



**FERNANDA SOARES SALES**

**EFEITO DE TOXINAS DO MILHO BT SOBRE A  
PATOGENICIDADE E A REPRODUÇÃO DE  
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA:  
STEINERNEMATIDAE, HETERORHABDITIDAE) EM  
LARVAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*  
(LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**FERNANDA SOARES SALES**

**EFEITO DE TOXINAS DO MILHO BT SOBRE A  
PATOGENICIDADE E A REPRODUÇÃO DE  
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA:  
STEINERNEMATIDAE, HETERORHABDITIDAE) EM  
LARVAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*  
(LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

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

Prof. Dr. Alcides Moino Junior

Orientador

**LAVRAS-MG**

**2019**

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

Sales, Fernanda Soares.

Efeito de toxinas do milho Bt sobre a patogenicidade e a reprodução de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) em larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) / Fernanda Soares Sales. - 2019.

68 p. : il.

Orientador(a): Alcides Moino Junior.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Controle microbiano. 2. Transgênicos. 3. Custo adaptativo. I. Junior, Alcides Moino. II. Título.

**FERNANDA SOARES SALES**

**EFEITO DE TOXINAS DO MILHO BT SOBRE A PATOGENICIDADE E  
A REPRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS  
(RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE, HETERORHABDITIDAE) EM  
LARVAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

**EFFECT OF BT CORN TOXINS ON PATHOGENICITY AND  
REPRODUCTION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES  
(RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE, HETERORHABDITIDAE) IN  
*SPODOPTERA FRUGIPERDA* LARVAE (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2019  
Dr. Ricardo Sousa Cavalcanti IFMG  
Dr.<sup>a</sup> Maria Fernanda G. V. Peñaflo UFLA

Prof. Dr. Alcides Moino Junior  
Orientador

**LAVRAS-MG**

**2019**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

Em primeiro lugar a Deus por ser meu amparo em todos os momentos.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós Graduação do Departamento de Entomologia que proporcionaram o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Alcides Moino Junior pelo apoio, compreensão, paciência e principalmente pela orientação durante os últimos nove anos entre graduação e pós-graduação.

Ao professor Bruno e a todos do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas/ Resistência de Plantas a Insetos que de alguma forma contribuíram para o engrandecimento desse trabalho.

Aos amigos Amanda, Bárbara, Camila, Paulo e Pedro que fizeram dessa etapa mais fácil e principalmente me apoiando nos momentos difíceis.

Aos técnicos, Irene, Jaciara e Julinho que foram e são meus companheiros de trabalho e além de terem sido muito importantes no trabalho foram amigos em todos os momentos.

Aos colegas Leopoldo e Livia, pela paciência e apoio na realização das análises estatística.

A minha mãe por todo carinho, apoio, pelo exemplo de trabalho, perseverança, pelo amor dado, por ser um exemplo pelo apoio dado pra chegar até aqui.

Ao meu pai pelo apoio e carinho mesmo a distância, por ser um exemplo de ser humano e trabalho.

Aos meus irmãos Raphael e Gabriel pelo amor e carinho.

Ao André pelo amor, apoio, carinho, paciência, por ter me ajudado várias vezes mesmo não sabendo o que fazer, pelos feriados e finais de semana nos quais passamos no laboratório, esse trabalho também é seu.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

## RESUMO

O uso de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas com ação inseticida tem sido uma importante ferramenta no controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae) praga chave da cultura do milho (*Zea mays* L.). O uso contínuo e inadequado dessa tecnologia tem reduzido o grau de supressão populacional das lagartas e sabendo que os custos adaptativos podem retardar a resistência a pragas em culturas que produzem toxinas inseticidas derivadas de Bt, novas estratégias têm sido abordadas. Nematoides entomopatogênicos (NEP) possuem simbiose com bactérias e são importantes agentes de controle biológico para vários insetos, podendo ser um método alternativo e seguro para o controle de pragas. Apesar de alguns trabalhos mostrarem uso conjunto de NEP e milho Bt para o controle de *S. frugiperda*, pouco se sabe sobre o efeito do Bt aos NEP. Nesse contexto, para identificar o efeito de Bt nos NEP usados no controle de populações de *S. frugiperda* resistentes às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, foram aplicados 1mL de suspensão contendo 500 juvenis infectantes (JI)/mL de *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM4, *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC05 e *Steinernema carpocapsae* em lagartas resistentes a essas proteínas, 15 dias após eclosão alimentadas somente por milho Bt, a fim de avaliar os efeitos na patogenicidade dos NEP. Foram avaliados a patogenicidade desses isolados à populações de *S. frugiperda* resistentes a Bt e a capacidade de reprodução desses NEP por essas populações. Por fim, avaliou-se a patogenicidade da geração subsequente de NEP utilizando lagartas de último ínstar de *G. mellonella* como hospedeiro. *H. amazonensis* isolado RSC05 teve sua patogenicidade, capacidade de reprodução e patogenicidade da geração subsequentes afetados. Para *H. amazonensis* isolado JPM4 somente patogenicidade dos JI da geração subsequentes foi afetada quando produzidos pela população resistente a Cry1F e *S. carpocapsae* não teve nenhum dos parâmetros afetados pela presença de proteínas Cry.

**Palavras chave:** Controle microbiano. Transgênicos. Custo adaptativo.

## ABSTRACT

The use of genetically modified plants expressing proteins with insecticidal action has been an important tool in controlling *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), a major corn (*Zea mays* L.) pest. The continuous and inadequate use of this technology has reduced the degree of population suppression of caterpillars and, knowing that fitness costs may delay pest resistance in crops producing insecticidal toxins derived from Bt, new strategies have been addressed. The entomopathogenic nematodes (EPN) have symbiosis with bacteria and are important agents of biological control for several insects, and can be an alternative and safe method for the control of pests. Although some studies have shown the combined use of Bt corn and EPN for control of *S. frugiperda*, little is known about the effect of Bt on EPN. In this context, to identify the effect of Bt on EPN used to control *S. frugiperda* populations resistant to Cry1A.105, Cry2Ab2 and Cry1F proteins, 1mL of suspension containing 500 infective juveniles (IJ) / ml of *Heterorhabditis amazonensis* isolate JPM4, *Heterorhabditis amazonensis* isolate RSC05 and *Steinernema carpocapsae*, were applied in caterpillars resistant to these proteins 15 days after hatching, fed only by Bt corn, in order to evaluate the effects of the pathogenicity of EPN. The pathogenicity of these isolates to Bt resistant populations of *S. frugiperda* and the reproductive capacity of these NEP by these populations were evaluated. Finally, the pathogenicity of the subsequent generation of EPN was evaluated using last instar *G. mellonella* larvae as hosts. *H. amazonensis* isolate RSC05 had its pathogenicity, reproductive capacity and pathogenicity of the subsequent generation affected. For *H. amazonensis* isolate JPM4 only pathogenicity of the subsequent generation IJ was affected when produced by the resistant population to Cry1F. *S. carpocapsae* did not have any of the parameters affected by the presence of Cry proteins.

**Key words:** Microbial control. Transgenics. Fitness cost.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. HIPÓTESES .....	13
3.1 Hipótese geral.....	13
3.2 Hipóteses específicas.....	13
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
4.1 A cultura do milho.....	14
4.2 Lagarta-do-cartucho do milho ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ).....	15
4.3 Milho Bt e resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a proteínas Cry .....	16
4.2 Nematoides entomopatogênicos (NEP): modo de ação e sua utilização no controle biológico de <i>S. frugiperda</i> .....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1 Criação da traça dos favos <i>Galleria mellonella</i> .....	21
5.2 Manutenção e multiplicação de nematoides entomopatogênicos.....	24
5.3 Criação e manutenção de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	26
5.4 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas por milho Bt expressando proteínas Cry .....	31
5.5 Bioensaio de produção de NEP .....	33
5.6 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP utilizando <i>Galleria mellonella</i> como hospedeiro.....	34
5.7. Análise estatística .....	36
5.7.1 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a <i>Spodoptera frugiperda</i> resistentes a proteínas Cry .....	36
5.7.2 Bioensaio de produção de NEP .....	36

5.7.3 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP utilizando <i>Galleria mellonella</i> como hospedeiro .....	38
6. RESULTADOS .....	38
6.1 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a <i>S. frugiperda</i> resistentes a proteínas Cry .....	38
6.2 Bioensaio de produção de NEP .....	44
6.3 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP utilizando <i>Galleria mellonella</i> como hospedeiro.....	48
7. DISCUSSÃO.....	51
7.1 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a <i>S. frugiperda</i> resistentes a proteínas Cry .....	51
7.2 Bioensaio de produção de NEP .....	53
7.3 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP em <i>Galleria mellonella</i> .....	54
8. CONCLUSÕES .....	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

A estimativa da produção de grãos no Brasil na safra 2018/2019 é de 233,4 milhões de toneladas e o milho é a segunda maior cultura do país em volume de produção com previsão de 92 milhões de toneladas, perdendo somente para produção de soja, com previsão de 118 milhões de toneladas (CONAB, 2019). Sua produção está distribuída por todo o país, sendo cultivado em pequenas, médias e grandes áreas e mesmo que a soja represente a maior produção de grãos do país, o milho ainda é a maior base para outras atividades econômicas principalmente a pecuária (PAES, 2006).

Em contrapartida, como em várias culturas, um dos principais problemas da cultura do milho é a alta suscetibilidade a pragas e doenças e de maneira geral os métodos de controle sintéticos são os mais comumente usados (CRUZ, 1999; DIÉZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001), contudo, são prejudiciais à saúde humana e animal, além de afetar espécies não-alvo e contaminar o meio ambiente. Além disso, o uso contínuo e indiscriminado implicou na seleção de populações de insetos resistentes (CARVALHO et al., 2013).

Várias espécies de insetos são observadas na parte aérea da cultura do milho, entretanto algumas são consideradas de extrema importância econômica na maioria das áreas de cultivo da cultura no Brasil sendo que *Spodoptera frugiperda* conhecida como lagarta-do-cartucho, é considerada uma das principais pragas dessa cultura no Brasil (CRUZ et al. 2001).

Para que não haja surgimento de pragas resistentes, é necessário empregar os princípios do manejo integrado de pragas (MIP) utilizando vários métodos de controle. O MIP parte do pressuposto do monitoramento antes da tomada de decisão, que tem por objetivo reduzir a população a limites compatíveis com a produção econômica da cultura e não simplesmente eliminar a praga e por fim, contribuir para a manutenção da qualidade ambiental (CRUZ, 1995).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas sobre os métodos alternativos de controle de insetos considerados praga, com a finalidade do uso isolado ou até mesmo em associação com outros métodos, como o controle biológico, uma importante ferramenta para o MIP.

Nematoides entomopatogênicos (NEP) pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) são comumente usados no controle de diversos insetos praga (DILLON et al., 2006), principalmente os que

ocupam o solo ou ambientes crípticos, como por exemplo, *S. frugiperda*, em parte do seu desenvolvimento ou se desenvolvem totalmente nele, devido à sua simbiose com bactérias (FORST et al., 1997). Seu uso pode ser uma alternativa viável, eficiente e segura por suas características específicas, como compatibilidade produtos fitossanitárias (KOPPENHÖFER, 2007; NEGRISOLI JR. ET AL., 2010; SABINO et al., 2014) e principalmente com outros entomopatógenos (POLANCZYK et al. 2005) e pesquisas recentes apontaram potencial de uso conjunto dos NEP com culturas geneticamente modificadas (ADEL et al., 2013; GASSMANN et al., 2006; GAUTAM et al., 2014).

O desenvolvimento de híbridos de milho comerciais que possuem genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que codificam a expressão de proteínas Bt, tóxicas para insetos, aparece como uma alternativa de controle e apresenta um enorme potencial de emprego no MIP (LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A., 2002).

Vários estudos vêm sendo realizados sobre o efeito de proteínas Bt em organismos não-alvo, principalmente parasitoides e predadores, porém pouco se sabe sobre efeitos causados em inimigos naturais que vivem no solo incluindo os NEP. Sabe-se da relação íntima e complexa entre NEP e seus hospedeiros, onde os NEP se nutrem dos tecidos do hospedeiro morto pela bactéria simbiótica e que o conteúdo nutricional do hospedeiro afeta sua suscetibilidade aos NEP (SHAPIRO-ILAN et al. 2008). Por esse motivo estudos devem ser realizados para determinar se há efeito nos parâmetros biológicos dos NEP, quando em contato com essas toxinas.

