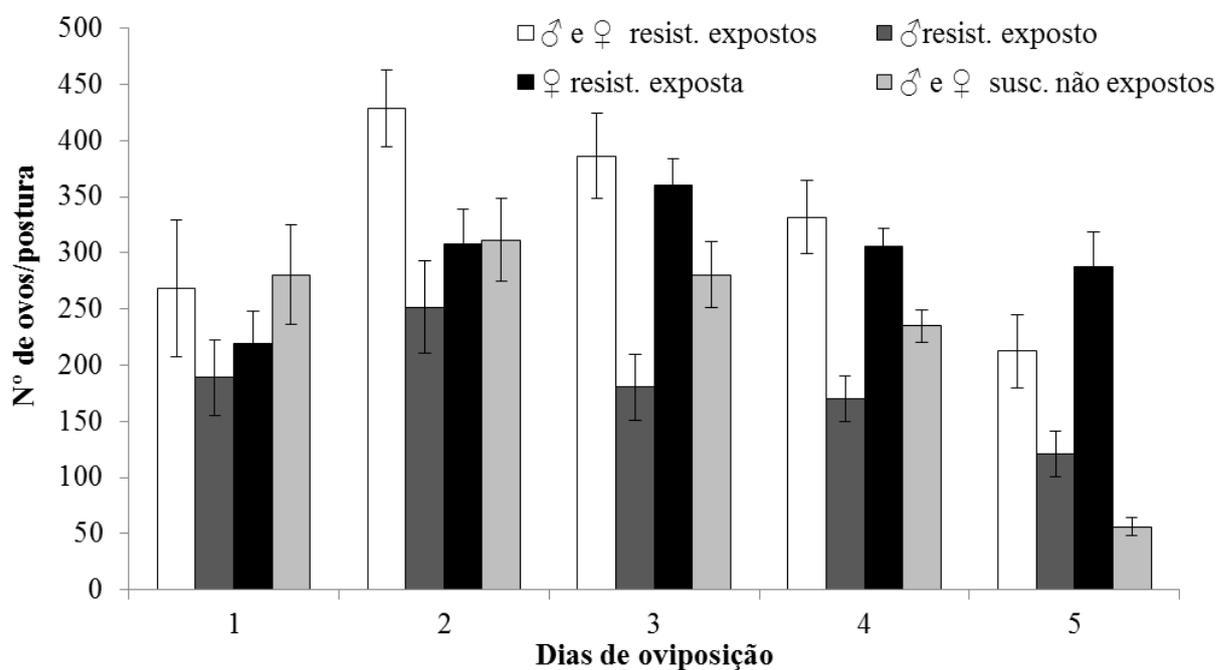
Tratamento	ng Cry1F/10 ovos
♂ e ♀ resistentes expostos à Cry1F	2,6746 a
♂ resistente exposto à Cry1F	1,8061 b
♀ resistente exposta à Cry1F	1,1907 b
♂ e ♀ suscetíveis não expostos à Cry1F	0,0 c

Médias seguidas pela mesma letra, não se diferem na mesma variável pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), (n=50). Fonte: Do autor (2017).

Houve variação no número de ovos/postura em relação ao tempo. Quando ambos os sexos foram expostos à proteína Cry1F o pico de ovos por postura foi no segundo dia,

reduzindo a 49% desse valor no quinto dia de oviposição. Nos tratamentos controle e quando somente o macho foi exposto à proteína Cry1F o pico de ovos por postura ocorreu nos três primeiros dias, diminuindo no quarto, seguido do quinto dia de oviposição. Quando somente a fêmea foi exposta à proteína Cry1F esta quantidade foi maior no terceiro, segundo e quarto dia, com redução do número de ovos por postura no quinto dia, e no primeiro, o número de ovos por postura foi menor em relação aos outros dias neste tratamento (FIGURA 3).

Figura 3 - Número de ovos por postura, por dia, por fêmea de *Spodoptera frugiperda* expostas ou não à proteína Cry1F. Barras sobrepostas, não se diferem pelo intervalo de confiança ($P < 0,05$). Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ UR.



Fonte: Do autor (2017).

DISCUSSÃO

A mortalidade completa apresentada pela população suscetível de *S. frugiperda* que se alimentou do milho expressando Cry1F prova a suscetibilidade da colônia utilizada e os diferentes níveis de suscetibilidade das populações de *S. frugiperda*. Portanto, não foi possível avaliar a diferença entre sequestro e transferência da toxina entre resistentes e suscetíveis, uma vez que as suscetíveis mesmo expostas à toxina apenas no final da fase larval, não conseguiram completar o ciclo. Este fato também ocorreu com colônias de *S. frugiperda* resistentes e suscetíveis a diferentes eventos de milho Bt estudadas por Horikoshi et al. (2016b).

Esta morte completa em relação aos suscetíveis mesmo após se alimentaram do milho Bt no final do ciclo larval, representa a quebra de um padrão que existe da interação *Bacillus thuringiensis* (Bt) x inseto. Esta interação é historicamente avaliada em testes de patogenicidade e virulência, onde o efeito do Bt é avaliado no período de uma semana, pelo parâmetro mortalidade, e isto não mede os possíveis efeitos nas gerações subsequentes. A resistência pode ser caracterizada quando um inseto deixa de ser controlado pela toxina presente na planta e consegue sobreviver durante todo o ciclo se alimentando desta planta e gerar descendentes viáveis (ANDOW, 2008). Foi o que aconteceu neste estudo, a população resistente utilizada foi a selecionada por Leite et al. (2016), onde mostra ter tido rápida seleção de resistência à Cry1F e em alto nível devido a sua alta sobrevivência depois de quatro gerações.

No entanto, apesar de não haver diferença significativa para a sobrevivência entre os tratamentos com *S. frugiperda* resistentes, que foi exposta à Cry1F e o tratamento controle, a biomassa das lagartas no tratamento controle foi significativamente maior. Isso mostra que, apesar de ser resistente, houve uma inibição do crescimento, o que pode deixar a lagarta mais vulnerável no campo, por exemplo, ao ataque de inimigos naturais. Isso contraria os dados inicialmente propostos por Leite et al. (2016) para colônia selecionada em 2012, mostrando que quatro anos após a seleção os dados permanecem semelhantes. A resistência recessiva está associada a aptidão reduzida dos insetos resistentes, que é chamado de custo adaptativo, é uma resposta evolutiva das espécies alvo à pressão de seleção impostas pelas proteínas tóxicas (Santos-Amaya et al., 2016).

O fato dos períodos de pré-oviposição e oviposição terem sido menores quando ambos pais resistentes foram expostos à proteína Cry1F e a longevidade e o número de posturas terem sido significativamente maiores no tratamento controle, indica diferenças nas

populações selecionadas para resistência a proteína. Essas diferenças nas populações têm sido observadas em condições de campo nas diferentes suscetibilidades às proteínas do Bt. Trabalhos ao longo das gerações de *S. frugiperda* resistente à proteína Cry1F mostraram não haver custos adaptativos e, portanto, as diferenças encontradas neste trabalho podem ser pequenas para que se possa afirmar tratar-se de custo adaptativo. De acordo com alguns trabalhos não há reversão da resistência uma vez selecionada, e é provável que seja estável no campo mesmo sem a pressão de seleção (STORER et al., 2012; FARIAS et al., 2014; VÉLEZ et al., 2014; HORIKOSHI et al., 2016a; LEITE et al., 2016; SANTOS-AMAYA et al., 2016).

A transferência entre gerações de proteínas Cry envolve a transferência da proteína dos pais para os ovos, e neste caso há um sequestro desta proteína da planta Bt para a prole. A proteína Cry1F foi detectada nos ovos de *S. frugiperda* para a população resistente à Cry1F, onde um ou ambos parentais foram expostos à Cry1F. Portanto, a alimentação de lagartas em folha de milho contendo a proteína Cry1F, mesmo que apenas por cinco dias, propiciou o sequestro e transferência para os ovos da geração F1. A detecção de Cry1F nos ovos de *S. frugiperda* depois da exposição dos pais à proteína tóxica confirmou que as larvas são capazes de sequestrar Cry1F presente na folha do milho e transferi-la para sua prole. Esta transferência foi demonstrada também no lepidóptero *C. lacinia*. Concentrações não letais de Cry1Ac foram oferecidas à geração dos pais e a transferência foi confirmada pela detecção de Cry1Ac em ovos (PAULA et al., 2014).

A exposição de ambos os pais ou de somente um deles viabilizaram o sequestro e transferência de Cry1F para os ovos. Este mesmo fato também ocorreu na detecção de sequestro e transferência de Cry1F pelo predador *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) ao se alimentar de pulgões *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) que se alimentaram de dieta líquida contendo Cry1F, demonstrado no trabalho de Paula, Souza e Andow (2015) e os autores sugeriram que nas fêmeas a Cry1F provavelmente foi sequestrada nos ovários, onde poderia ser transferida por passagem transovariana, e os machos poderiam ter transferido toxina à prole através do conteúdo seminal dos espermatozoides.