Neste contexto o objetivo desse trabalho foi avaliar a patogenicidade de isolados de NEP a populações de *S. frugiperda* que se alimentaram de milho Bt expressando as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, determinar se há efeito na produção de NEP por essas populações de *S. frugiperda* e avaliar o efeito na patogenicidade da geração de NEP subsequente utilizando *Galleria mellonella* como hospedeiro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da interação entre plantas de milho transgênico Bt, expressando as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F sobre os NEP *Steinernema carpopopsae*, e os isolados RSC5 e JPM4 do gênero *Heterorhabditis* sob condições tritróficas, utilizando *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) resistente a essas proteínas como hospedeiro.

### 2.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a patogenicidade dos nematoides entomopatogênicos a populações de *S. frugiperda* que se alimentaram somente de milho Bt expressando proteínas Cry. quando há presença dessas proteínas em seu organismo.
- b. Avaliar se a alimentação de populações de *S. frugiperda* com milho Bt expressando uma proteína Cry ou mais, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, afeta de maneira distinta a patogenicidade dos nematoides entomopatogênicos a populações de *S. frugiperda* resistentes.
- c. Avaliar a produção de nematoides utilizando lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de milho Bt expressando proteínas Cry como hospedeiro, e se há diferença na produção quando alimentadas com milho expressando uma ou mais proteínas Cry.
- d. Avaliar a patogenicidade da geração subsequente de nematoides que se reproduziram em *S. frugiperda* que se alimentaram de milho Bt expressando proteínas Cry, utilizando *Galleria mellonella* como hospedeiro.

### 3. HIPÓTESES

#### 3.1 Hipótese geral

Nematoides entomopatogênicos podem ser utilizados em associação com milho Bt expressando as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F no controle de *S. frugiperda*.

#### 3.2 Hipóteses específicas

- a. As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, expressas pelo milho Bt presentes na alimentação de duas populações de *S. frugiperda* resistentes a essas proteínas, interferem na patogenicidade, virulência e produção dos nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae*, e os isolados RSC5 e JPM4 do gênero *Heterorhabditis*.
- b. As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F expressas por milho Bt presentes na alimentação de populações de *S. frugiperda* resistentes a essas proteínas, não interferem na patogenicidade de nematoides entomopatogênicos de maneira distinta quando há a presença de uma ou mais proteínas Cry na sua alimentação.
- c. A presença de proteínas Cry no organismo de *S. frugiperda*, resistentes a essas proteínas, não interferem na patogenicidade mas afetam a reprodução dos nematoides entomopatogênicos.
- d. A geração subsequente de NEP produzidos em lagartas de *S. frugiperda*, resistentes a proteínas Cry tem sua patogenicidade a *Galleria mellonella* afetada.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais produzidos no mundo e um dos principais produzidos no Brasil. O país ocupa a terceira colocação no ranking mundial com uma produção estimada em aproximadamente 92 milhões de toneladas na safra 2018/2019 e área plantada de aproximadamente 16,5 milhões de hectares confirmando a grande importância econômico-social da cultura (CONAB, 2019).

Sendo uma das culturas mais antigas do Continente Americano, estudos arqueológicos sugerem que o milho vem sendo cultivado e consumido entre 10.000 e 6.250 anos (PIPERNO & FLANNERY, 2001; PIPERNO, 2007). O milho tem como centro de origem a América Central ou mais precisamente o México, onde se encontram seus parentes mais próximos, teosinte e *tripsacum* (HALLAUER, 1985). Com hipóteses diversas sendo estudadas sobre sua origem, as mais consistentes são as que demonstram que o milho descende do teosinte, uma gramínea com várias espigas sem sabugo, que pode cruzar naturalmente com o milho e produzir descendentes férteis (GALINAT, 1995).

Pertencente a família *Poaceae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*, o milho é uma planta herbácea, monoica, alógama, anual, robusta e ereta com  $2n=2x=20$  cromossomos (PATERNIANI & CAMPOS, 1999; PONS & BRESOLIN, 1981).

A cultura do milho possui ampla variabilidade genética, possivelmente a maior de todas as plantas cultivadas, além disso, possui uma importante característica, seu alto nível de domesticação. Acredita-se ser a espécie cultivada que atingiu maior nível de domesticação, a tal ponto que o milho só sobreviva quando cultivado pelo homem. (UDRY & DUARTE, 2000; WILKES, 1972).

Com uma ocupação de área cultivada considerável no território brasileiro, a cultura do milho é muito importante quanto à geração de empregos no setor agrícola, pela sua utilização na alimentação humana e animal, além de ser matéria prima para produção de vários subprodutos na indústria. Há genótipos adaptados ao cultivo comercial desde a latitude 58° N até 40° S, do nível do mar até 3.800 metros de altitude (PATERNIANI, 1995), possibilitando o cultivo e consumo em todos os continentes e ainda, é considerado uma das mais importantes fontes de alimento da atualidade.

Alguns fatores podem comprometer o rendimento e qualidade da produção de milho como deficiência nutricional, incidência de doenças e principalmente ocorrência

de pragas. Entre os principais insetos-pragas encontrados na cultura do milho, destaca-se a lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*. Sua importância se deve à sua voracidade e seu difícil controle que podem afetar a lavoura prejudicando a produção da cultura.

#### **4.2 Lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*)**

Uma das principais pragas da cultura do milho pertencente à ordem Lepidoptera, conhecida como lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda* é um inseto polífono, amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais das Américas (ANDREWS, 1988) de onde se originou (LUGINBILL, 1928). Também está presente nas zonas temperadas do continente norte-americano, durante os períodos de primavera e de verão. É considerada a principal praga da cultura de milho no Brasil, estando presente em todas as regiões do território nacional (CRUZ, 1995; GALLO et al., 2002; MIRANDA & SUASSUNA, 2004).

Os insetos adultos são mariposas, com envergadura de aproximadamente 35 mm quando totalmente desenvolvidas e coloração das asas anteriores pardo-escuras e posteriores branco acinzentadas (GALLO et al., 2002). Apresentam dimorfismo sexual quanto a essa característica sendo os machos com asas anteriores com manchas mais claras diferindo das fêmeas (CRUZ, 1995). A longevidade do adulto é de 12 a 15 dias (CRUZ, 1995; SANTOS, 2004). A partir do terceiro ou quarto dia após a emergência da fêmea, se dá a oviposição (CRUZ, 1995). As posturas são feitas em massa de ovos, de 150 a 300 ovos, localizadas preferencialmente na face adaxial das folhas. (CRUZ, 1995; GALLO et al., 2002).

As lagartas recém-eclodidas são esbranquiçadas, possuem cápsula cefálica escura e mais larga do que o corpo, além de apresentarem mais cerdas que as mais velhas. Inicialmente alimentam-se do cório do ovo, em seguida ao encontrarem o alimento, raspam o parênquima das folhas mais jovens deixando a epiderme membranosa do outro lado intacta (GRÜTZMACHER et al. 2000; LEIDERMAN & SAUER, 1953) e após alimentação tornam-se esverdeadas. O desenvolvimento larval varia entre 5 e 6 estádios larvais, com duração total de 12 a 30 dias, dependendo das condições de temperatura. As lagartas podem atingir 50 mm de comprimento e 2,7 mm de largura da cápsula cefálica no último instar, com formato do corpo cilíndrico, de coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e subventral, que também apresenta manchas de coloração marrom-avermelhada (CRUZ 1995; GALLO et al., 2002).

Ao completar seu desenvolvimento a larva migra para o solo onde passará pelo período de pré-pupa e pupa, período esse com duração também determinada pela temperatura. Segundo GALLO et al. (2002) o período dura entre 8 dias no verão a 25 dias no inverno, completando seu ciclo, desde ovo até adulto, em aproximadamente 30 dias (CRUZ, 1995).

Os danos podem ser caracterizados pelo tamanho das lagartas, pois logo no primeiro instar a larva inicia sua alimentação raspando uma das faces da folha, já as lagartas maiores além de escarificar a folha já são capazes de se alimentar provocando orifícios reduzindo a área foliar, que resulta na diminuição da taxa fotossintética, podendo até causar danos diretos ao colmo, dando origem ao seu nome popular, e até as espigas e grãos (CRUZ, 1995; GALLO et al., 2002).

As perdas podem variar conforme o estágio de desenvolvimento da planta, a cultivar utilizada, local de plantio e áreas adjacentes bem como as práticas agrônomicas podendo chegar a 34% (BARROS, TORRES, BUENO, 2012; CRUZ, 1995; GALLO et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2006). Alguns fatores relacionados ao aspecto biológico do inseto e ao sistema de cultivo do milho como não apresentar diapausa, ser um inseto polífago, possuir alta capacidade de reprodução e dispersão, aliados a sucessão de cultivos de plantas hospedeiras, dificultam seu controle e favorecem a ocorrência de infestações severas. (AFONSO et al., 2009; BERNARDI et al. 2015; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Várias estratégias de manejo estão sendo utilizadas para o controle de *S. frugiperda*, dentre elas o uso tecnologias de milho que expressam a proteína Bt.

#### **4.3 Milho Bt e resistência de *Spodoptera frugiperda* a proteínas Cry**

Uma das principais estratégias de controle da lagarta-do-cartucho, é uso de milho geneticamente modificado (VERTUAN et al 2017), no qual genes da bactéria *B. thuringiensis* são introduzidos. Esses genes codificam a expressão de proteínas Bt, com ação inseticida, auxiliando na eficiência do MIP diminuindo a dependência do controle químico (DEVILLIERS & HOISINGTON 2011; SANAHUJA et al, 2011). Essas proteínas são sintetizadas através dos genes Cry, Vip e Cyt. Atualmente já foram liberados comercialmente no Brasil 44 eventos de plantas geneticamente modificadas dessas, 37 são eventos de milho Bt com tolerância a herbicida e/ou resistência a insetos (CTNBIO, 2017).

Essas proteínas, ingeridas por lagartas suscetíveis, dissolvem-se no ambiente alcalino do intestino ativando a toxina. A toxina ativada então se liga a receptores

específicos na membrana das células do epitélio do intestino médio (DE MAAGD et al.; BRAVO et al., 2007). Ao inserir na membrana, a toxina leva à formação de poros líticos nas microvilosidades apicais (ARONSON E SHAI, 2001; BRAVO et al., 2007) e em seguida ocorre a lise celular e o rompimento do epitélio do intestino médio (DE MAAGD ET AL., 2001; BRAVO et al., 2007).

Sabendo dos potenciais efeitos desses produtos obtidos pela biotecnologia, tanto como em aspectos ambientais e efeitos sobre a saúde humana e animal, ou seja, ou mesmo outros insetos, organismos não-alvos (CAPALBO et al, 2009; COSTA et al, 2011), tornou-se obrigatória a avaliação de segurança na maior parte dos países onde culturas geneticamente modificadas são registradas para o cultivo (NODARI,2007; ROMEIS et al., 2011).

Liberados no Brasil comercialmente em 2008 (CTNBio, 2016), as culturas de milho Bt representam mais de 80 % da área plantada no Brasil na safra 2016/2017 com aproximadamente 17 milhões de hectares plantados por ano. O uso dessa tecnologia traz inúmeros benefícios como exemplo o controle eficiente de pragas-alvo como consequência, maior retorno econômico (EDGERTON et al., 2012; LOURENÇÃO & FERNANDES, 2013), diminuição do uso de inseticidas preservando assim os inimigos naturais (CAMPOS et al.,2011; COMAS et al. 2014). Porém, a utilização de cultivos Bt com manejo inadequado faz com que as proteínas sofram maior pressão de seleção e aumentam o risco de resistência em insetos alvos incluindo *S. frugiperda* (HORIKOSHI et al., 2016; OMOTO et al. 2016; TABASHNIK & CARRIENE, 2013). No Brasil já foram documentados casos de resistência de populações de *S. frugiperda* a milho Bt expressando as proteínas Cry 1F (FARIAS et al.,2014)

Nesse contexto o manejo da resistência se torna imprescindível, para que o uso dessa tecnologia não seja colocado em risco. Várias estratégias de manejo estão sendo utilizadas, dentre elas a de refúgio e alta dose, onde a combinação do refúgio, com função de gerar indivíduos suscetíveis para o acasalamento com os raros indivíduos resistentes que sobrevivem no cultivo Bt, e a expressão das proteínas em alta dose, tornam a resistência recessiva (HEAD & GRENPLATE, 2012; GOULD, 1998; ROUSH, 1994).