O mecanismo fisiológico de como acontece este sequestro, não é conhecido. No entanto, quando o inseto ingere uma proteína esta passa pela membrana peritrófica do intestino médio e pode ser armazenada no corpo gorduroso que é responsável pela síntese de muitos componentes da hemolinfa (CRUZ-LANDIM, 1983; TELFER; KUNKEL, 1991; LOCKE; COLLINS, 1968). Desta forma, isto pode também ocorrer com a proteína Cry em *S. frugiperda*. A membrana peritrófica perivisceral recobre o sistema digestivo e possuem

trofócitos e enócitos que são capazes de armazenar proteínas, lipídeos e glicogênio (KILBY, 1965; LOCKE; COLLINS, 1968). Portanto, proteínas Cry podem ser transportadas por enócitos ou pelo pela vitelogenia, uma vez que os trofócitos desempenham papel no processo de vitelogênese, onde as reservas são armazenadas nos ovócitos, formando o vitelo dos ovos (CRUZ-LANDIM, 1983; RAIKHEL; LEA, 1986; RAIKHEL; DHADIALLA, 1992). Em insetos machos, os compostos químicos ingeridos provavelmente são sintetizados e armazenados nas glândulas acessórias do sistema reprodutor. Estas glândulas são responsáveis por secreções que fornecem nutrição e proteção para os espermatozoides, insetos da ordem Lepidoptera possuem apenas um par de glândulas acessórias que são conectadas com os ductos deferentes e o ducto ejaculatório chamado simplex (CHAPMAN, 1998). É comum em alguns lepidópteros, os machos transferirem grandes quantidades de metabólitos de plantas como, por exemplo, alcaloides para as fêmeas durante a cópula. Essas substâncias são encontradas nos ovos com função protetora contra os inimigos naturais (DUSSORT et al., 1988). Desta forma a proteína Cry quando ingerida, pode fazer este mesmo percurso, e ao ser armazenada nas glândulas acessórias, é secretada para o conteúdo espermático e transferido para a fêmea.

A quantidade de proteína Cry ingerida pode diferir muito entre espécies de herbívoros. Essa variação tem relação com o tempo e local de expressão da toxina na planta, a forma de alimentação dos herbívoros, e a quantidade de material vegetal que é ingerido (DEVOS et al., 2012). Avaliação do sequestro e transferência de proteínas Cry tem sido realizada para outros grupos, por exemplo, no ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), foi encontrada alta concentração de proteínas Cry quando alimentados com o milho ou algodão Bt, e as concentrações foram iguais ou mesmo superiores aos níveis nos tecidos da planta (TORRES; RUBERSON, 2008; LI; ROMEIS, 2010). Por outro lado, em larvas de lepidópteros como *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) ou *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833), ambas espécies (Lepidoptera: Noctuidae) foram encontrados níveis de proteína Cry mais baixos do que os presentes em plantas Bt (OBRIST et al., 2006; LAWO; WÄCKERS; ROMEIS, 2010). Em contraste, em insetos sugadores como pulgões, não foi encontrado nenhum ou apenas vestígios de proteínas Cry depois de se alimentarem de plantas Bt (ROMEIS; MEISSLE, 2011; CHEN et al., 2012). Farias et al. (2014) verificaram que a resistência foi totalmente recessiva em um bioensaio com 2.000 ng Cry1F/cm² incorporado em dieta artificial. Monnerat et al. (2015) demonstraram que populações suscetíveis apresentaram CL₅₀ de 342 ng Cry1F/cm², e na população resistente à Cry1F foi maior que 3.500 ng Cry1F/cm² de dieta artificial.

Na folha de milho do evento TC1507, que expressa a proteína Cry1F detectamos a concentração de $207,89 \pm 5.855$ ng Cry1F/mg de folha, e nos ovos analisados quantidade encontrada foi 2,6746 ng Cry1F/10 ovos, ou seja, 77 vezes inferior a folha. No entanto a exposição em baixas doses da proteína txinca configura-se em um mecanismo de pressão de seleção, uma vez que estamos tratando de embriões, cujas concentrações letais não foram medidas e que exposição a baixas concentrações promovem seleção gradual. Além disso, é importante ressaltar que no presente estudo as lagartas passaram somente cinco dias se alimentando da folha de milho contendo a proteína, e em condições de campo pode ocorrer durante todo o ciclo de desenvolvimento do inseto, o que pode levar ao acúmulo ainda maior da proteína, agravando o processo de seleção da resistência.

Neste trabalho, quando ambos os pais foram expostos à toxina, maior foi a quantidade de proteína detectada nos ovos. Apesar de ambos os sexos viabilizarem o sequestro e transferência da proteína Cry1F, quando somente a fêmea foi exposta foi possível identificar a proteína somente até o quarto dia de oviposição, diferente dos outros tratamentos. Com isto, a quantidade de proteína encontrada nos ovos também foi menor quando somente a fêmea foi exposta a proteína Cry1F em relação à somente o macho exposto, ou quando ambos foram expostos à proteína, mesmo que a quantidade de ovos tenha sido maior (FIGURA 3). Portanto, a maior concentração de proteína Cry1F encontrada quando ambos pais foram expostos à Cry1F provavelmente teve maior contribuição de sequestro e transferência por parte do macho, mostrando ter maior capacidade de realizar esta atividade através dos espermatozoides. No entanto, estudos complementares com esta população resistente são necessários para avaliar se há efeito ligado ao sexo, avaliando, por exemplo, a suscetibilidade das gerações seguintes provenientes destes tratamentos.

A concentração de Cry1F detectada nos ovos não reduziu nos cinco primeiros dias de postura quando ambos os pais foram expostos a toxina, mas reduziu significativamente quando apenas um dos pais foi exposto. Curiosamente, quando ambos os sexos foram expostos, a concentração de proteína encontrada foi significativamente maior no quinto dia, que foi o último dia de oviposição analisado. Como para a maioria dos tratamentos o pico do número de ovos (mais de 60% da quantidade total de posturas) foi antes do sexto dia de oviposição (FIGURA 1), as análises foram realizadas por cinco dias de oviposição.

Este é o primeiro estudo de detecção e quantificação da proteína Cry1F em ovos de *S. frugiperda* e estudos posteriores são necessários para determinar o mecanismo de sequestro e transferência das toxinas Cry1F para os ovos são necessários para entender estes padrões de comportamento.

O contrário ocorreu no trabalho de Paula, Souza e Andow (2015) para *H. axyridis*, onde se observou maior quantidade de proteínas nos primeiros dias de oviposição em relação aos últimos. Contudo, os padrões alimentares dessas espécies são completamente diferentes, sobretudo pelo fato dos níveis tróficos e contato com a proteína não obedecem ao mesmo modelo. Como *H. axyridis* é um predador e está no terceiro nível trófico, sequestrou Cry1F de *M. persicae*, já *S. frugiperda* está no segundo nível trófico e sequestrou a proteína expressa na folha, que é o primeiro nível trófico e, portanto possui maior concentração da proteína.

Nossos resultados contribuem para o entendimento da evolução da resistência e reforçaram a importância do uso adequado de áreas de refúgio (HORIKOSHI et al., 2016b), uma vez que quando ambos os sexos resistentes são expostos à proteína o sequestro e transferência para os ovos é potencializado. Quando somente um dos pais é exposto ocorre a queda no 3º e 4º dia, mas com a exposição de ambos, a quantidade aumenta. Assim, se imaginarmos a existência das áreas de refúgio em proporção adequada, haveria maior possibilidade de somente um dos pais ser exposto à proteína, reduzindo a exposição embrionária. Além disso, o acasalamento com os indivíduos suscetíveis vindos da área de refúgio teria papel fundamental na redução da exposição dos embriões à proteína de forma prematura.

5 CONCLUSÕES

Observamos que lagartas de *S. frugiperda* sequestram a proteína tóxica Cry1F expressa no milho TC1507 e transferem para os ovos (geração F1). Ambos os sexos viabilizam o sequestro e transferência de proteína para os ovos. Quando ambos os pais são expostos à proteína, maior é a quantidade de proteína identificada nos ovos. Não há redução na concentração de Cry1F detectada nos ovos para os cinco primeiros dias de postura quando ambos os pais foram expostos à toxina, mas sim quando apenas um dos pais foi exposto.

REFERÊNCIAS

- ANDOW, D. A.; LÖVEI, G.L.; ARPAIA, S. Ecological risk assessment for Bt crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 7 p. 749–751, jul. 2006.
- ANDOW, D. A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Italy, v. 4, p. 142- 200, 2008.
- BERNARDI, O. et al. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015.
- BLANCO, C. A. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Current Opinion in Insect Science**, Ohio, v. 15, p. 131-138, May. 2016.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 423-431, Feb. 2011.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Elmsford, v. 49, n. 4, p. 423-435, Mar. 2007.
- CHAPMAN, R. F. **Reproductive system: male**. In: CHAPMAN, R. F (Ed). *The Insects Structure and Function*. 4 th edition., 1998, p. 268-292.
- CHEN, Y. et al. Bt rice expressing Cry1Ab does not stimulate an outbreak of its non-target herbivore, *Nilaparvata lugens*. **Transgenic Research**, London, v. 21, n. 2, p. 279–291, Apr. 2012.
- CRUZ-LANDIM, C. O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP (Apida, Meliponinae). **Naturalia**, São Paulo, v.8, [S.I.], p.7-23, 1983.
- DEVOS Y. et al. Bt-maize event MON88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organism. **Transgenic Research**, London, v. 21, n.6, p. 1191–1214, Dec. 2012.
- DUFFEY, S. S. Sequestration of plant natural products by insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 25, p. 447-477, 1980.
- DUSSOURD, D. E. et al. Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 85, n. 16, p. 5992-5996, Aug. 1988.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, n. 0261-2194, p.150-158, June 2014.
- FARIAS, J. R. et al. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, n. 5, p. 974-979, Jul. 2015.

- FARIAS, J. R. et al. Frequency of Cry1F Resistance Alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, n. 12, p. 2295-2302, Dec. 2016.
- FERRY, N. et al. Biotrophic and tritrophic effects of Bt Cry3A transgenic potato on beneficial, non-target, beetles. **Transgenic Research**, London, v. 16, n. 6, p. 795–812, Dec. 2007.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports**, Ahmedabad, v. 6, n. 34864, p. 1-8, Oct. 2016a.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 109, n. 2, p. 854-859, Apr. 2016b.
- HUANG, F. et al. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 11, e112958, Nov. 2014.
- KILBY, B. A. Intermediary metabolism and the insect fat body. **Biochemical Society Symposia**, London, v. 25, p. 38-49, 1965.
- LAWO, N. C.; WÄCKERS, F. L.; ROMEIS J. Characterizing indirect prey-quality mediated effects of a Bt crop on predatory larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, n. 11, p. 1702–1710, Nov. 2010.
- LEITE, N. A. et al. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in Brazilian strain of fall armyworm. **The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata**, Netherland, v. 158, n. 3, p. 236-247, Feb. 2016.
- LI, Y. H.; ROMEIS J. Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. **Biological Control**, Orlando, v. 53, n. 3, p. 337–344, June 2010.
- LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 36, n. 3, Mar. 1968.
- MONNERAT, R. et al. Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to modified Bt Toxins. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 4, e0119544, Apr. 2015.
- OBRIST, L.B. et al. Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. **Biological Control**, Orlando, v. 51, n. 1, p. 31–48, Feb. 2006.
- PAULA, D. et al. Uptake and transfer of a Bt toxin by a Lepidoptera to Its eggs and effects on its offspring. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-7, Apr. 2014.

PAULA, D. P. et al. Limitations in dose–response and surrogate species methodologies for risk assessment of Cry toxins on arthropod natural enemies. **Ecotoxicology**, New York, v. 25, n. 3, p. 601-607, Feb. 2016.

PAULA, D. P.; SOUZA, L. M.; ANDOW, D. A. Sequestration and transfer of Cry Entomotoxin to the eggs of a predaceous ladybird Beetle. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. 1-12, Dez. 2015.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA TS. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A. S.; LEA, A. O. Internalized proteins directed into accumulative compartments of mosquito oocytes by the specific ligand, vitellogenin. **Tissue and Cell**, Essex, v. 18, n. 4, p. 559-574, Apr. 1986.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 1, p. 63–71, Jan. 2006.

ROMEIS J.; MEISSLE M. Non-target risk assessment of Bt crops-Cry protein uptake by aphids. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 135, n. 1-2, p. 1–6, Jun. 2011.

ROSA, A. P. A. DA. et al. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em linhagens de milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 39-45, jan-mar. 2012.

SANTOS-AMAYA, O. F. et al. Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, Sussex. v. 73, n. 1, p. 35-43, Jun. 2016.

STORER, N.P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, Aug. 2010.

STORER, N.P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, Lanham, v. 110, n. 3, p. 294-300, Jul. 2012.

TELFER, W. H.; KUNKEL, J. G. The function and evolution of insect storage hexamer. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 205-228, 1991.

TORRES, J. B, RUBERSON JR. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 3, p. 345–354, Jun. 2008.

VÉLEZ, A. M. et al. Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin. v. 138, n. 5, p. 315-325, Jun. 2014.

ARTIGO 2

**COMPORTAMENTO DE PREDACÃO DE *ORIUŠ INSIDIOSUS* (SAY, 1832)
(HEMIPTERA: ANTHOCORIDAE) E *DORU LUTEIPES* (SCUDDER, 1876)
(DERMAPTERA: FORTICULIDAE) SOBRE LAGARTA-DO-CARTUCHO
RESISTENTE À PROTEÍNA CRY1F**

**PREDATORY BEHAVIOR OF *ORIUŠ INSIDIOSUS* (SAY, 1832) (HEMIPTERA:
ANTHOCORIDAE) AND *DORU LUTEIPES* (SCUDDER, 1876) (DERMAPTERA:
FORTICULIDAE) ON CRY1F PROTEIN-RESISTANT FALL ARMYWORM**

RESUMO

As interações ecológicas, incluindo as relações toxicológicas entre agentes de controle biológico e culturas geneticamente modificadas (GM), são importantes para as discussões relativas à compatibilidade de culturas GM com as estratégias de MIP. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de predação e capacidade predatória de *Orius insidiosus* e *Doru luteipes* sobre ovos e lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda* resistentes à proteína Cry1F expressa em milho Bt em laboratório e casa de vegetação. O tempo de busca e capacidade de predação de ovos de *S. frugiperda* resistentes a proteína Cry1F foram determinados para ninfas de 1º, 3º e 5º ínstar de *O. insidiosus* e 1º, 3º e 4º de *D. luteipes*. Para a avaliação com lagartas neonatas foram determinados para ninfas de 3º e 5º ínstar de *O. insidiosus* e 3º e 4º de *D. luteipes* e como testemunha foram utilizados ovos e lagartas de *S. frugiperda* suscetível à esta proteína. Para determinar o tempo de busca foi utilizado um cronômetro disparado até a captura da primeira presa e a capacidade de predação através da contagem das presas remanescentes após 24 horas. Para o experimento de avaliação de injúrias foram utilizados o milho TC1507 e o milho convencional isogênico TC1507 como controle. Combinando-se o milho Bt ou convencional com cinco lagartas e um predador *O. insidiosus* e/ou *D. luteipes* por planta. As injúrias foram avaliadas 7, 14 e 21 dias após a infestação de lagartas com escala de injúrias com notas de um a cinco. Os predadores não foram capazes de distinguir entre presas resistentes ou suscetíveis nos dois estádios avaliados (ovos e lagartas) considerando o tempo de busca e o consumo. Não houve diferença significativa para o tempo de busca e capacidade de predação entre *O. insidiosus* e *D. luteipes* predando ovos e lagartas de *S. frugiperda* resistente ou suscetível. No entanto, verificou-se diferença significativa para capacidade de predação entre os diferentes ínstars dos predadores. Ambos os predadores nos primeiros ínstars predaram um menor número de ovos. Quanto às injúrias, onde havia a presença dos predadores a nota foi significativamente menor do que na ausência. Assim, na presença dos predadores observaram-se menores injúrias da lagarta mesmo quando essa era resistente à proteína Cry1F, podendo ser, portanto ferramentas para o manejo da resistência desta praga.

Palavras chave: Resistência. Controle biológico. Predadores.

ABSTRACT

The ecological interactions, including toxicological relations between biological control agents and genetically modified crops (GM), are important for discussions related to GM crops compatibility with IPM strategies. The goal of this study was evaluate the predatory behavior and capacity of *Orius insidiosus* and *Doru luteipes* on *Spodoptera frugiperda* eggs and neonates resistant to the Cry1F protein expressed in Bt maize, in laboratory and greenhouse. The search time and capacity of predation of *S. frugiperda* eggs resistant to Cry1F protein were determined for nymphs of first, third and fifth instars for *O. insidiosus* and first, third and fourth for *D. luteipes*. For the evaluation of neonates were determined for nymphs of third and fifth instars for *O. insidiosus* and third and fourth for *D. luteipes*. As control, eggs and larvae of the susceptible *S. frugiperda* were used. To determine the search time, a triggered timer was used until the capture of the first prey and the predation capacity by counting the remaining prey after 24 hours. For the injury evaluation experiment, the maize TC1507 and the isogenic conventional maize TC1507 were used as control, matching the Bt or conventional maize with five neonates larvae and one predator *O. insidiosus* and/or *D. luteipes* per plant. The injuries were assessed 7, 14 e 21 days after larvae infestation, with scale of injuries with notes from one to five. The predators were not able to distinguish between resistant preys or susceptible preys on the two evaluated phases (eggs and larvae) considering search time and consume. There was not a significant difference for search time and predatory capacity between treatments where *O. insidiosus* and *D. luteipes* were preying on resistant or susceptible *S. frugiperda* eggs and larvae. However, there was a significant difference for predatory capacity between different instars of predators. Both predators in the first instars were preying on a smaller number of eggs. As for the injury evolution caused by *S. frugiperda*, where there was predator presence, the grade was significantly smaller than in the absence. Thus, the use of *O. insidiosus* and *D. luteipes* promoted a decrease of larvae injury even when it was resistant to the Cry1F protein, being, this way, an instrument for resistance pest management.

Key-words: Resistance. Biological control. Predators.

1 INTRODUÇÃO

O sistema tropical de cultivo tem favorecido a presença de plantas hospedeiras para pragas polífagas durante a maior parte do ano, a chamada ponte verde, através do plantio sucessivo ou concomitantemente de diferentes culturas hospedeiras, tornando seu controle cada vez mais difícil. Nesse sentido o uso do manejo integrado de pragas (MIP), que preconiza o uso simultâneo de diferentes estratégias de manejo, tem sido cada vez mais fomentado na busca de maior sustentabilidade no sistema de cultivo.

Uma das pragas mais polífagas dos sistemas tropicais de cultivo de grande importância nas Américas é *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (BOREGAS et al., 2013; GOERGEN et al., 2016). A lagarta do cartucho é considerada a principal praga do milho, reduzindo a produção de grãos em até 34% (CRUZ, 1995; FIGUEIREDO; DIAS; CRUZ 2006).

A introdução da tecnologia de culturas Bt tem contribuído para uma mudança na redistribuição da importância econômica das espécies-pragas nas lavouras. O milho Bt foi liberado na safra de 2008/2009 e desde então o controle de lepidópteros-praga vem sendo realizado, principalmente por esta tecnologia, o que diminui potencialmente os impactos pelo uso de inseticidas (STORER et al., 2010, 2012).

Com a utilização do milho Bt devem ser fomentadas a aplicação conjunta de estratégias de MIP para viabilizar a tecnologia por um maior período, sobretudo ao considerar os casos de quebra da resistência de *S. frugiperda* às proteínas Cry expressas em milho (FARIAS et al., 2014; STORER et al., 2010; HUANG et al., 2014). É crescente a demanda por estudos com insetos resistentes às proteínas presentes em plantas Bt, tanto para aumentar o nível de compreensão da evolução da resistência, quanto para adequar novas estratégias de manejo de resistência de insetos (MRI) e MIP (BERNARDI et al., 2015). Nesse contexto os inimigos naturais representam papel estratégico para o controle de pragas (VAN LENTEREN, 2012).

A possibilidade de associação com o controle biológico é desejável por ser de baixo custo, explorar outros sítios de ação e ser sustentável. Com isto, são necessários estudos da interação de pragas e seus inimigos naturais em culturas geneticamente modificadas (GM) com resistência a insetos.