A introdução de eventos piramidados, combinação de genes diferentes que expressam mais de uma proteína com diferentes mecanismos de ação, em um mesmo híbrido, também é uma maneira de manejo da resistência. Proteínas Vip e Cyt, além de fazerem efeito a insetos onde o Bt não funciona, possuem sítios de ação diferentes da

proteína Cry (LEE et al. 2003) e são interessantes complementos as proteínas Cry em culturas Bt, ampliando o espectro inseticida.

Outra estratégia de manejo é a combinação de milho Bt com agentes de controle biológico. Com uma importante história no controle biológico de insetos pragas, fungos entomopatogênicos, inúmeras espécies de Baculovírus e também os nematoides entomopatogênicos (CORY, 2012) podem se utilizados no controle de *S. frugiperda*.

#### **4.2 Nematoides entomopatogênicos (NEP): modo de ação e sua utilização no controle biológico de *S. frugiperda***

Os NEP dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae respectivamente, são agentes de controle biológico principalmente de insetos que abrigam ou passam parte de sua vida no solo ou ainda em ambiente crípticos (GREWAL & GEORGIS 1998). Agem em associação com bactérias em uma relação mutualística e simbiótica, localizando o hospedeiro por estratégias de busca denominadas “*Ambusher*”, hábito de esperar pelo hospedeiro e “*Cruiser*”, adaptados para se movimentarem em curtas distâncias em busca do hospedeiro (HUEY & PIANKA, 1981; O'BRIEN et al., 1989). Os NEP, ao encontrarem hospedeiros e infectá-los, uma vez dentro da hemocele, liberam as bactérias associadas, causando septicemia levando o inseto à morte em 24 a 48 horas (FERRAZ, 1998). Ao se multiplicarem dentro do inseto durante duas a três gerações, dão início à formação dos juvenis infectantes (JI), que abandonam o cadáver em busca de novos hospedeiros (ALMENARA, 2012).

O controle de *S. frugiperda* na cultura do milho por NEP apresenta grande potencial, visto que o sistema de plantio direto, por exemplo, proporciona um ambiente favorável, que facilita a manutenção dos JI na área e os mantém viáveis e patogênicos (GREWAL et al., 2001).

Fuxa et al (1988), visando testar concentrações letais de populações de NEP utilizando *Steinernema feltiae* sobre diferentes instares de *S. frugiperda*, em condições de laboratório, verificaram uma mortalidade de 100% quando utilizaram *S. feltiae* sobre lagartas e para pupas uma mortalidade de 7-20% com suspensões variando entre 30 a 60 JI / 0,7 ml.

Richter e Fuxa (1990) relataram a mortalidade máxima de *S. frugiperda* por *S. feltiae*, em condições de campo, de 43% quando aplicados  $2.5 \times 10^{10}$  JI/ha na lavoura de

milho e ainda, que a pulverização de nematóides nas espigas de milho causou até 71% de mortalidade.

Molina-Ochoa et al. (1996) avaliaram a suscetibilidade de *S. frugiperda* a várias espécies de NEP, e determinaram que a CL<sub>50</sub> variou de 1,5 a 20,6 de 3,4 a 37,2 JI/ ml para larvas e pré-pupas, respectivamente e concluíram que todas as estirpes, *Steinernema riobrave* e *Heterorhabditis. megidis* possuem potencial para o controle de *S. frugiperda*.

No Brasil, Andaló et al. (2010) avaliaram 17 populações de NEP, nas concentrações de 100, 200 e 500 JI/mL, do banco de nematoides do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia, na Universidade Federal de Lavras. Nesse trabalho verificaram que concentração de 200 JI/lagarta, *S. arenarium* e *Heterorhabditis sp.* RSC02 causaram 100 e 97,6% de mortalidade, respectivamente, e em casa-de-vegetação causaram 77,5 e 87,5%, respectivamente.

Os trabalhos realizados comprovam a eficácia dos NEP no controle de *S. frugiperda*, e uma forma de incrementar a eficácia de entomopatógenos é a utilização em conjunto tanto de inseticidas como de outros agentes de controle biológico (POLANCZYK et al. 2005).

Contudo, pouco se sabe do efeito aos NEP dessa interação. Alguns trabalhos foram feitos por Koppenhöfer et al. (1999), Koppernhofer & Kaia (1997) e Shamseldean & Ismail (1997) a fim de avaliar o efeito da interação dos NEP *H. bacteriophora* e *S. glaseri* com isolados de Bt, e observaram efeito sinérgico na supressão das populações para, *Cyclocephala hirta*, *C. pasadenae* e *Agrotis ipsilon*, respectivamente.

Polanczyk et al. (2005), avaliaram a interação em laboratório de isolados de Bt com vários entomopatógenos, incluindo *Heterorhabditis sp.*, verificando interação positiva, variando de efeito aditivo a sinergismo subaditivo, de acordo com a concentração do nematoide .

Outros trabalhos abordaram estudos sobre a interação entre NEP e Organismos Geneticamente Modificados (OGM), diferente dos trabalhos anteriores onde foram utilizados isolados de Bt. Por exemplo, Gassmann et al.(2006) avaliaram a interação de Bt e *Steinernema riobrave* no controle de *Pectinophora gossypiella* (Saunders)(Lepidoptera: Gelechiidae), uma das principais pragas de algodão no sudoeste dos Estados Unidos, e relataram que a mortalidade *P. gossypiella* foi

significativamente maior para uma população resistente ao Bt do que para uma suscetível.

Adel et al. (2013) avaliaram os efeitos causados pela alimentação do hospedeiro *Spodoptera littoralis*, por batatas geneticamente modificadas expressando a toxina Cry3Aa (Bt) ou aglutinina *Galanthus nivalis* (GNA), sobre o NEP *S. feltiae*. Não foi relatado nenhum efeito antagonico no desenvolvimento e sobrevivência dos NEP, tão pouco na patogenicidade do mesmo a *S. littoralis*.

Já Gautam et al. (2014) investigaram os efeitos da expressão de Cry1Ac em plantas de brócolis transgênicas sobre o NEP *Heterorhabditis bacteriophora* sob condições tritróficas, utilizando *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) resistente a Cry1Ac, como hospedeiro. Parâmetros como virulência, potencial reprodutivo, tempo de emergência e preferência de *H. bacteriophora* pelo hospedeiro não foram afetados quando larvas de *P. xylostella* resistentes consumiram folhas Bt e não-Bt.

Sabendo do potencial dos NEP no controle a *S. frugiperda* e da possibilidade do uso conjunto com plantas Bt aumentando assim a eficiência do manejo desta praga, a necessidade de avaliar os efeitos da expressão de proteínas Cry por plantas de milho nos NEP utilizando *S. frugiperda* resistentes a essas proteínas como hospedeiro, se torna necessária pela importância da praga e a pouca informação na literatura.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia (DEN), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG.

### 5.1 Criação da traça dos favos *Galleria mellonella*

A criação da traça dos favos *Galleria mellonella*, foi conduzida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, de acordo com a metodologia adaptada de Dutky et al. (1964), em dieta artificial modificada por Parra et al. (1998).

Os adultos de *G. mellonella* foram mantidos em potes de vidro cilíndrico (Figura 1), com dimensões de 17 cm de altura e 10 cm de diâmetro, e tampa plástica de rosca. No seu interior foram colocadas folhas de jornal dobradas em forma de sanfona para oviposição. Durante cinco dias esses adultos permaneceram nos potes de vidro até que o papel com a postura fosse recolhido e os adultos descartados.

Figura 1. Adultos de *G. mellonella*.



Fonte: do Autor (2017)

Após a oviposição, os papéis contendo os ovos foram colocados em potes plásticos (40 x 27 x 13 cm) com tampa, sobre a dieta artificial, que foi acondicionada sobre papel tolha, para que as lagartas ao eclodirem, encontrassem alimento para seu desenvolvimento (Figura 2).

Figura 2. Ovos de *G. mellonella*

Fonte: do Autor (2019)

As lagartas ao atingirem o segundo ínstar de desenvolvimento, foram transferidas para outro pote plástico com tampa, forrada com papel jornal, contendo dieta artificial (Figura 3), para que completassem seu desenvolvimento ou até que fossem utilizadas para a multiplicação dos NEP. Adultos emergidos foram recolhidos e transferidos com ajuda de tubo de vidro, para potes de vidro cilíndricos com tampa, para a manutenção da criação (Figura 1).

Figura 3. Lagartas de *G. mellonella* de segundo instar.

Fonte: do Autor (2019)

A criação foi mantida em sala climatizada, a  $25 \pm 1$  ° C e umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  (Figura 4). A manutenção da criação foi feita em dias alternados, fazendo-se a limpeza dos recipientes, coleta de adultos, coleta de posturas e adição de dieta.

Figura 4. Sala climatizada para criação de *G. mellonella*



Fonte: do Autor (2019)

## 5.2 Manutenção e multiplicação de nematoides entomopatogênicos

Os isolados de nematoides entomopatogênicos (Steinernematidae e Heterorhabditidae) são oriundos do banco de nematoides do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da UFLA, onde são armazenados em suspensão aquosa e em condições controladas (temperatura de  $15 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  %, na ausência de luz) (Figura 5). Quando necessário os NEP foram multiplicados em lagartas de *G. mellonella*, conforme procedimento descrito por Woodring & Kaya (1988).

Figura 5. Armazenamento dos isolados de NEP.



Fonte: do Autor (2019)

Para a multiplicação dos NEP foram aplicados 2 mL de suspensão aquosa com aproximadamente 200 juvenis infectantes (JI) em placa de Petri com 9 cm de diâmetro, duas folhas de papel filtro ao fundo e dez lagartas de *G. mellonella* (Figura 6), mantidas em câmara climatizada por 48 horas à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas, condições favoráveis para a multiplicação dos NEP.

Figura 6. Multiplicação dos NEP.



Fonte: do Autor (2019)

As lagartas mortas que apresentaram sintomas característico de infecção por nematoides foram transferidas para câmara seca, que consiste de placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo papel filtro ao fundo (figura 7a) e foram mantidas durante 5-7 dias em câmara climatizada à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas, para que os nematoides pudessem completar seu ciclo de desenvolvimento. Após esse período, as lagartas foram transferidas para armadilha de White (figura 7b), através da qual os nematoides infectantes deixaram o cadáver do hospedeiro, migrando para a água destilada ao fundo da armadilha, em que foram coletados (figura 7c) e quantificados para utilização nos bioensaios (figura 7 d).

Figura 7. *G. mellonella* morta por NEP (a). Armazenamento em câmara climatizada (b).  
Recolhimento dos JI (c). Contagem dos JI (d)



Fonte: do Autor (2018)

### 5.3 Criação e manutenção de populações de *Spodoptera frugiperda*

A criação de *S. frugiperda* foi feita mantendo as lagartas recém-eclodidas em copos plásticos de 50 mL contendo dieta artificial segundo Greene, Lepla e Dickerson (1976), onde foram inoculadas de 2 a 4 lagartas, as quais permanecem até a fase de pupa, vedados com uma tampa acrílica (Figura 8a). As pupas foram retiradas e colocadas em placa de Petri (Figura 8b) em seguida acondicionadas em gaiolas cilíndricas de PVC (24,0 cm altura x 14,5cm diâmetro), revestidas internamente com folhas brancas e fechadas na parte superior com pano tipo “voil” (Figura 8c). Foi

ofertada aos adultos como fonte de alimento, uma solução aquosa de mel a 10% fornecido via capilaridade por algodão hidrófilo. A cada dois dias as posturas foram coletadas e acondicionadas em saco plástico, mantidos em câmara climatizada regulada com temperatura de  $25\pm 2$  °C UR de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas (Figura 8 d).

Figura 8. Lagartas de *S. frugiperda* mantidas em dieta artificial (a). Pupas de *S. frugiperda* (b) Gaiolas com adultos (c). Armazenamento de todo ciclo em câmara climatizada (d).



Fonte: do Autor. (2018)

A população de *S. frugiperda* com resistência ao milho Herculex® expressando à proteína Cry1F a ser utilizada nesse trabalho, foi selecionada, por Leite et al. (2016) no laboratório de Ecotoxicologia e Manejo de Insetos (Embrapa Milho e Sorgo) e mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da UFLA, de acordo com a metodologia usada pelo mesmo autor, em câmara climatizada regulada com temperatura de  $25\pm 2$  °C, UR de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas.