A lagarta-do-cartucho possui inimigos naturais como *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae) e *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forficulidae). Estes

predadores são eficientes consumidores de ovos e lagartas pequenas atuando como importantes agentes de controle (ALBAJES et al., 2003; SILVEIRA; BUENO; VAN LENTEREN, 2004; CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995; FIGUEIREDO; DIAS; CRUZ, 2006; CRUZ, 2007; PASSINI; PARRA; LOPES, 2007; ARAÚJO, et al., 2011; MENDES et al., 2012b; MOSCARDINI et al., 2013; WONG; FRANK, 2013).

A predação é uma das interações ecológicas mais importantes para estabilidade dos agroecossistemas, uma vez que predadores são mais generalistas em relação aos parasitoides, muitos deles onívoros, o que faz com que consigam se estabilizar na área por mais tempo (SCHRIJVER et al., 2016).

No Brasil, a espécie do gênero *Orius* mais abundante e de maior potencial para utilização em programas de controle biológico é *O. insidiosus* (MENDES et al., 2012a). Já *D. luteipes* é uma espécie de predador de clima tropical e possui importância no Brasil, sendo relevante no controle da lagarta-do-cartucho no campo, mesmo em milho Bt (REIS et al., 1988; CRUZ, 1995).

As interações ecológicas entre agentes de controle biológico e culturas geneticamente modificadas, são importantes para as discussões relativas à compatibilidade de culturas geneticamente modificadas com as estratégias de MIP. Embora os impactos no campo das culturas GM e do controle biológico sejam difíceis de prever, eles são uma consideração fundamental ao incorporar as culturas GM em sistemas de manejo de pragas juntamente com o controle biológico (LUNDGREN et al., 2009; SCHRIJVER et al., 2016).

Os inimigos naturais podem retardar a evolução da resistência a proteínas Bt em organismos alvo (LIU et al., 2014). No entanto, a maioria dos estudos tritróficos com presas expostas a proteínas Bt e efeitos sobre seus inimigos naturais são realizados através da avaliação das variáveis biológicas (ROMEIS et al., 2013). Com isto, estudos de comportamento destes inimigos naturais ainda são incipientes, mas as respostas dessas interações podem levantar questões e resultados importantes relativas à mudança de comportamento de organismos não alvo a plantas GM. Estudos de comportamento de predação e capacidade predatória podem subsidiar o MIP com a utilização simultânea de culturas Bt e o controle biológico.

Protocolos estabelecidos por Romeis et al. (2013) ; Schrijver et al. (2016) mostram uma lista de características a serem avaliadas em insetos benéficos, sobretudo inimigos naturais como organismos não alvo. Mendes et al. (2012a) consideram que o comportamento de predação também pode ser alterado em função da utilização de plantas Bt e propõe novas metodologias que levam em consideração parâmetros comportamentais de predação.

Estudos com espécies substitutas para avaliar o impacto de plantas em organismos não alvo ou presas artificiais são utilizados (CARSTENS et al., 2014; LÖVEI; FERRANTE, 2016; WELCH et al., 2016). No entanto, segundo as normativas da CTNBio nº 6 de 2008 e nº 8 de 2009, a avaliação de risco em não alvos deve ser realizada caso a caso.

Souza (2017) demonstrou a passagem da proteína Cry1F do milho para a primeira geração de *S. frugiperda* (segundo nível trófico), e essa constatação pode ter influência na interação trófica com o terceiro nível, como os inimigos naturais. Nesse sentido o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade predatória e o comportamento de predação de *O. insidiosus* e *D. luteipes* sobre ovos e lagartas recém eclodidas de *S. frugiperda* resistente à proteína Cry1F expressa em milho Bt, bem como o potencial de utilização desses agentes de CB para redução da injúria causada por essa praga e manejo da resistência.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A criação dos insetos e a realização dos bioensaios foram conduzidas no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas-MG.

2.1 Criação dos insetos

A criação de *S. frugiperda* foi realizada de acordo com o descrito por Cruz (2000) em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa. Lagartas neonatas foram transferidas para copos plásticos de 50 ml contendo dieta artificial de acordo com Parra (1996). Após cinco dias foram individualizadas em copos de 50 ml contendo dieta artificial e vedadas com tampas de acrílico até a emergência do adulto. As lagartas neonatas de *S. frugiperda* selecionadas quanto à resistência à proteína Cry1F foram mantidas de acordo com Leite et al. (2016).

A criação de *O. insidiosus* foi mantida de acordo com metodologia proposta por Bueno (2000) e Mendes e Bueno (2001). Os insetos utilizados nos testes foram criados em placas de Petri (20 cm de diâmetro) contendo local de abrigo (papel toalha), fonte de água (algodão umedecido) e alimento (ovos de *Ephestia kuehniella* (Zeller) *ad libitum*).

A criação de *D. luteipes* foi realizada de acordo com Cruz (2000) em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa.

2.2 Tempo de busca e capacidade de predação

O tempo de busca e capacidade de predação foi realizado com ninfas de *D. luteipes* de 1º, 3º e 4º ínstars e *O. insidiosus* de 1º, 3º e 5º alimentados com ovos de *S. frugiperda* oriundos de população resistente à proteína Cry1F, ou de população suscetível à Cry1F como testemunha. O tempo de busca e capacidade de predação também foi realizado com ninfas de *D. luteipes* de 3º e 4º ínstars e *O. insidiosus* de 3º e 5º, alimentados com lagartas neonatas de *S. frugiperda* da população resistente ou suscetível à proteína Cry1F, totalizando 20 tratamentos com 22 repetições (TABELA 1) O tempo de busca foi avaliado com a ajuda de um cronômetro, quando o predador foi colocado na placa, o cronômetro foi disparado até ele preda a primeira presa, então o tempo foi registrado. Após 24 horas, foi contabilizado o número de presas consumidas neste intervalo de tempo para saber a capacidade de predação. O número de presas oferecidas foi de acordo com o predador e o ínstar correspondente

(TABELA 1). Os ovos foram separados das posturas com o auxílio de um pincel de cerdas finas para a contagem. Foi realizado um pré-teste para que essa quantidade de presas oferecidas fossem de forma *add libitum*. Para o bioensaio com lagartas foi adicionado na placa além do algodão umedecido, um pedaço de folha de milho não Bt para garantir a sobrevivência das lagartas não predadas.

As placas foram vedadas com plástico filme e adicionou-se um pedaço de algodão umedecido de aproximadamente 2,0 x 1,0 cm para evitar o ressecamento. Vinte e quatro horas antes do experimento os predadores foram mantidos em jejum, apenas com algodão umedecido. Após 24 horas, os ovos não consumidos foram contabilizados para verificar a capacidade de predação. Como testemunha, em cada placa foram colocadas somente as lagartas, a folha de milho e o algodão umedecido. Após 24 horas precedeu-se a avaliação de sobrevivência das lagartas.

Tabela 1 – Relação entre ínstars dos predadores e tipo de presa fornecida, onde R= resistente e S= suscetível. Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ UR.

Tratamento	Predador	Ínstar	Presa (tipo)	Presa (n)	Estádio
Ensaio 1					
1	<i>D. luteipes</i>	1°	R	40	ovo
2	<i>D. luteipes</i>	1°	S	40	ovo
3	<i>D. luteipes</i>	3°	R	80	ovo
4	<i>D. luteipes</i>	3°	S	80	ovo
5	<i>D. luteipes</i>	4°	R	80	ovo
6	<i>D. luteipes</i>	4°	S	80	ovo
7	<i>D. luteipes</i>	3°	R	15	Lagarta
8	<i>D. luteipes</i>	3°	S	15	Lagarta
9	<i>D. luteipes</i>	4°	R	50	Lagarta
10	<i>D. luteipes</i>	4°	S	50	Lagarta
Ensaio 2					
1	<i>O. insidiosus</i>	1°	R	10	ovo
2	<i>O. insidiosus</i>	1°	S	10	ovo
3	<i>O. insidiosus</i>	3°	R	10	ovo
4	<i>O. insidiosus</i>	3°	S	10	ovo
5	<i>O. insidiosus</i>	5°	R	10	ovo
6	<i>O. insidiosus</i>	5°	S	10	ovo
7	<i>O. insidiosus</i>	3°	R	10	Lagarta
8	<i>O. insidiosus</i>	3°	S	10	Lagarta
9	<i>O. insidiosus</i>	5°	R	12	Lagarta
10	<i>O. insidiosus</i>	5°	S	12	Lagarta

Fonte: Do autor (2017).

2.3 Injúria causada por *S. frugiperda* resistentes a proteína Cry1F em milho Bt na presença e ausência de predadores

O bioensaio foi instalado em uma casa-de-vegetação em 30 de maio de 2016 na Embrapa Milho e Sorgo, (25 ± 5 °C, $70 \pm 15\%$ UR). Para o experimento, utilizou-se o milho Herculex® evento TC1507, que expressa a proteína Cry1F, e o milho convencional isogênico TC1507 como controle. Para o milho Bt foram feitas as seguintes combinações: 1) lagartas + *O. insidiosus*, 2) Lagartas + *D. luteipes*, 3) Lagartas + *O. insidiosus* + *D. luteipes* e 4) lagartas apenas (testemunha) e o milho convencional somente com lagartas para comparação de milho Bt e não Bt. Nos tratamentos de milho Bt foram utilizadas lagartas resistentes à proteína Cry1F, e nos demais, lagartas suscetíveis, a fim de avaliar interação de populações resistentes e suscetíveis com predadores, totalizando cinco tratamentos (TABELA 2).

Tabela 2- Tratamentos testados na casa de vegetação para notas de injúria de *Spodoptera frugiperda* com relação de predadores por planta, onde R=resistente e S=suscetível. Temperatura 25 ± 2 °C, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ UR.

Tratamento	Milho	Presença	Predador/planta
1	Cry1F	Lagarta R	1 <i>D. luteipes</i>
2	Cry1F	Lagarta R	1 <i>O. insidiosus</i>
3	Cry1F	Lagarta R	1 <i>D. luteipes</i> + 1 <i>O. insidiosus</i>
4	Cry1F	Lagarta R	Sem predadores
5	Convencional	Lagarta S	Sem predadores

Fonte: Do autor (2017).

Para cada tratamento foram utilizados 12 vasos de 20 litros com solo fertilizado com 50 g de NPK 08-28-16 e 0,3% de Zn / 100 kg.v. Cada vaso foi considerado uma repetição, no qual foram deixadas três plantas. Quando estas estavam no estágio V6 (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1986), foram infestadas manualmente com cinco larvas neonata/planta. Os vasos foram cobertos com gaiola de tecido *voil.* e após 24 horas foram liberados os predadores de 3º ínstar, de acordo com a Tabela 2.

As avaliações foram feitas através de notas de injúrias de acordo com escala proposta por Carvalho (1970), realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a infestação das lagartas. As notas foram de 0 (zero) a 5 (cinco), onde: 0 = plantas sem injúria; 1 = plantas com folhas raspadas; 2 = plantas com folhas perfuradas; 3 = plantas com lesões nas folhas e caule; 4 = plantas com caule quase destruído; e 5 = plantas com muitas folhas e caule totalmente destruídos. No 21º dia após a infestação das lagartas, também foi avaliado o número de lagartas/vaso, verificando a sobrevivência e biomassa.

2.4 Análises Estatísticas

Os ensaios de tempo de busca e capacidade de predação foram realizados em esquema fatorial, sendo considerado o estágio de desenvolvimento da presa como um fator e o estágio de desenvolvimento do predador outro fator. Para tanto avaliou-se a interação entre os fatores. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. No ensaio da casa de vegetação foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. Para a variável sobrevivência e biomassa das lagartas encontradas nos vasos após os 21 dias, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As notas de injúria foram avaliadas pelo intervalo de confiança à 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Tempo de busca e capacidade de predação

Não houve diferença significativa para o tempo de busca de *O. insidiosus* em ovos de *S. frugiperda* resistentes ou suscetíveis e entre os diferentes ínstaes do predador. Para a capacidade de predação de *O. insidiosus* também não houve diferença significativa entre os tipos de presas. No entanto, houve diferença entre os ínstaes, pois no 1º *O. insidiosus* predou um número menor de ovos em relação aos 3º e 5º ínstaes em 24 horas (TABELA 3).

Houve diferença significativa para o tempo de busca de *O. insidiosus* em lagartas neonatas de *S. frugiperda* apenas em relação aos ínstaes. Para o 3º ínstar o tempo foi estatisticamente maior em relação ao 5º ínstar. Para a capacidade de predação de *O. insidiosus* sobre lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* não houve diferença significativa entre os tratamentos nem entre os ínstaes. (TABELA 3).

Tabela 3 - Tempo de busca em segundos e capacidade de predação de *Orius insidiosus* em ovos e lagartas de *Spodoptera frugiperda* resistente e suscetível a proteína Cry1F. Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotofase e $60 \pm 10\%$ UR.

Ínstar	Tempo		Predação (número de presas consumidas)	
	Ovos		Lagartas	
	Resistente (n.s)	Suscetível (n.s)	Resistente	Suscetível
1º	784,82 ± 178,23	735,00 ± 174,99	1,50 ± 0,13 b	1,55 ± 0,11 b
3º	398,00 ± 106,14	602,41 ± 212,92	2,32 ± 0,20 a	2,64 ± 0,27 a
5º	957,55 ± 210,42	551,77 ± 132,37	3,09 ± 0,27 a	2,95 ± 0,28 a
	Resistente	Suscetível	Resistente (n.s)	Suscetível (n.s)
3º	703,95 ± 150,77 a	555,95 ± 142,54 a	3,50 ± 0,22	3,73 ± 0,20
5º	258,55 ± 102,79 b	190,36 ± 34,89 b	3,91 ± 0,47	4,64 ± 0,39

n.s. Não significativo pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), enquanto que letras diferentes na mesma coluna se diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Fonte: Do autor (2017).

Para *D. luteipes*, não houve diferença significativa entre o tempo de busca para ambas as presas, ovos e lagartas (resistentes e suscetíveis). Para a capacidade de predação de *D. luteipes* não houve diferença significativa entre as presas resistentes ou suscetíveis, mas sim entre os ínstaes. Verificou-se diferença significativa entre os ínstaes na capacidade de predação em ambas as presas. Nos primeiros ínstaes houve uma menor capacidade de predação em relação ao último ínstar (TABELA 4).

Tabela 4 - Tempo de busca em segundos e capacidade de predação de *Doru luteipes* em ovos e lagartas de *Spodoptera frugiperda* de população resistente e suscetível à proteína Cry1F. Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotoperíodo e $60 \pm 10\%$ UR.

Ínstar	Tempo		Predação (número de presas consumidas)	
	Ovos			
	Resistente (n.s)	Suscetível (n.s)	Resistente	Suscetível
1 ^o	114,00 \pm 38,58	97,64 \pm 50,42	16,09 \pm 0,96 c	17,86 \pm 1,00 c
3 ^o	65,55 \pm 14,84	58,68 \pm 17,34	28,68 \pm 1,60 b	24,64 \pm 1,70 b
4 ^o	32,86 \pm 6,66	30,82 \pm 11,17	70,32 \pm 2,60 a	67,68 \pm 2,69 a
	Tempo		Predação	
	Lagartas			
	Resistente (n.s)	Suscetível (n.s)	Resistente	Suscetível
3 ^o	30,68 \pm 12,61	213,64 \pm 84,55	12,18 \pm 0,55 b	10,18 \pm 0,69 b
4 ^o	91,55 \pm 46,88	86,41 \pm 37,41	41,05 \pm 2,36 a	43,09 \pm 1,42 a

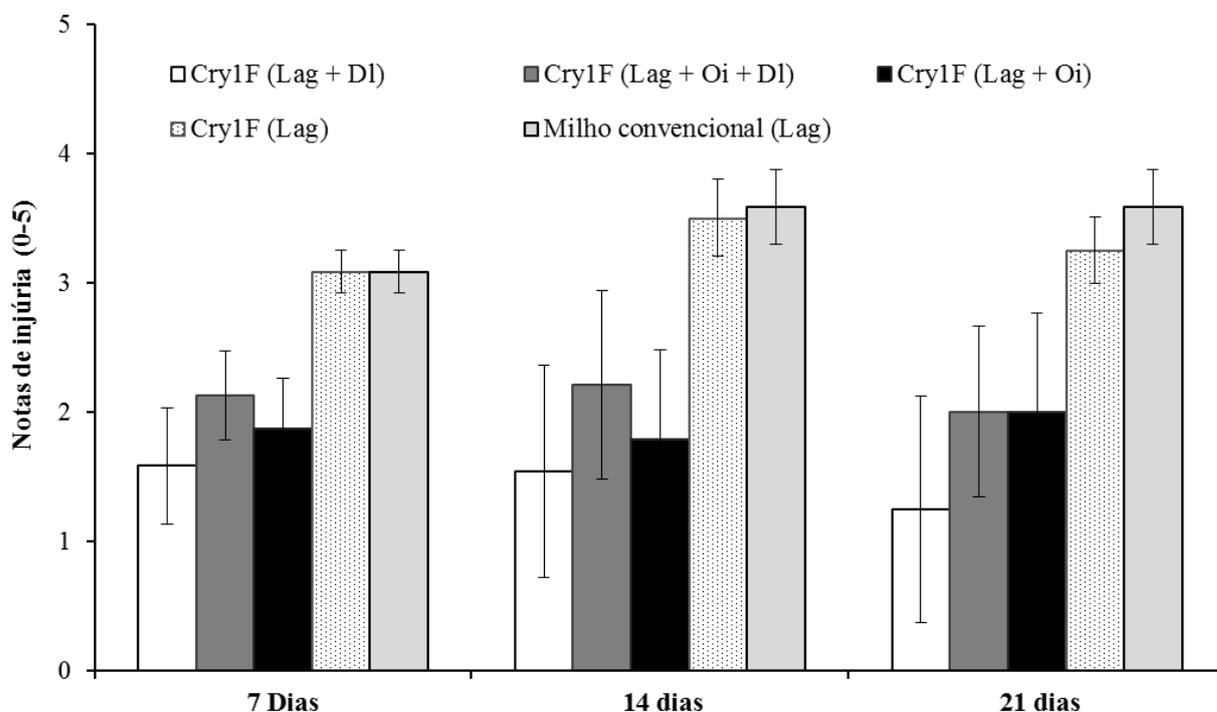
n.s. Não significativo pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), enquanto que letras diferentes na mesma coluna se diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Fonte: Do autor (2017).

Para a testemunha a sobrevivência larval foi entre 95-98%, indicando que praticamente não houve mortalidade natural das lagartas, motivo pelo qual o consumo de lagartas medidos no presente ensaio aproximou-se do real.

3.2 Injúria causada por *S. frugiperda* resistentes à proteína Cry1F em milho Bt na presença e ausência de predadores

Houve diferença significativa entre os tratamentos no ensaio de injúria (FIGURA 1). As notas de injúria em milho Bt somente com lagartas resistentes à proteína Cry1F e o milho convencional com lagartas suscetíveis foram significativamente maiores do que nos tratamentos com milho Cry1F com lagartas e inimigos naturais, nos três intervalos avaliados. No tratamento com milho Cry1F somente com lagartas resistentes a nota de injúria teve um aumento da primeira à última avaliação, não diferindo estatisticamente do tratamento com milho convencional com lagartas suscetíveis que apresentou um aumento na nota de dano no segundo dia de avaliação (aos 14 dias). Quando somente *O. insidiosus* estava presente a maior nota apresentada foi aos 21 dias de avaliação.