A terceira população utilizada nos experimentos foi selecionada sua resistência de acordo com as metodologias adaptadas de Andow & Alstad (1998) e Leite et al. (2016).

Os insetos foram coletados no campo em regiões de plantio do milho PowerCore™ (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F), durante a 1ª safra de 2017 e selecionada sua resistência pelo Laboratório de Manejo Integrado de Pragas/ Resistência de Plantas a Insetos, do Departamento de Entomologia da UFLA e mantida no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da UFLA. Em laboratório, as lagartas foram mantidas até a fase de pupa em dieta artificial. (Figura 9)

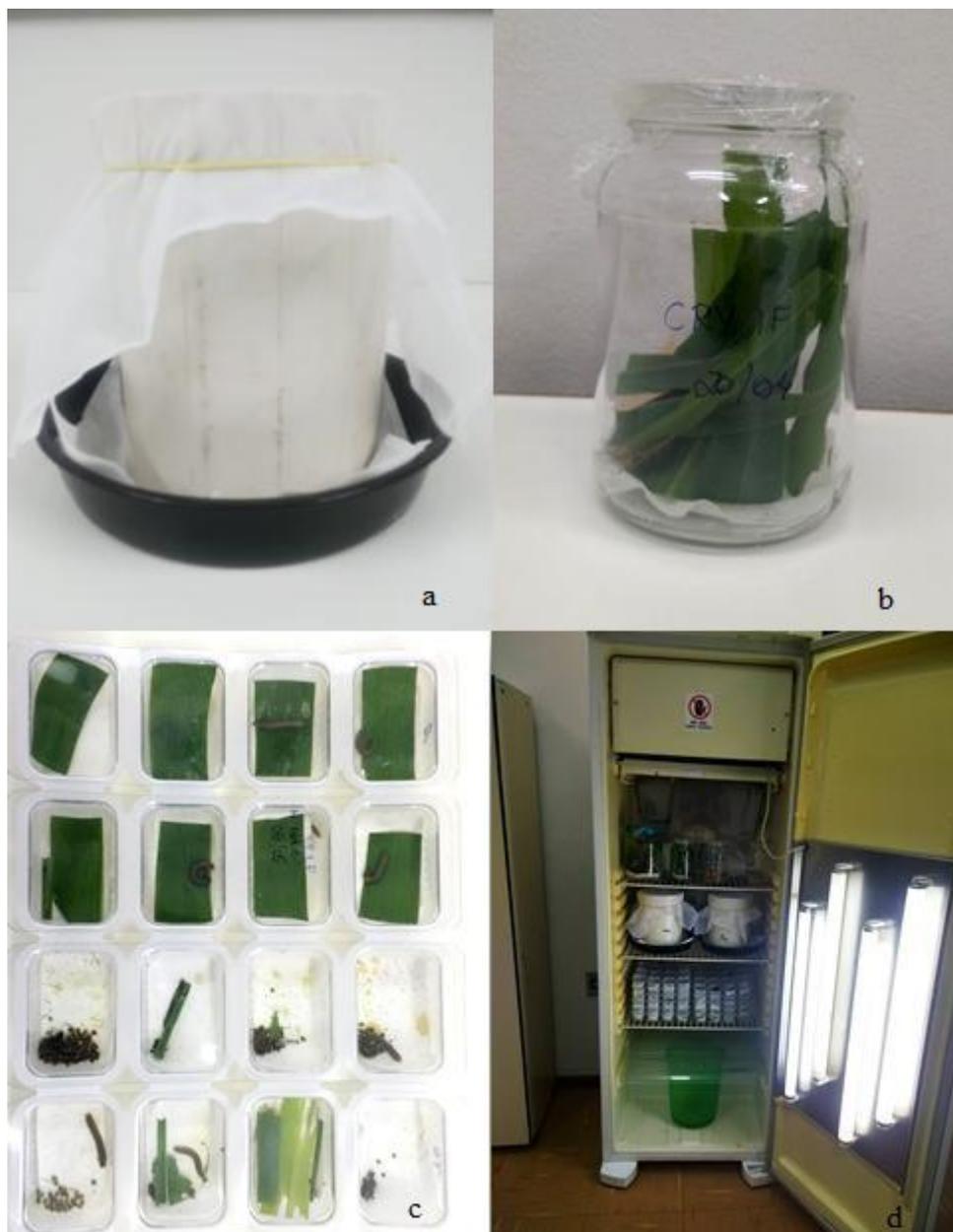
Figura 9. Lagartas do campo mantidas em dieta.



Fonte: do Autor. (2017)

Após a emergência dos adultos, foram separados casais em gaiolas de PVC semelhantes às utilizadas para manutenção de criação de laboratório e ofertado aos adultos como fonte de alimento, algodão embebido com uma solução de mel a 10% (Figura 10a). A cada dois dias as posturas foram coletadas e acondicionadas em saco plástico e o mel substituído, mantidos em câmara climatizada regulada com temperatura de  $25\pm 2$  °C UR de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. Após a eclosão, as neonatas foram transferidas para potes de vidro com capacidade para 500 mL, com papel filtro umedecido ao fundo e uma folha da região do cartucho nos estádios fenológicos  $V_4$  a  $V_6$ , permanecendo até o terceiro instar (Figura 10b). Após o terceiro instar as lagartas foram transferidas individualmente para bandejas de bioensaios contendo 16 poços de 50 mL cada, e em laboratório foram cortados pedaços dessas mesmas folhas com aproximadamente  $4\text{ cm}^2$  acondicionadas sobre papel filtro umedecido (Figura 10c). Depois de vedadas foram acondicionadas em câmara climatizada regulada com temperatura de  $25\pm 2$  °C, UR de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas (Figura.10 d). A cada dois dias, ou quando necessário, foram substituídos os tecidos vegetais. Somente as lagartas sobreviventes na tecnologia de milho PowerCore™ durante todo ciclo biológico foram considerada resistente.

Figura 10. Lagartas neonatas de *S. frugiperda* em potes de vidro com folhas de milho Bt  
(a). Individualização de lagartas de terceiro instar (b). Pupas transferidas para gaiolas até emergência dos adultos e oviposição (c). Armazenamento em câmara climatizada(d).



Fonte: do Autor (2018)

#### **5.4 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogenicos a *Spodoptera frugiperda* alimentadas por milho Bt expressando proteínas Cry**

Isolados de nematoides entomopatogênicos pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, *Steinernema carpocapsae* e os isolados de *Heterorhabditis amazonensis* RSC5 e JPM4, oriundos do banco de microrganismos entomopatogênicos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da UFLA, foram utilizados nos bioensaios de patogenicidade e virulência.

Com o objetivo de verificar se o consumo de milho Bt por lagartas de *S. frugiperda* resistentes a essa tecnologia, afeta a patogenicidade e a sobrevivência dos NEP a essas lagartas, se há possibilidade de efeito sinérgico de milho Bt e nematoides no controle dessas lagartas, e se a produção de NEP nesses hospedeiros foi afetada, foram feitos testes inoculando os NEP em *S. frugiperda* resistentes às proteínas e que consumiram somente milho Bt.

As lagartas utilizadas nos experimentos tanto das populações resistentes a tecnologias Bt como lagartas suscetíveis, de laboratório, com 15 dias após eclosão com pesos médios de  $0,143 \pm 0,014$  g para população resistente a Cry1F,  $0,216 \pm 0,031$  g para a população de laboratório (controle) e  $0,116 \pm 0,005$  g para a população resistente às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, tempo determinado em pré-teste, todas provenientes da criação do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos. As unidades experimentais foram placas de Petri de 5 cm de diâmetro.

Em cada placa de Petri, foram colocadas ao fundo duas folhas de papel filtro esterilizado, e 1 lagarta previamente pesada (Figura 11a) e em seguida aplicados 1 mL da suspensão padronizada determinada por Andaló et al. (2010) (Figura 11b).

Figura 11. Pesagem das lagartas (a). Aplicação da suspensão (b)



Fonte: do Autor (2018)

No primeiro experimento, insetos provenientes da criação de laboratório onde se alimentaram somente de dieta artificial, foram submetidos aos mesmos tratamentos que as populações resistentes, caracterizando controle populacional com aplicação de água destilada. Todas as aplicações foram feitas com ajuda de micropipeta e as placas vedadas com filme PVC e mantidas em câmara climatizada a  $25\pm 2$  °C UR de  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas (Figura 12).

Figura 12. Armazenamento dos tratamentos



Fonte: do Autor (2019)

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 30 repetições por tratamento, considerando-se cada tratamento um isolado de NEP e cada placa uma repetição. A mortalidade das lagartas foi verificada após 48 horas da aplicação e constatada a mortalidade pela presença do NEP, mediante os sintomas visuais e comprovados pelo recolhimento dos JI ao final do ciclo.

### 5.5 Bioensaio de produção de NEP

Para determinar se a produção de NEP foi afetada, foram selecionadas aleatoriamente 10 lagartas por tratamento do experimento onde foi determinada a mortalidade das populações por NEP, e colocadas em placas de Petri sobre papel filtro (câmara seca), mantidas por 5 dias em câmara climatizada à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas, condições favoráveis para a multiplicação dos NEP.

Ao final desse período, para a emergência e recuperação dos NEP, as lagartas foram separadas individualmente em armadilhas de White e colocadas em câmara climatizada à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas (Figura 13).

Figura 13. Lagartas transferidas para armadilha de White



Fonte: do Autor. (2018)

Uma vez observada a emergência dos JI, estes foram recolhidos através de lavagens sucessivas das lagartas de cada armadilha de White, utilizando água destilada esterilizada, vertendo o conteúdo da armadilha em proveta graduada para estabelecer o

volume total utilizado para recuperação desses JI (Figura 14a). Esse processo foi feito até a observação do esgotamento das larvas (Figura 14b).

Figura 14. Recolhimento dos JI



Fonte: do Autor (2018)

O volume diário recolhido foi submetido à contagem com auxílio de diluição seriada. Sabendo o volume total da suspensão e quantos JI/mL, obteve-se o valor total de NEP produzidos por dia por lagarta.

### **5.6 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP utilizando *Galleria mellonella* como hospedeiro**

Para o bioensaio de patogenicidade da geração subsequente foram utilizados larvas de *G. mellonella* como hospedeiro de suscetibilidade conhecida e para servir de modelo de interação em condições reais, onde os NEP se desenvolvem em um hospedeiro e logo produzidos, os JI saem em buscas de novos hospedeiros não específicos no solo.

Com objetivo de determinar o efeito das proteínas Cry nas gerações subsequentes de NEP quanto à sua patogenicidade, os NEP recolhidos das lagartas de *S. frugiperda* oriundos do bioensaio de produção de NEP, foram aplicados em 2 mL de suspensão aquosa com aproximadamente 500 juvenis infectantes (JI) em placa de Petri com 9 cm de diâmetro, duas folhas de papel filtro ao fundo e 10 lagartas de *G. mellonella*, (Figura 15a) e mantidas em câmara climatizada por 48 horas à temperatura

de  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas, condições favoráveis para a multiplicação dos NEP (Figura 15b).

Figura 15. Aplicação dos JI em *G. mellonella* (a). Armazenamento em câmara climatizada (b).



Fonte: do Autor. (2018)

As lagartas utilizadas no experimento, tanto para NEP produzidos por lagartas resistentes a tecnologias Bt como produzidos por lagartas suscetíveis, de laboratório, foram lagartas *de G. mellonella* provenientes da criação do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos. As unidades experimentais foram placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, considerando-se cada tratamento um isolado de NEP e cada placa uma repetição. A mortalidade das lagartas foi verificada após 48 horas da aplicação e constatada a mortalidade pela presença do NEP, mediante os sintomas visuais e dessecação.

Como controle, foram inoculados NEP produzidos pelas lagartas de *S. frugiperda* utilizadas no primeiro bioensaio.

## **5.7. Análise estatística**

### **5.7.1 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a *Spodoptera frugiperda* resistentes a proteínas Cry**

Para verificar se a mortalidade total de populações de *S. frugiperda* por NEP foi influenciada pela presença de proteínas Cry na alimentação, foi feita uma análise de modelos lineares generalizados (GLM). Foram construídos modelos, onde a mortalidade das populações de *S. frugiperda* por cada isolado de NEP utilizado no bioensaio foi utilizada como variável resposta. Como variáveis explicativas, utilizaram-se as populações resistentes a diferentes proteínas Cry e uma população de laboratório. Utilizou-se distribuição de erros do tipo binomial, ideal para dados de porcentagem ou binários (vivo ou morto), corrigindo para sub ou sobredispersão (Quasi-Poisson). Os modelos foram submetidos à análise de resíduo para a adequação da distribuição de erros. A análise de GLM foi realizada através do software R (R Development Core Team 2018).