Figura 1- Notas de injúria na escala de 0-5 em plantas de milho para *Spodoptera frugiperda* em 7, 14 e 21 dias após a infestação de lagartas recém-eclodidas na presença e ausência de predadores, onde: Cry1F = milho Bt TC1507; Lag = lagartas; Oi = *Orius insidiosus* e Dl = *Doru luteipes*. Intervalos entre barras sobrepostas, não se diferem pelo intervalo de confiança ($P < 0,05$). Temperatura 25 ± 5 °C, 12 horas de fotofase e $70 \pm 15\%$ UR.



Fonte: Do autor (2017).

No tratamento em que somente *D. luteipes* estava presente, a nota de dano foi reduzindo da primeira avaliação até a última, aos 7, 14 e 21 dias. E quando ambos os predadores estavam presentes esta nota teve um pequeno aumento na segunda avaliação e voltou a diminuir na última avaliação aos 21 dias (FIGURA 1).

Em relação à sobrevivência das lagartas após 21 dias (TABELA 5), houve diferença significativa entre os tratamentos. Para o tratamento com milho Cry1F com lagartas resistentes juntamente com *D. luteipes*, *O. insidiosus* e ambos os predadores a sobrevivência das lagartas foi significativamente menor em relação aos tratamentos com milho convencional somente com lagartas suscetíveis e milho Cry1F somente com lagartas resistentes. Quanto à biomassa das lagartas sobreviventes não houve diferença significativa entre os tratamentos (TABELA 5).

Tabela 5 - Sobrevivência (%) e Biomassa (mg) de *Spodoptera frugiperda* após 21 dias, onde: HX = Cry1F (milho TC1507), Lg = lagartas; Oi = *Orius insidiosus* e Dl = *Doru luteipes*. Temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 horas de fotoperíodo e $60 \pm 10\%$ UR.

Tratamentos	% Sobrevivência	Biomassa (mg)
HX (Lg + Dl)	$6,11 \pm 3,01$ b	$172,60 \pm 49,30$ a
Hx (Lg + Oi)	$12,78 \pm 4,38$ b	$239,43 \pm 26,97$ a
HX (Lg + Oi + Dl)	$8,33 \pm 2,34$ b	$273,56 \pm 30,75$ a
HX (Lg)	$21,11 \pm 3,05$ a	$282,56 \pm 20,60$ a
Milho convencional (Lg)	$22,00 \pm 3,56$ a	$355,65 \pm 36,91$ a

Médias seguidas pela mesma letra na mesma variável não se diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Fonte: Do autor (2017).

4 DISCUSSÃO

O tempo de busca de *O. insidiosus* e *D. luteipes* para ovos de *S. frugiperda* foi o mesmo independentemente do ínstar dos predadores e de todas as combinações feitas (TABELA 3 e 4). Isto mostra a habilidade de predação de ambos os predadores para esse estágio de desenvolvimento. Como os ovos não apresentam reação de defesa ao comportamento de predação pode-se inferir que a única dificuldade no processo de busca e captura da presa é a detecção da mesma.

Já para ambas as espécies de predador em ínstars mais avançados, observou-se uma maior capacidade de predação, com um maior consumo de ovos. Isto era esperado, pois à medida que um inseto cresce, sua necessidade de alimento aumenta (CRUZ, ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995; REIS et al., 1988; MENDES; BUENO, 2001; MENDES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008).

Quando as presas foram lagartas neonatas de *S. frugiperda* o tempo de busca para os diferentes ínstars de *O. insidiosus* foi diferente. Isto pode ser explicado pelo fato das lagartas apresentarem reação de defesa ao comportamento de predação. Essa dificuldade pode ser ainda maior nos ínstars mais novos, uma vez que *O. insidiosus* é um inseto pequeno, medindo na fase adulta aproximadamente 2,5 mm, quase do mesmo tamanho de sua presa. No caso de insetos de 5º instar este problema diminuiu (TABELA 3).

Esse comportamento também foi observado por Mendes et al. (2012b) para esse predador para lagartas que se alimentaram do milho Cry1Ab. Os autores atribuíram uma maior facilidade de predação das lagartas que se alimentaram do milho Bt, uma vez que esse evento é de baixa dose (Sousa et al., 2016) e resulta em comportamentos sub letais, deixando as lagartas mais suscetíveis à predação. No entanto, no trabalho de Mendes et al. (2012b), ambos os predadores não diferiram entre presas alimentadas ou não com o milho Bt Cry1Ab, pois as lagartas apresentaram o mesmo desenvolvimento. Para o presente estudo, como as lagartas utilizadas eram de uma população resistente à proteína Bt Cry1F, elas não apresentam redução no desenvolvimento, nem efeitos sub letais e tampouco apresentam diferença na reação à predação. Isso reforça a necessidade de haver estudos de biossegurança para liberação de cultivos GM (normativas nº 6 de 2008 e nº 8 de 2009, CTNBio).

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura (ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006; ROMEIS et al., 2008; MENDES et al., 2012a; LEITE et al., 2014; TIAN et al., 2015; PAULA et al., 2016) apresentam resultados, em geral, diferentes dos obtidos neste estudo, pois avaliaram efeitos diretos e indiretos de culturas Bt em organismos não alvo utilizando

presas suscetíveis e que se alimentaram da planta Bt momentos antes da exposição aos seus predadores.

Em nosso caso, as presas foram provenientes de genitores resistentes, portanto não precisaram se alimentar da toxina em sub dosagens, e os predadores não foram expostos a insetos tratados com presas de qualidade nutricional baixa por ser suscetível à proteína (NARANJO, 2009; ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006; LUNDGREN et al., 2009). Este é um método sugerido para retirar efeitos da qualidade do hospedeiro, o que permite que os resultados obtidos sejam próximos às condições reais de campo (ROMEIS et al., 2011; SHELTON et al., 2016).

Por exemplo, o predador *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Chrysopidae) foi afetado negativamente quando se alimentou de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) suscetíveis que se alimentaram com algodão Bt. Mas não quando se alimentaram desse lepidóptero resistente à proteína Cry1Ac presente no algodão Bt. Portanto, possivelmente a suscetibilidade a proteína gerou presas de baixa qualidade nutricional, que podem ter levado a alterações nos parâmetros biológicos do predador (LAWO et al., 2010).

Em nosso trabalho o predador *D. luteipes* teve a mesma habilidade de predação para ambos os estádios de desenvolvimentos das presas ovos e lagartas, diferentemente de *O. insidiosus* que teve maior dificuldade em predação lagartas no 3º ínstar. Isto era esperado, uma vez que *D. luteipes* tem em média 13 mm de comprimento (REIS et al., 1988), o que equivale a um tamanho até dez vezes maior do que *O. insidiosus*, deixando uma vantagem sobre este predador nesta interação predador-presa. Leite et al. (2014), encontrou dados diferentes para o tempo de busca de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) com lagartas de *S. frugiperda* entre três e sete dias de idade. Neste caso, o tempo de busca foi maior à medida que o ínstar do predador aumentou, o que significa que este comportamento de captura pode diferir entre predadores e entre presas de diferentes tamanhos. Reforçando a resolução da CTNBio (nº 6 de 2008 e nº 8 de 2009), onde a avaliação de risco em não-alvos deve ser realizada caso a caso.

A capacidade de predação de *D. luteipes* em lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* foi influenciada pelo desenvolvimento do predador, mas não pelo tipo de alimento (presas resistentes ou suscetíveis à Cry1F). O número de lagartas predadas foi maior no 5º ínstar, aumentando sua necessidade de alimento de acordo com o desenvolvimento do inseto. Esse predador também teve um consumo crescente em ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera, Noctuidae) de acordo com o ínstar. Cruz, Alvarenga e Figueiredo. (1995)

avaliaram o consumo diário de ovos em toda fase ninfal, sendo consumidos 45,3 ovos de *H. zea* por dia no 4º ínstar. Nossos resultados mostram que *D. luteipes* de 5º ínstar chegou a consumir em média 70 ovos e 43 lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* em 24 horas. Estes dados mostram a eficiência deste predador no consumo de ovos de duas importantes pragas do milho.

Mendes et al. (2012b) mostraram, em um teste de preferência, que *D. luteipes* optou por permanecer mais onde tinha lagartas que não se alimentaram de milho Bt Cy1Ab e Cry1F, mas o tempo de busca de ninfas de primeiro ínstar foi maior quando se tratava destas lagartas. Os autores sugerem que quando a lagarta se alimenta de milho Bt, torna-se mais suscetível ao ataque do predador, principalmente nesta fase mais jovem, onde ele tem maior dificuldade de capturar a presa.

No presente estudo *O. insidiosus* apresentou maior dificuldade em capturar as lagartas quando estava no 3º ínstar em relação ao 5º. Mas não foi influenciado pela presa ser resistente ou suscetível à proteína Bt, uma vez que ambas apresentavam mesmo comportamento de reação à predação e o mesmo desenvolvimento. Isto mostra que a agilidade de predação aumenta com o crescimento dessa espécie de predador. Contudo, ambos os ínstars de *O. insidiosus* avaliados consumiram um maior número de lagartas em relação aos ovos, mesmo que no 3º ínstar tenha mostrado uma maior dificuldade de captura em relação às lagartas, indicando preferência por esse estágio desenvolvimento da presa (MENDES et al., 2002; BUTLER; O' NEIL, 2006; CHOW; CHAU; HEINZ, 2010; YOO; O' NEIL, 2009; DOGRAMACI et al., 2011; PERDIKIS; FANTINOU; LYKOURESSIS, 2011; WONG; FRANK, 2013). O comportamento de busca e a capacidade de predação podem variar de acordo com o predador e suas presas, em culturas GM, e devem ser discutidas mais especificamente.

Experimentos com *Coleomegilla maculata* (DeGeer, 1775) (Coleoptera: Coccinellidae) se alimentando de *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) resistente à Cry2Ab e Cry1Ac, *S. frugiperda* resistente à proteína Cry1F e com *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) resistente à proteína Cry1Ac, não demonstraram efeito adverso nas variáveis biológicas dessa joaninha. Não houve diferença na escolha para alimentação de *P. xylostella* resistente ou suscetível à proteína Cry1Ac (LI et al., 2011; TIAN et al., 2012; LIU et al., 2015).