### **5.7.2 Bioensaio de produção de NEP**

Para verificar se a produção total de NEP pelas populações de *S. frugiperda* foi influenciada pela presença de proteínas Cry na alimentação, foi feita uma análise de modelos lineares generalizados (GLM). Foram construídos modelos, onde a produção de NEP pelas populações de *S. frugiperda* por cada isolado de NEP utilizado no bioensaio foi usada como variável resposta. Como variáveis explicativas, utilizaram-se as populações resistentes a diferentes proteínas Cry e uma população de laboratório. Utilizou-se distribuição de erros do tipo Poisson, ideal para dados de contagem corrigindo para sub ou sobredispersão (Binomial Negativa). Os modelos foram submetidos à análise de resíduo para a adequação da distribuição de erros. A análise de GLM foi realizada através do software R (R Development Core Team 2018).

### **5.7.3 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP utilizando *Galleria mellonella* como hospedeiro**

Para verificar se a mortalidade total de *G. mellonella* por NEP da geração subsequente produzidos por populações de *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry foi influenciada pela presença de proteínas Cry na alimentação, foi feita uma análise de

modelos lineares generalizados (GLM). Foram construídos modelos, onde a mortalidade total de *G. mellonella* por cada isolado de NEP utilizado no bioensaio foi usada como variável resposta. Como variáveis explicativas, utilizaram-se os NEP produzidos por populações resistentes a diferentes proteínas Cry e NEP produzidos pela população de laboratório. Utilizou-se distribuição de erros do tipo binomial, ideal para dados de porcentagem, corrigindo para sub ou sobredispersão (Quasi-Binomial). Os modelos foram submetidos à análise de resíduo para a adequação da distribuição de erros. A análise de GLM foi realizada através do software R (R Development Core Team 2018).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry

No bioensaio de patogenicidade de NEP a *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry e alimentadas somente por milho Bt, o isolados *S. carpocapsae* não teve sua patogenicidade afetada quando exposto ao hospedeiro alimentado por milho expressando Cry 1F(F=63,661; P <0,001) e Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F (F=30,702; P <0,001 ) comparados com o tratamento controle.(Tabela 1)

Tabela.1 Resultados estatísticos de GLM para mortalidade das populações de *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry quando aplicados *S. carpocapsae*.

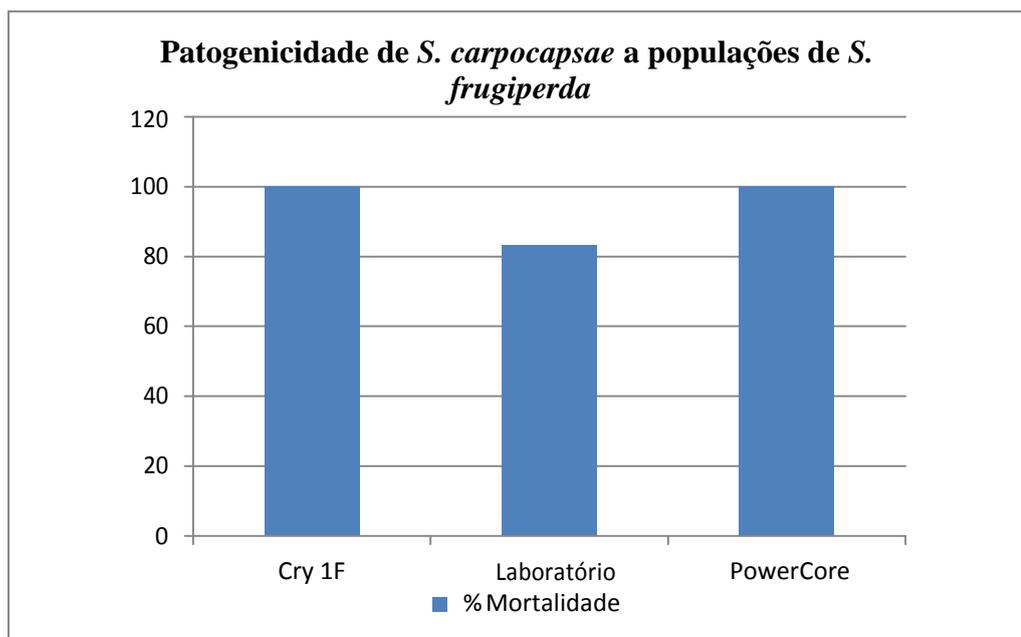
INTERAÇÕES	VALOR DE Z	VALOR DE P
cry – cryag	-11,278	<0,001 ***
labag – cryag	2,819	0,0545
lab – cryag	-8,928	<0,001 ***
pcag – cryag	0,470	0,9972
pc - cryag	-11,278	<0,001 ***
labag – cry	14,097	<0,001 ***
labca – cry	2,350	0,1743
pcag – cry	11,748	<0,001 ***
pc– cry	0,000	1,0000
lab – labag	-11,748	<0,001 ***
pcag – labag	-2,350	0,1742
pc – labag	-14,097	<0,001 ***
pcag – lab	9,398	<0,001 ***
pc - lab	-2,350	0,1746
pcca – pcag	-11,748	<0,001 ***

Fonte : Do autor (2019)

Nota: cry= lagartas resistentes a Cry1F; lab= lagartas de laboratório; pc= lagartas resistentes às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F; cryag= cry com aplicação de água; labag= lab com aplicação de água e pcag= pc com aplicação de água.

As médias das mortalidades das três populações não tiveram diferença significativa. (Figura 16)

Figura.16- Porcentagem de mortalidade de lagarta de *S. frugiperda* das populações resistentes e de laboratório quando aplicado *S. carpocapsae*.



Legenda: Porcentagem de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* das populações resistentes (Cry 1F) Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>™</sup> e a população de Laboratório ou controle, quando aplicados *S. carpocapsae*.

Para *H. amazonensis* isolado RSC5 houve diferença significativa entre os tratamentos ( $F=17,72$ ;  $P < 0,001$ ) e obteve-se efeito na patogenicidade do NEP em relação ao tratamento controle tanto para população resistente exposta a Cry 1F quanto para a população exposta a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F.(Tabela 2).

Tabela. 2 Resultados estatísticos de GLM para mortalidade das populações de *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry quando aplicados *H. amazonensis* isolado RSC 5.

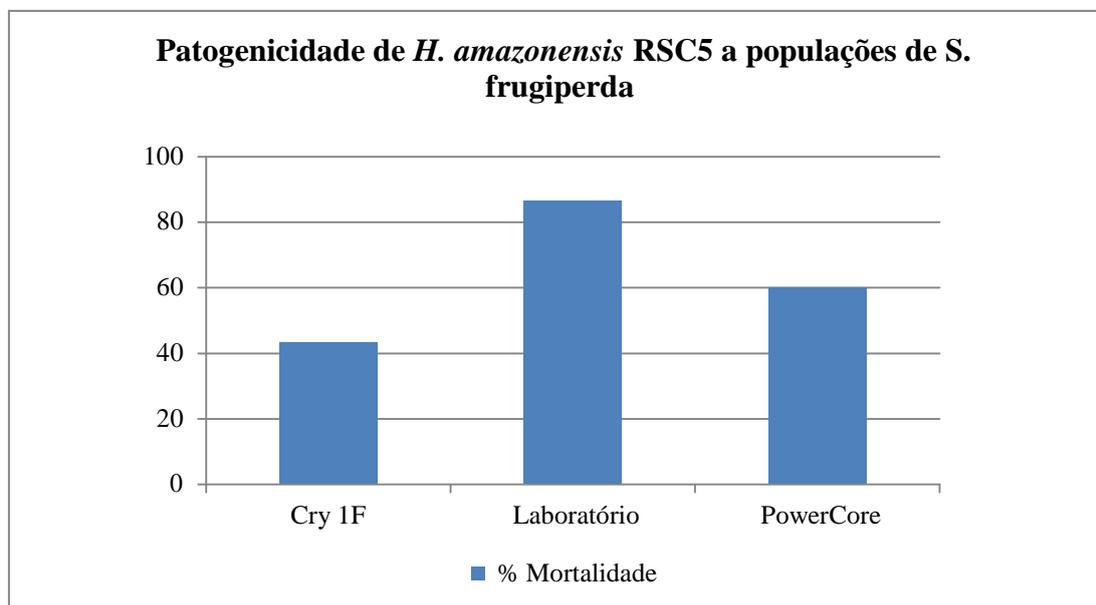
INTERAÇÕES	VALOR DE Z	VALOR DE P
cry - cryag	-2,933	0,03928 *
labag – cryag	1,956	0,36820
lab - cryag	-6,519	<0,001 ***
pcag – cryag	0,326	0,99951
pc - cryag	-3,585	0,00452 **
labag – cry	4,889	< 0,001 ***
lab – cry	-3,585	0,00459 **
pcag – cry	3,259	0,01416 *
pc – cry	-0,652	0,98694
lab – labag	-8,406	<0,001 ***
pcag – labag	-1,630	0,57880
pc – labag	-5,541	<0,001 ***
pcag – lab	6,844	<0,001 ***
pc - lab	2,933	0,03927 *
pc – pcag	-3,911	0,00131 **

Fonte : Do autor (2019)

Nota: cry= lagartas resistentes a Cry1F; lab= lagartas de laboratório; pc= lagartas resistentes às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F; cryag= cry com aplicação de água; labag= lab com aplicação de água e pcag= pc com aplicação de água.

A porcentagem de mortalidade da população de laboratório pelo isolado de *H. amazonensis* RSC5 foi maior quando comparadas as populações resistentes. (Figura 17)

Figura 17. - Porcentagem de mortalidade de lagarta de *S. frugiperda* das populações resistentes e de laboratório quando aplicado *H. amazonensis* RSC5.



Legenda: Porcentagem de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* das populações resistentes (Cry 1F) Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>™</sup> e a população de Laboratório ou controle, quando aplicados *H. amazonensis* RSC5.

Já para o NEP *H. amazonensis* isolado JPM 4 somente a população exposta ao milho expressando Cry 1F afetou a patogenicidade do mesmo, diferindo das populações alimentadas por milho Bt expressando Cry 1F e Cry1A.105, Cry2Ab2 e do tratamento controle.(Tabela 3).

Tabela. 3 Resultados estatísticos de GLM para mortalidade as populações de *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry quando aplicados *H. amazonensis* isolado JPM 4.

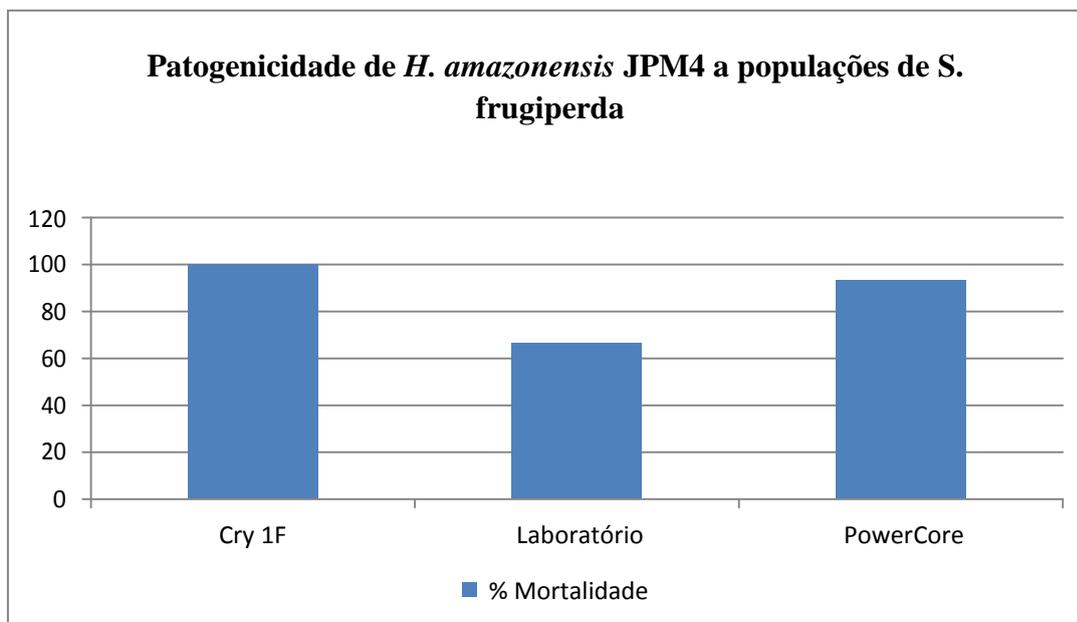
INTERAÇÕES	VALOR DE Z	VALOR DE P
cry - cryag	-9,206	<0,001 ***
labag – cryag	2,402	0,1554
lab - cryag	-6,004	<0,001 ***
pcag – cryag	0,400	0,9987
pc - cryag	-8,806	<0,001 ***
labag – cry	11,608	<0,001 ***
lab – cry	3,202	0,0172 *
pcag – cry	9,607	<0,001 ***
pc – cry	0,400	0,9987
lab – labag	-8,406	<0,001 ***
pcag – labag	-2,001	0,3415
pc – labag	-11,208	<0,001 ***
pcag – lab	6,404	<0,001 ***
pc - lab	-2,802	0,0571
pc – pcag	-9,206	<0,001 ***

Fonte : Do autor (2019)

Nota: cry= lagartas resistentes a Cry1F; lab= lagartas de laboratório; pc= lagartas resistentes às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F; cryag= cry com aplicação de água; labag= lab com aplicação de água e pcag= pc com aplicação de água.