Os predadores *O. insidiosus*, *Geocoris punctipes* (Say, 1832) (Hemiptera: Geocoridae), *Zelus renardii* (Kolenati, 1856) (Hemiptera: Reduviidae) e *Chrysoperla rufilabris* (Steinmann, 1964) (Neuroptera: Chrysopidae) não apresentaram efeito negativo em

sua biologia ao se alimentarem de *T. ni* resistente à proteína Cry1Ac / Cry2Ab e *S. frugiperda* resistente à Cry1F (TIAN et al., 2013; TIAN et al., 2014; SU et al., 2015).

Os parasitoides *Cotesia plutellae* (Kurdjumo, 1912) (Hymenoptera: Braconidae) e *Diadegma insulare* (Cresson, 1865) (Hymenoptera: Ichneumonidae) também não diferenciaram o hospedeiro *P. xylostella* resistente à proteína Cry1Ac da suscetível e foram eficazes no controle dos dois tipos de hospedeiro (SCHULER et al., 2004; LIU et al., 2011). O parasitoide *Cotesia marginiventris* (Cresson, 1865) (Hymenoptera: Braconidae) também não teve nenhum aspecto biológico afetado ao se desenvolver em *S. frugiperda* resistente à Cry1F (TIAN et al., 2014). Nestes trabalhos citados houve o uso de presas suscetíveis, as quais foram “induzidas” a desenvolver resistência a proteínas Cry para avaliar efeitos em inimigos naturais. Corroboram com nossos resultados indicando que presas resistentes a proteínas Cry não comprometem a eficiência dos predadores *O. insidiosus* e *D. luteipes* e são compatíveis para a utilização no MRI em culturas Bt.

A presença de *D. luteipes* e *O. insidiosus*, separados ou juntos, reduziu as notas de injúria, pois a sobrevivência de lagatas foi maior onde não haviam predadores. Ambos apresentaram o mesmo comportamento de predação, com a mesma eficiência de controle em casa de vegetação, ao contrário do observado em laboratório. Em função disso, experimentos em semi campo (casa de vegetação) e campo são fundamentais para medir corretamente este comportamento de predação.

Para *P. nigrispinus* foi avaliado o dano causado por *S. frugiperda* suscetíveis através da nota de injúria por meio da escala de Carvalho (1970) em plantas Bt e não-Bt, na presença e na ausência do predador em casa de vegetação. O milho Bt controlou a lagarta do cartucho, mas a infestação de *P. nigrispinus* reduziu significativamente as notas de injúria até o último dia de avaliação (LEITE et al., 2014). Estes dados são semelhantes aos nossos resultados, mostrando que ação conjunta do milho Bt e de inimigos naturais pode favorecer o controle da lagarta do cartucho diminuindo o dano causado mesmo quando há lagartas resistentes. A ação de inimigos naturais poderia retardar a evolução da resistência, uma vez que mesmo com a presença mínima dos predadores (apenas um por planta) foi possível obter um controle eficiente da lagarta-do-cartucho resistente à proteína Cry1F.

Os resultados deste estudo mostram que, quando a resistência das lagartas à proteína existe, o dano se equivale ao provocado no milho convencional, mas a presença dos inimigos naturais ajuda no controle desta praga sem afetar o comportamento de predação dos mesmos. Como a capacidade de predação de *O. insidiosus* e *D. luteipes* nos diferentes estádios de

desenvolvimento de *S. frugiperda* não foi alterada pelo fato dessas serem ou não resistentes à proteína Cry1F, infere-se que os predadores não podem perceber a proteína Cry nas presas.

5 CONCLUSÕES

S. frugiperda resistente a proteína Cry1F não altera o comportamento de busca e capacidade de predação de *O. insidiosus* e *D. luteipes*.

A capacidade de predação aumenta com o desenvolvimento do predador independente da presa ser resistente ou suscetível.

A integração de milho Bt TC1507 com os predadores *O. insidiosus* e *D. luteipes* reduz significativamente as injúrias causadas por *S. frugiperda*, mesmo quando as lagartas são resistentes ao evento.

REFERÊNCIAS

- ALBAJES, R.; LÓPEZ, C.; PONS, X. Predatory fauna in corn fields and response to imidacloprid seed treatment. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 6, p. 1805–1813, Dec. 2003.
- ARAÚJO, L. F. de. et al. Flutuação populacional de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH), *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) e *Doru luteipes* (SCDDER) em milho convencional e transgênico *Bt*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 10, n. 3, p. 205-214, 2011.
- BERNARDI, O. et al. Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 76, p. 7-14, 2015.
- BOREGAS, K.G. B. et al. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 61-70, Abr. 2013.
- BUENO, V.H.P. 2000. **Desenvolvimento e multiplicação de percevejos predadores do gênero *Orius* Wolff**, p. 69-90. In V.H.P. Bueno (ed.), Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de qualidade. Lavras, Editora UFLA, 207p.
- BUTLER, C. D; O'NEIL, R. J. Life history characteristics of *Orius insidiosus* (Say) fed diets of soybean aphid, *Aphis glycines* Matsumura and soybean thrips, *Neohydatothrips variabilis* (Beach). **Biological Control, Orlando**, v. 40, n. 3, p. 339-346, Mar. 2006.
- CARSTENS, K. et al. Surrogate species selection for assessing potential adverse environmental impacts of genetically engineered insect-resistant plants on non-target organisms. **GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain**, Londres, v. 5, n. 1, p. 11-15, Jan-Feb-Mar. 2014.
- CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo**. 1970. 170p. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, 1970.
- CHOW, A; CHAU, A; HEINZ, K. M. Compatibility of *Amblyseius (Typhlodromips) swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) and *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) for biological control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on roses. **Biological Control, Orlando**, v. 53, n. 2, p. 188-196, May. 2010.
- CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, nov. 1995. 45 p. Circular Técnica 21, Embrapa Milho e Sorgo.
- CRUZ, I; ALVARENGA, C. D; FIGUEIREDO, P. E. F. Biologia de *Doru luteipes* (Scudder) e sua capacidade predatória de *Helicoverpa zea* (Boddie). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, 24, n. 2, p. 273-278, maio, 1995.

CRUZ, I. **Métodos de criação de agentes entomófagos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. In: __. BUENO, V. H. P. (Ed). Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: UFLA, p.112-114, 2000.

CRUZ, I. **Controle Biológico de pragas na cultura de milho na produção de conservas (mini-milho), por meio de parasitoides e predadores**. Ago. 2007. 16 p. Circular Técnica 91, Embrapa Milho e Sorgo.

CTNBio-COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Resolução normativa N° 6, de 6 de novembro de 2008. Disponível em < <http://ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas/>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

CTNBio -COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Resolução normativa N° 8, DE 03 DE JUNHO DE 2009. Disponível em < <http://ctnbio.mcti.gov.br/resolucoes-normativas/>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

DOGRAMACI, M. et al. Management of chilli thrips *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) on peppers by *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) and *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). **Biological Control**, Orlando, v. 59, n. 3, p. 340-347, Dez. 2011.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Guildford, v. 64, n. 0261-2194, p.150-158, June 2014.

FIGUEIREDO, M.L.C.; DIAS, A.M.P.M.; CRUZ, I. Associação entre inimigos naturais e *Spodoptera frugiperda* (j.e. smith, 1797) (lepidoptera: noctuidae) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 3, p. 340-350, dez. 2006.

GOERGEN, G. et al. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 10, p. 1-9, Oct. 2016.

HUANG, F. et al. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 11, e112958, Nov. 2014.

LAWO, N. C.; WÄCKERS, F. L.; ROMEIS J. Characterizing indirect prey-quality mediated effects of a Bt crop on predatory larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, n. 11, p. 1702–1710, Nov. 2010.

LEITE, N. A. et al. Does Cry1Ab maize interfere in the biology and behavioural traits of *Podisus nigrispinus*? **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 67, n. 2, p. 265-271, Dez. 2014.

LEITE, N. A. et al. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in Brazilian strain of fall armyworm. **The Netherlands Entomological Society Entomologia Experimentalis et Applicata**, Netherland, v. 158, n. 3, p. 236-247, Feb. 2016.

LÖVEI, G. L; FERRANTE, M. A review of the sentinel prey method as a way of quantifying invertebrate predation under field conditions. **Insect Science**, Elmsford, v. 23, n. 6, p. 1-15, Dec. 2016.

- LI, Y. et al. A Comprehensive Assessment of the Effects of Bt Cotton on *Coleomegilla maculata* Demonstrates No Detrimental Effects by Cry1Ac and Cry2Ab. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 11, e22185, Jul. 2011.
- LIU, X. et al. Effect of Bt broccoli and resistant genotype of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on development and host acceptance of the parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Transgenic Research**, v.20, n. 4, p. 887-897, Aug. 2011.
- LIU, X. et al. Effect of Bt broccoli and resistant genotype of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on life history and prey acceptance of the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Biological Control**, Orlando, v. 91, p. 55-61, Jul. 2015.
- LIU, X. et al. Natural Enemies Delay Insect Resistance to Bt Crops. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, e90366, Mar. 2014.
- LUNDGREN, J. G. et al. Ecological compatibility of GM crops and biological control. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 12, p. 1017–1030, Dez. 2009.
- MENDES, S.M. & V.H.P. BUENO. Biologia de *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) alimentado com *Caliothrips phaseoli* (Hood) (Thysanoptera: Thripidae). **Neotropical Entomology**, v. 30 p. 423-428, 2001.
- MENDES, S. M. et al. Type of prey influences biology and consumption rate of *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera, Anthocoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 99-103, Mar. 2002.
- MENDES, S. M. et al. Efeito da densidade de ninfas de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera, Aphididae) no consumo alimentar e aspectos biológicos de *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera, Anthocoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 19-24, Mar. 2003.
- MENDES, S. M. et al. **Avaliação de variáveis comportamentais como metodologia para estudo de organismos não alvo em milho Bt**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, dez. 2012b, 7 p. Circular Técnica 21, Embrapa Milho e Sorgo.
- MENDES, S. M. et al. Biological and behavioral aspects of of predator, *Orius insidiosus* (SAY, 1832) in Bt and non-Bt maize. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 753-761, Oct. 2012 a.
- MOSCARDINI, V. F. et al. Toxicity and sublethal effects of seven insecticides to eggs of the flower bug *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). **Chemosphere**, Oxford, v. 92, n. 5, p. 490-496, Jul. 2013.
- NARANJO, S. E. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns.- **CAB reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Wallingford, v. 4, n. 11, p. 1-11, Jan. 2009.
- OLIVEIRA, J. E. M. et al. Efeito de cultivares de algodoeiro sobre a biologia e capacidade predatória de *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae) Predando *Aphis*

gossypii Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. p. 45-52, jan-mar. 2008.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 137p. 3.ed, 1996.