A porcentagem de mortalidade de lagartas de laboratório foi menor em relação às populações resistentes quando aplicados (Figura 18)

Figura.18. Porcentagem de mortalidade de lagarta de *S. frugiperda* das populações resistentes e de laboratório quando aplicado *H. amazonensis* JPM4



## 6.2 Bioensaio de produção de NEP

No bioensaio de produção de NEP, houve diferença significativa entre os tratamentos ( $F= 23,693$ ;  $p=< 0,0001$ ). Uma diminuição de JI produzidos pelas lagartas de *S. frugiperda* quando essas eram alimentadas por milho Bt em relação à produção de JI por lagartas de laboratório alimentadas por dieta artificial foi observada. (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados estatísticos de GLM para produção de NEP das populações de *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry quando aplicados os NEP *Heterorhabditis* sp. JPM 4, *H. amazonensis* RSC 5, e *S. carpocapsae* (continua)

INTERAÇÕES	VALOR DE Z	PR(> Z )
CR - CJ	-3,653	<0,01**
CS - CJ	1,987	0,5522
LJ - CJ	4,574	<0,01***
LR - CJ	1,92	0,5997
LS - CJ	14,204	<0,01***
PCJ - CJ	-0,845	0,9955
PCR - CJ	-1,707	0,7422
PCS - CJ	2,218	0,3937
CS-CR	5,64	<0,01***
LJ - CR	8,226	<0,01***
LR - CR	5,573	<0,01***
LS - CR	17,855	<0,01***
PCJ - CR	2,807	0,1139
PCR - CR	1,946	0,5813
PCS - CR	5,87	<0,01***
LJ - CS	2,587	0,1913
LR - CS	-0,067	1
LS - CS	12,217	<0,01***
PCS - CJ	2,218	0,3937
CS - CR	5,64	<0,01***
LJ - CR	8,226	<0,01***

Tabela 4 – Resultados estatísticos de GLM para produção de NEP das populações de *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry quando aplicados os NEP *Heterorhabditis* sp. JPM 4, *H. amazonensis* RSC 5, e *S. carpocapsae* (conclusão)

LR - CR	5,573	<0,01****
LS - CR	17,855	<0,01****
PCJ - CR	2,807	0,1139
PCR - CR	1,946	0,5813
PCS - CR	5,87	<0,01****
LJ - CS	2,587	0,1913
LR - CS	-0,067	1
LS - CS	12,217	<0,01****
PCJ - CS	-2,833	0,1058
PCR - CS	-3,694	<0,01**
PCS - CS	0,231	1
LR - LJ	-2,654	0,1643
LS - LJ	9,63	<0,01****
PCJ - LJ	-5,42	<0,01****
PCR - LJ	-6,281	<0,01****
PCS - LJ	-2,356	0,3089
LS - LR	12,284	<0,01****
PCJ - LR	-2,766	0,1254
PCR - LR	-3,627	<0,01**
PCS - LR	0,298	1
PCJ - LS	-15,049	<0,01****
PCR - LS	-15,911	<0,01****
PCS - LS	-11986	<0,01****
PCR - PCJ	-0,862	0,9948
PCS - PCJ	3,064	0,0562
PCS - PCR	3,925	<0,01**

Fonte: do autor

Nota: CR= lagartas resistentes a Cry1F; L= lagartas de laboratório; PC= lagartas resistentes as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, R= RSC 05, J= JPM4 E S = *S. carpocapsae*.

Para a produção de JI do NEP *S. carpocapsae* pela população de *S. frugiperda* resistente Cry 1F alimentada somente por milho Bt expressando essa proteína, houve diferença significativa quando comparado com a produção pelo tratamento controle (Tabela 5), bem como a produção dos NEP pela população resistente às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F.(Figura19)

Para o NEP *H. amazonensis* isolado RSC5 a produção de JIs também houve diferença significativa (Tabela 5), e teve seu valor reduzido quando comparamos a produção pelas populações resistentes às proteínas Cry, Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, quando comparadas ao tratamento controle. (Figura19)

Também houve diferença significativa para *H. Amazonensis* JPM4 (Tabela 5), e redução na produção de JIs pelas populações resistente Cry 1F e Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F quando comparados aos tratamento controle. (Figura 19).

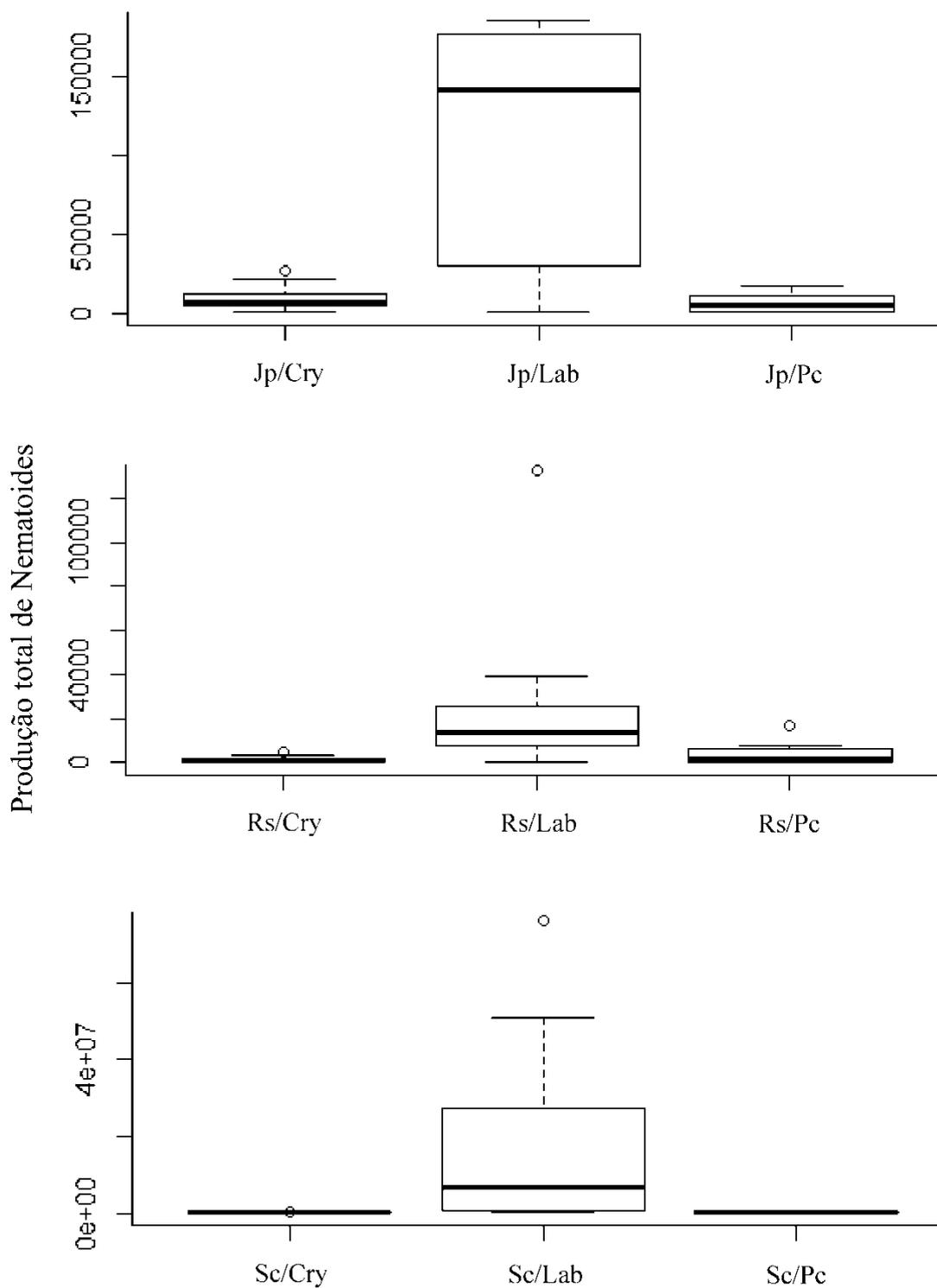
Tabela 5 - Produção acumulada (média  $\pm$  SE) de juvenis infectantes (JI) por grama de lagartas das populações de *Spodoptera frugiperda*. Tratamentos seguidos por letras distintas são significativamente diferentes (GLM Poisson, comparação pareada,  $p < 0,001$ ).

POPULAÇÕES	NEMATÓIDES		
	<i>S. carpocapsae</i>	<i>H. amazonensis</i> RSC5	<i>H. amazonensis</i> JPM4
Pop1	27755,6 $\pm$ (0,0037)b	1390,0 $\pm$ (0,0091)b	9665,0 $\pm$ (0,0032) b
Pop2	31375,0 $\pm$ (0,0036)b	3905,0 $\pm$ (0,0059) b	6170,0 $\pm$ (0,0051) b
Pop3	18191000,0 $\pm$ (0,0032)a	26785,6 $\pm$ (0,0037)a	109590,0 $\pm$ (0,0033) a

Fonte : Do autor (2019)

Nota: Pop1 = Lagartas resistentes a Cry 1F, Pop2= Lagartas resistentes a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F e Pop 3= lagartas de laboratório.

Figura.19- Produção dos JI por grama de lagarta de *S. frugiperda*.



#### Interações entre NEP e as diferentes populações de lagartas

Legenda: Produção de JIs por grama de lagartas das populações resistentes (Cry) Herculex<sup>®</sup> e (Pc) PowerCore<sup>™</sup> e (Lab) Laboratório ou controle, quando aplicados (Jp) *H. amazonensis* JPM4, (Rs) *H. amazonensis* RSC5 e (Sc) *S. carpocapsae*.

### 6.3 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP utilizando *Galleria mellonella* como hospedeiro

Para o bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP houve diferença significativa entre os tratamentos.

Não houve diferença significativa na patogenicidade dos NEP da geração subsequente de *S. carpocapsae* ( $F= 2,1852$ ;  $p=0,132$ ) recolhidos das populações resistentes e controle utilizadas nesse bioensaio quando aplicados e *G. mellonella*.

Já para o NEP *H. amazonensis* isolado RSC5, houve uma diminuição significativa da mortalidade das lagartas de *G. mellonella* quando infectadas por NEP produzidos pelas lagartas da população resistente Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F comparados tanto com tratamento controle como no produzido por lagartas resistentes somente a Cry 1F( $F=22,771$ ;  $p<0,001$ ). (Tabela 6) (Figura 20).

Tabela 6. Análise estatística para mortalidade de *Galleria mellonella* quando aplicados JIs do NEP *H. amazonensis* isolado RSC 5.

INTERAÇÕES	VALOR Z	Pr(>[z])
lab – cry	-0,487	0,875
pc – cry	-4,817	<0,001***
pc – lab	-4,704	<0,001***

Fonte : Do autor (2019)

Nota: Lab= JI produzidos por lagartas *S. frugiperda* de laboratório; cry= JI produzidos por lagartas de *S. frugiperda* resistentes a Cry 1F; pc= JI produzidos por lagartas de *S. frugiperda* resistentes a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry 1F.

Para *H. amazonensis* isolado JPM 4 houve diferenças na patogenicidade ( $F=9,8435$ ;  $p<0,001$ ) quando produzidos pela população resistente a Cry 1F, quando comparadas com o tratamento controle porém o contrário aconteceu com a população resistente Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F, onde não foram observadas diferenças em relação ao tratamento controle.(Tabela 7) (Figura 20).

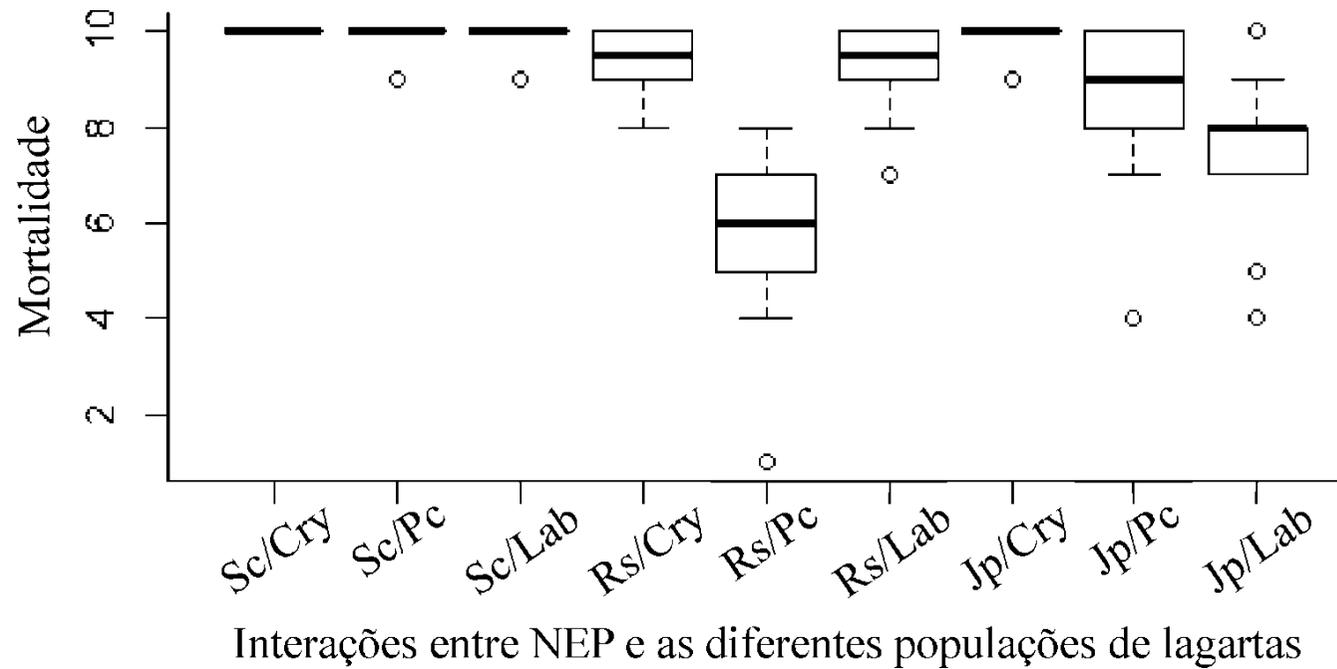
Tabela 7. Análise estatística para mortalidade *Galleria mellonella* quando aplicados JIs do NEP *H. Amazonensis* isolado JPM 4.

INTERAÇÕES	VALOR Z	Pr(>[z])
lab – cry	-2,6760	0,0176 *
pc – cry	-2,2660	0,0535
pc – lab	1,145	0,4643

Fonte: Do autor (2019)

Nota: Lab= JI produzidos por lagartas *S. frugiperda* de laboratório; cry= JI produzidos por lagartas de *S. frugiperda* resistentes a Cry 1F; pc= JI produzidos por lagartas de *S. frugiperda* resistentes a Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry 1F.

Figura 20- Mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* infectadas por isolados de NEP.



Legenda: Mortalidade de *Galleria mellonella* pelos isolados de NEP *H. amazonensis* JPM4 (Jp), *H. amazonensis* RSC5 (Rs) e *S. carpocapsae* (Sc) produzidos pelas populações resistentes (Cry) Herculex® e (Pc) PowerCore™ e (Lab) Laboratório ou controle.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry

As populações de *S. frugiperda* resistentes alimentadas somente com milho Herculex® e PowerCore™ que expressam as proteínas Cry1F e Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F respectivamente, apresentaram mortalidade pelo NEP *S. carpocapsae* similares quando comparadas à mortalidade causada por esses mesmos NEP em lagartas de laboratório. A capacidade desses isolados de infectar *S. frugiperda* não foi afetada pela alimentação com milhos expressando proteínas Cry. Esses resultados corroboram os encontrados por Adel et al. (2013) que avaliaram os efeitos causados pela alimentação do hospedeiro *Spodoptera littoralis*, por batatas geneticamente modificadas expressando a toxina Cry3Aa (Bt) ou aglutinina *Galanthus nivalis* (GNA), sobre o NEP *S. feltiae* e relataram nenhum efeito antagônico no desenvolvimento e sobrevivência dos NEP, tão pouco na patogenicidade do mesmo a *S. littoralis*.

Sabendo da relação íntima dos NEP com seus hospedeiros, onde eles completam de duas a três gerações se nutrindo dos tecidos do hospedeiro e das bactérias simbióticas, e que o conteúdo nutricional tem papel importante na suscetibilidade do hospedeiro aos NEP (Shapiro-Ilan et al. 2008) e que o NEP *S. carpocapsae* foi capaz de infectar e levar o hospedeiro a morte, podemos inferir que a presença dessas proteínas Cry no hospedeiro não foi capaz de interferir na patogenicidade de *S. carpocapsae*.

Por outro lado, para o NEP *H. amazonenses* isolado RSC5 e houve diferenças significativas e efeito na patogenicidade às populações de *S. frugiperda* resistentes as proteínas Cry1F e Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F em relação ao controle foi observada. Já para o NEP *H. amazonenses* isolado JPM4 houve diferenças significativas e efeito na patogenicidade somente quando aplicados à população de *S. frugiperda* resistente a Cry1F quando alimentadas por milho Bt expressando essa proteína.

Os mecanismos de resistência de insetos a Bt encontrados em alguns estudos estão ligados a diferentes fatores, dentre eles diferentes modos de ação e ligação das proteínas aos receptores (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Segundo Tabashnik et al., (2003) as mutações nos genes receptores glicosídicos das proteínas Cry são a principal forma de resistência em Noctuídeos, contudo, vários fatores estão ligados à seleção de resistência e devem ser considerados de maneiras distintas e isoladas para cada caso,

considerando os efeitos variáveis de cada cultura, o ambiente e a proteína (PETERSON; BEZUIDENHOUT; VAN DEN BERG, 2017).

Os insetos desenvolveram defesas contra a infecção por nematoides como defesas morfológicas, comportamentais e imunológicas que dificultam ou até mesmo impedem a infecção por NEP. Essas defesas podem estar relacionadas com respostas imunológicas celulares ou humorais, como fagocitose e encapsulação, peptídeos antimicrobianos induzíveis, moléculas de adesão celular, lisozima, lectinas e o sistema propeno-oxidase relacionados a respostas humorais (LALITHA, 2018 HOFFMANN, 2003).

A melanização dos NEP pela ação da fenoloxidase pode ser um mecanismo de defesa pelo qual as larvas de lepidópteros afastam a infecção de nematóides (LI et al. 2007) sendo considerada em três espécies com resistência a Bt: *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (RAHMAN et al. 2004, MA et al. 2005, WANG et al. 2007). Para *E. kuehniella* e *H. armigera*, a resistência de Bt foi associada com maior atividade fenoloxidase (RAHMAN et al. 2004, MA et al. 2005). No entanto, alguns dados sugerem que a maior atividade da fenoloxidase não causa maior resistência Bt (RAHMAN et al. 2007).

Para sobreviver dentro do hospedeiro e completar seu ciclo, os nematóides entomopatogênicos precisam escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico desse hospedeiro ou que eles tenham mecanismos para escapar do encapsulamento e da melanização (ALMENARA, 2012; DOWDS & PETER, 2002) com a possível maior atividade de fenoloxidase relacionada à resistência a Bt. É provável que genótipos resistentes a Bt possam ter resistência elevada aos entomopatógenos e ter contribuído para a diminuição da patogenicidade do NEP *H. amazonensis*, isolados RSC5 e JPM 4 a estas lagartas.

Os nematoides dependem de diferentes tipos de sinais químicos, vibrações ou gradientes de temperatura, e do próprio hospedeiro, para serem atraídos (GRIFFIN, 2012). Esses fatores podem ter sido afetados pela alimentação por Bt e a própria seleção de resistência das populações de *S. frugiperda* às proteínas Cry podem ter causado distúrbios nesses insetos que justificariam essa interação negativa.

O fato dos NEP testados nesse trabalho não terem sido afetados da mesma forma pode ser explicado de acordo com Li et al (2007) , que demonstraram que as

respostas imunes dos hospedeiros em relação aos NEP diferem grandemente entre hospedeiros e são específicas para cada isolado.

Novos trabalhos devem ser feitos a fim de investigar os efeitos da alimentação por milho Bt nessas populações e o efeito da própria seleção de resistência a Bt, que podem causar efeitos sub-letais a essas lagartas, que justifiquem as hipóteses levantadas nesse trabalho, determinando quais NEP podem ser usados juntamente com OGM em programas de MIP.

## **7.2 Bioensaio de produção de NEP**

Os resultados obtidos nesse bioensaio mostraram que a produção de todos os isolados de NEP utilizados, produzidos por hospedeiros resistentes às toxinas Cry foram afetados e tiveram diminuição do número de JI produzidos por esses hospedeiros em relação ao tratamento controle.

O fato da mortalidade não ter sido afetada para todos os isolados usados no bioensaio anterior, não impede a diminuição na produção de JI, ou seja, mesmo que os NEP tenham sido capazes de levar esses hospedeiros a morte não significa que eles irão promover um ambiente satisfatório para esses NEP se reproduzirem, visto que vários fatores interferem na produção de NEP, entre eles estão: a escolha do inseto hospedeiro, suscetibilidade, concentração, deterioração de linhagens (GREWAL, 2002; LABAUDE, 2018).

Nesse contexto os efeitos das toxinas Cry podem ter interferido na atividade metabólica e na qualidade nutricional do hospedeiro bem como em seu tamanho e consequentemente afetar a produção dos JI. Mendes et al (2011) observaram uma diminuição significativa da biomassa de larvas e pupas de *S. frugiperda* quando alimentadas por milho Bt em relação as seus isôgenicos, ou seja, as larvas que não morreram, ao se alimentar do milho Bt, tiveram o seu desenvolvimento comprometido.

ADAMS & NGUYEN (2002) afirmaram que a produção de JI é dependente de forma direta apenas do tamanho do corpo do hospedeiro, pois insetos hospedeiros de tamanhos maiores permitem um maior número de gerações, tendo em vista a disponibilidade de alimento. Já Molina et al (2004) demonstraram que não só o tamanho, mas também as espécies de nematoides entomopatogênicos afetam a produção de JI. Shamseldean & Atwa (2001) afirmaram que as diferenças de produção de JI foram devido a diferenças entre o tamanho do hospedeiro, comprimento e reservas alimentares, quando compararam suscetibilidade e produção de NEP com os

hospedeiros *G. mellonella*, *S. littoralis*, *A. ipsilon* e *Schistocerca gregária*. E ainda de acordo com Shapiro-Ilan et al. (2008), a nutrição e a aptidão dos insetos podem ser afetadas pela diversidade espécies de plantas hospedeiras, devido à variação dos compostos vegetais secundários, por exemplo, e criam condições ambientais diferentes que podem por sua vez afetar a eficácia do nematoide entomopatogênico.

Nesse contexto, a média de peso das lagartas das populações resistentes difere da população controle e conforme os autores acima mencionados, o tamanho do hospedeiro é fundamental para produção de NEP e certamente interfere na produção.