PASSINI, A; PARRA, J. R. P; LOPES, J. M. Dieta artificial para criação de *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae), Predador da lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 308- 311, Mar-Apr. 2007.

PAULA, D. P. et al. Limitations in dose–response and surrogate species methodologies for risk assessment of Cry toxins on arthropod natural enemies. **Ecotoxicology**, New York, v. 25, n. 3, p. 601-607, Feb. 2016.

PERDIKIS, D; FANTINO, A; LYKOURESSIS. Enhancing pest control in annual crops by conservation of predatory Heteroptera. **Biological Control**, Orlando, v. 59, n. 1, p. 13-21, Oct. 2011.

REIS, L. L.; OLIVEIRA, L. J.; CRUZ, I. Biologia e potencial de *Doru luteipes* no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 333-342, Apr. 1988.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **How a corn Plant Develops**. Iowa: State University of Science and Technology Cooperative Extension Service Ames. 1986. 24 p. State Library of Iowa.

ROMEIS J. et al. Assesment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 203-208, Feb, 2008.

ROMEIS, J. et al. Deriving criteria to select arthropod species for laboratory tests to assess the ecological risks from cultivating arthropod-resistant genetically engineered crops. **Chemosphere**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 901-909, Jan. 2013.

ROMEIS, J et al. Recommendations for the design of laboratory studies on non-target arthropods for risk assessment of genetically engineered plants. **Transgenic Research**, London, v. 20, n. 1, p. 1–22, Feb. 2011.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 1, p. 63–71, Jan. 2006.

ROMEIS J.; MEISSLE M. Non-target risk assessment of Bt crops-Cry protein uptake by aphids. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 135, n. 1-2, p. 1–6, Jun. 2011.

SCHRIJVER, A. D. et al. Quality of laboratory studies assessing effects of Bt-proteins on non-target organisms: minimal criteria for acceptability. **Transgenic Research**, London, v. 25, n. 4, p. 395-411, Mar. 2016.

SCHULER, T. H. et al. Effects of Bt plants on the development and survival of the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) in susceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 435-443, May. 2004.

SHELTON, A. M. et al. Use of Bt-resistant caterpillars to assess the effect of Cry proteins on beneficial natural enemies. **GMOs in Integrated Plant Production**, Suíça, v. 114, p. 51-55, Jun, 2016.

SILVEIRA, L.C.P.; BUENO, V.H.P.; VAN LENTEREN, J.C. *Orius insidiosus* as biological control agent of thrips in greenhouse chrysanthemums in the tropics. **Bulletin Insectology**, Bologna, v. 57, n. 2, p. 103–109, 2004.

SOUSA, F. F. et al. Life-History Traits of *Spodoptera frugiperda* Populations Exposed to Low-Dose Bt Maize. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. 1-18, May, 2016.

SOUZA, C. S. F. Sequestro e transferência da proteína cry1f entre gerações de *Spodoptera frugiperda* (j. e. smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) In:___**Sequestro e transferência da proteína cry1f do milho em *Spodoptera frugiperda* (j. e. smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)** e implicações para organismos não alvo. 2017. 89 p. Dissertação (mestrado em Entomologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

STORER, N.P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, Aug. 2010.

STORER, N.P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, Lanham, v. 110, n. 3, p. 294-300, Jul. 2012.

SU, H. H. et al. *Bacillus thuringiensis* plants expressing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F are not toxic to the assassin bug, *Zelus renardii*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 139, n. 1-2, p. 23-30, Feb. 2015.

TIAN, J. et al. Using field-evolved resistance to Cry1F maize in a lepidopteran pest to demonstrate no adverse effects of Cry1F on one of its major predators. **Transgenic Research**, London, v. 21, n. 6, p.1303-1310, Dec. 2012.

TIAN, J. et al. Bt Crops Producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F Do Not Harm the Green Lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 3, e60125, Mar. 2013.

TIAN, J. et al. Using Resistant Prey Demonstrates That Bt Plants Producing Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1F Have No Negative Effects on *Geocoris punctipes* and *Orius insidiosus*. **Environmental Entomology**, College Park, v. 43, n. 1, p. 242-251, Feb. 2014.

TIAN, J. et al. Eliminating host-mediated effects demonstrates Bt maize producing Cry1F has no adverse effects on the parasitoid *Cotesia marginiventris*. **Transgenic Research**, London, v. 23, n. 2, p. 257-264, Apr. 2014.

TIAN, J. et al. Bt crops benefit natural enemies to control non-target pests. **Scientific Reports**, Ahmedabad, v. 5, n. 16636, p. 1-10, Nov. 2015.

VAN LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 1-20, Jul. 2012.

WELCH, K. L. et al. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Lanham, v. 132, p. 149-156, Nov. 2016.

WONG, S. K.; FRANK, S. D. Pollen increases fitness and abundance of *Orius insidiosus* Say (Heteroptera: Anthocoridae) on banker plants. **Biological Control**, Orlando, v. 64, n. 1, p. 45-50, Jan. 2013.

YOO, H. J. S.; O'NEIL, R. Temporal relationships between the generalist predator, *Orius insidiosus*, and its two major prey in soybean. **Biological Control**, Orlando, v. 48, n. 2, p. 168-180, Feb. 2009.

ANEXO

Tabela 1- Plantas de milho geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização.

Evento	Características	Proteína (s)	Ano de aprovação
MON810	Resistente a insetos	Cry1Ab	2007
T25	Tolerante a Herbicida	PAT	2007
Bt11	Resistente a insetos e Tolerante a herbicidas	Cry1Ab PAT	2007
NK603	Tolerante a Herbicida	CP4-EPSPS	2008
GA21	Tolerante a Herbicida	mEPSPS	2008
TC1507	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1F PAT	2008
NK603 & MON810	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	CP4-EPSPS Cry1Ab	2009
Bt11 & GA21	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Cry1Ab PAT mEPSPS	2009
MIR162	Resistente a Insetos	VIP3Aa20	2009
TC1507 & NK603	Resistente a Inseto e Tolerante a Herbicida	Cry1F PAT CP4-EPSPS	2009
MON89034	Resistente a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2	2009
Bt11 & MIR162 & GA21 B	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1Ab VIP3Aa20 mEPSPS	2010
MON89034 & NK603	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS	2010
MON88017	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	CP4-EPSPS Cry3Bb1	2010
MON89034 & TC1507 & NK603	Resistente a insetos e Tolerante a herbicida	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-EPSPS	2010
MON810 & TC1507 & NK603	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	cry1Ab Cry1F PAT CP4EPSPS	2011
TC1507 & MON810	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1F Cry1Ab PAT	2011
MON89034 & MON88017	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry3Bb1 CP4-EPSPS	2011
TC1507 x DAS-59122-7	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1F PAT cry34Ab1 cry35Ab1	2013
Bt11xMIR162xMIR604xGA21	Tolerante a Herbicida e Resistente a insetos	Cry1Ab PAT VIP3Aa20 mcry3A mEPSPS	2014
MIR604	Resistente a insetos	mcry3A	2014
DAS-40278-9	Tolerante a herbicida	aad-1v3	2015
NK603 x T25	Tolerante a herbicida	CP4-EPSPS PAT	2015
TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	cry1F cry1Ab PAT VIP3Aa20 CP4-EPSPS	2015
TC1507xMIR162xNK603	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	cry1F PAT VIP3Aa20 CP4- EPSPS	2015
TC1507xMIR162	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	cry1F PAT VIP3Aa20	2015
MIR162xNK603	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	VIP3Aa20 CP4-EPSPS	2015

Tabela 1 (Conclusão)

Evento	Características	Proteína (s)	Ano de aprovação
MON810xMIR162 B	Resistente a insetos	Cry1Ab VIP3Aa20	2015
TC1507 x MON810 x MIR162 subcombinações aprovadas e já referidas anteriormente	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	Cry1F pat VIP3Aa20 cry1Ab	2015
DAS-40278-9xNK603	Tolerante a herbicidas	AAD-1 epsps	2015
MilhoBt11xMIR162xMIR604xTC1 507x5307xGA21	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	eCry3.1Ab cry1Ab Vip3Aa20 cry3A cry1F pat mepsps	2015
5307	Resistente a insetos	eCry3.1Ab	2015
Bt11xMIR162	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	cry1Ab Vip3Aa20 pat	2015
MON89034xTC1507xNK603xDAS 40278-9	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-EPSPS/aad-1	2016
MON8934xMON88017xTC1507x DAS-59122-7	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	cry2Ab2/cry1A.105/cry3Bb 1/cp4 epsps/cry1F/pat /cry34Ab1/cry35Ab1	2016
MON97411	Tolerante a herbicida e resistência a insetos	Cry3Bb1/cp4-epsps/dvsfn7	2016
MON87427	Tolerante a herbicida	cp4-epsps	2016

Fonte: Adaptado de CTNBio (2017).