Outro ponto a ser considerado são as bactérias simbiotes. Almenara et al.(2012) propõe que a regulação do crescimento populacional e a continuidade do ciclo de vida por várias gerações dos nematoides possam ser regulados por metabólitos de origem bacteriana e pela presença das células em si, que servem como fonte de alimento. Essas bactérias se desenvolvem no interior do hospedeiro, e considerando o fato já citado, desse hospedeiro ter sua qualidade nutricional afetada, provavelmente essas bactérias não conseguiram completar seu ciclo, pois elas se nutrem do conteúdo do hospedeiro tendo sua patogenicidade afetada.

Estudos relacionados às bactérias produzidas por NEP que se desenvolveram esses hospedeiros, a relação dos compostos vegetais secundários das plantas utilizadas com a nutrição desses hospedeiros e ainda estudos sobre o sistema imunológico dos mesmos, devem ser feitos a fim de elucidar as possíveis causas desses efeitos nos NEP, visto que programas de MIP podem incluir os NEP no manejo de *S. frugiperda* juntamente com as tecnologias Bt, e não há na literatura informações sobre essa interação.

### **7.3 Bioensaio de patogenicidade da geração subsequente de NEP em *Galleria mellonella***

Houve diferenças significativas nas mortalidades de *G. mellonella* quando utilizados os NEP *H. amazonensis* isolado RCS 5 da geração subsequente produzidos por Cry 1F e Cry1F e Cry1A. 105, Cry2Ab2 quando comparados com mortalidades *G. mellonella* pelos JI do tratamento controle, ou seja NEP produzidos pelas lagartas de *S. frugiperda* resistentes as proteínas Cry tiveram sua capacidade infectiva reduzida. Esses resultados ainda se diferem quando comparados NEP produzidos pelas lagartas de *S. frugiperda* resistentes ao milho expressando uma proteína ou mais, o que sugere que o efeito causado foi pela presença da proteína e pela quantidade ou diversidades delas.

Para os JI de *H. amazonensis* isolado JPM 4 produzidos pela população resistente Cry 1F houve diferenças significativas nas mortalidades *G. mellonella* quando comparadas com a mortalidade do tratamento controle, mas não para mortalidade causada por JI produzidos pela população resistente às proteínas Cry1F e Cry1A.105, Cry2Ab2. Isso evidencia o efeito negativo da presença de proteínas e pela quantidade ou diversidades delas, comportamento que contrasta com JI produzidos por *H. amazonensis* isolado RCS 5. Laznik et al. (2010) demonstraram que os nematoides pertencentes à mesma espécie, mas originários de diferentes isolados, podem variar drasticamente em sua eficácia, resultados que corroboram com os encontrados nesse bioensaio.

Além disso, no bioensaio de patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a *S. frugiperda* resistentes a proteínas Cry e produção desses NEP, já haviam sido relatados efeitos negativos dessas interações acima citadas. Shapiro-Ilan et al. (2008) relataram que os componentes da dieta dos insetos hospedeiros também podem afetar a eficácia das JI das gerações subsequentes.

Já os JI de *S. carpocapsae* não tiveram sua patogenicidade afetada, resultado que corrobora com os resultados dos bioensaios anteriores (patogenicidade e produção) em que nenhum dos parâmetros avaliados foram afetados.

Outros fatores são importantes para manter a viabilidade e infectividade dos NEP e um deles é a quantidade lipídica presente nos JI. Os JI não se alimentam e contam com uma quantidade finita de reservas energéticas que são fundamentais para sua sobrevivência e sucesso de infecção. Alguns autores já demonstraram a importância dessas reservas principalmente lípidos e o conteúdo de glicogênio na infectividade em várias espécies de nematóides (MENTI H.; WRIGHT, D.J.; PERRY, R.N., 2000; PATEL, M.N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D.J, 1997 a ; PATEL, M.N. & WRIGHT, D.J,1997b)

O lipídio é uma das fontes de energia para os JI e alguns trabalhos de compatibilidade de produtos químicos e NEP, demonstraram que a viabilidade dos NEP era mantida quando expostos a produtos químicos, porém sua capacidade infectiva era reduzida. Nesse contexto SABINO et al. (2014) avaliaram a exposição de NEP a alguns produtos químicos e revelaram uma redução no teor lipídico e infectividade desses NEP indicando relação entre os resultados. Ainda SABINO et al. (2017) avaliaram a liberação de CO<sup>2</sup> e a atividade metabólica dos JI bem como atividade das bactérias

mutualísticas dos NEP quando expostos a produtos químicos revelando alteração na atividade metabólica em consequência do aumento da liberação de CO<sup>2</sup>, e em adição, alguns produtos retardaram o desenvolvimento das bactérias simbióticas.

Sabendo que os NEP utilizados nesse bioensaio foram produzidos em hospedeiros que se alimentaram de proteínas Cry, e que alguns fatores podem alterar a atividade metabólica dos NEP e ainda que essa alteração possa afetar as reservas energéticas importantes para infectividade dos NEP, supõe-se que assim como quando expostos a produtos químicos essa presença da proteína Cry no organismo do inseto podem ter alterado a atividade metabólica desses JI aumentando seu gasto energético, afetando a capacidade infectiva e patogenicidade da geração subsequente.

Além das reservas energéticas dos JI serem importantes para sua infectividade, a relação simbiótica estabelecida entre eles e suas bactérias mutualísticas são a principal causa da patogenicidade dos NEP. French-Constant et al (2003) divide o ciclo de simbiose-parasitismo entre *Photorhabdus*/nematóide/inseto por exemplo, em três estágios onde o primeiro estágio o nematóide possui a bactéria resistente a estresse ambiental, no segundo estágio é onde ocorre a multiplicação dessas bactérias no interior do hospedeiro morto e a liberação de diversas exoenzimas e toxinas, sendo esse estágio essencial para simbiose e a capacidade reprodutiva do nematóides, e um terceiro estágio que está associado com a formação dos JI e a colonização deles pela sua bactéria associada. Os estágios de simbiose-parasitismo estão intimamente ligados ao hospedeiro e principalmente à qualidade nutricional deste e partindo do pressuposto, que esses hospedeiros foram afetados pela seleção de resistência e a alimentação contínua de milho Bt, que podem causar efeitos sub-leitais como qualidade nutricional desses insetos resistentes entre outros, é provavelmente que o desenvolvimento dessas bactérias tenha sido afetada diminuindo sua capacidade patogênica.

Estudos relacionados às características fisiológicas e bioquímicas dos JI da geração subsequente devem ser conduzidos e ainda estudos sobre o desenvolvimento das bactérias simbióticas desses JI são sugeridos para verificar possíveis efeitos de supressão de seu crescimento quando expostas a hospedeiros resistentes que se alimentaram somente de proteínas Cry.

Nematóides entomopatogênicos são considerados excelentes agentes de controle microbiano devido sua capacidade de infectar insetos de várias espécies, por apresentarem ciclo curto e levarem insetos à morte rapidamente além de serem compatíveis com alguns métodos de controle. A utilização em conjunto dos NEP e

culturas geneticamente modificadas para impor custo de resistência a insetos é possível, porém cada caso deve ser tratado em particular, visto que os nematoides se comportam de maneira distinta em relação ao hospedeiro e o ambiente.

Os NEP possuem estratégias e comportamentos em relação ao hospedeiro e o ambiente em que se encontra que são fundamentais para seu sucesso. Assim devem-se conhecer os efeitos dessas interações e é necessário mais pesquisas sobre os parâmetros biológicos dos hospedeiros e dos NEP quando expostos as proteínas Cry expressas por milho Bt.

Conhecer o impacto dessas interações é de extrema importância visto que são duas estratégias de controle de baixo impacto a organismos não-alvo devido suas especificidades, apresentarem mecanismos de ação distintos e serem menos tóxicos ao ambiente principalmente em relação a inseticidas químicos.

## 8. CONCLUSÕES

A patogenicidade *H. amazonensis* isolado RSC 05 a populações de *S. frugiperda* que se alimentaram somente de milho Bt expressando proteínas Cry. é afetada negativamente.

Houve diferença na mortalidade por NEP as populações de *S. frugiperda* quando esses se alimentaram por milho Bt expressando uma proteína Cry (Cry1F) ou mais, (Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F), ou seja, a combinação dessas proteínas expressas pelo milho Bt interferiram negativamente na patogenicidade dos NEP mais do que quando somente uma proteína era expressa.

A produção de nematoides por lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de milho Bt expressando proteínas Cry como hospedeiro foi reduzida.

A geração subsequente dos NEP *H. amazonensis* isolado JPM 04, que se reproduziu em *S. frugiperda* alimentada por milho Bt expressando proteínas Cry, utilizando *Galleria mellonella* como hospedeiro, foi mais virulenta.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS BJ & NGUYEN KB. Taxonomy and systematics. Pp 1–34 in R. Gaugler, ed. **Entomopathogenic Nematology**. New York, NY: CABI. 2002.

ADEL, M. M., et al. Susceptibility of *Spodoptera littoralis* caterpillars to entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* after consumption of non-specific transgenic plants. **Archives of phytopathology and plant protection**, v. 45, n. 18, p. 2251-2260, 2012.

AFONSO, A.P.S. et al. Simulação do zoneamento ecológico da lagarta-do-cartucho no Rio Grande do Sul com o aumento de temperatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, p.607-612, 2009.

ALMENARA, D. P. et al. Nematoides entomopatogênicos. SILVA NETO, MAC da; WINTER, C.; TERMIGNONI, C.(Ed.). **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro, INCT-EM, p. 1-40, 2012.

ANDALÓ, V., et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1860-1866, 2010.

ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. The F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 572-578,1998..

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.

ARMSTRONG, C.L. et al. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, Madison, v.35, p.550-557, 1995.

ANDREWS, K. L. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologists**, 71(4):630-653, 1988.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda*(J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em

diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010

BERNARDI, D. et al. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140130, 2015.

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.

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.

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.

CAPALBO, D. M. F et al. OGM e Biossegurança Ambiental. Costa, MAF and E Costa, MFB,(Orgs.), **Biossegurança de OGM: uma visão integrada**, Publit, Rio de Janeiro, p. 190-192, 2009.

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

CÉLERES. Informativo biotecnologia. 2017. Disponível em:<<http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>> . Acesso em: 08 de agosto. 2018.

COMAS,C. et al. No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. **Transgenic Research**, London, v. 23, n. 1, p.135-143,2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos – Safra 2018/2019: quarto levantamento. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)> . Acesso em: 11/02/19

CORY, J.S. Evolution and the microbial control of insects. **Evolutionary applications**. v. 5, p. 455-469, 2012.

COSTA, T. E. M. M., et al. Avaliação de risco dos organismos geneticamente modificados. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 327-336, 2011.

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.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS fev. 1999. 26 p. Circular Técnica 31, Embrapa Milho e Sorgo.

CRUZ, I; BIANCO, R. Manejo de pragas na cultura de milho safrinha. In: Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA**, 6.; **CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA**, 2.; **SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM DE GRÃOS DO MERCOSUL**, 2., 2001, Londrina. Valorização da produção e conservação de grãos no Mercosul: resumos e palestras. Londrina: FAPEAGRO: IAPAR, 2001. p. 79-112., 2001.

CTNBio - **Conselho Técnico Nacional de Biossegurança**. Disponível em <<http://www.ctnbio.gov.br/>>. Acesso em 14 de agosto de 2018.

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.

DEVILLIERS, S. M.; HOISINGTON, D. A. The trends and future of biotechnology crops for insect pest control. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 23, p. 4677-4681, 2011.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I. & OMOTO, C. Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

DILLON, A.B. et al. Suppression of the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) in pine stumps by entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. **Biological Control**, v. 38, n. 2, p. 217-226, 2006.

DOWDS, B.C., & PETERS, A. Virulence mechanisms. In: **Entomopathogenic Nematology**, p. 79–98 ed. Gaugler, R. CABI Publishing, Wallingford, UK. 2002

EDGERTON, M.D. et al. Transgenic insect resistance traits increase corn yield and yield stability. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 493-496, 2012.

FARIAS, J. R. et al. Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 6, p. 2182-2189, 2014.

FERRÉ, J; VAN RIE, J. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, v. 47, n. 1, p. 501-533, 2002.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: Alves, S. B. (ed). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. Ed. FEALQ, Piracicaba, p. 541-56, 1998

FORST, S. et al. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 47-72, 1997.

FUXA, J.R.; RICHTER, A. R.; ACUDELO-SILVA, F. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. **Journal of Nematology**, v. 20, n. 1, p. 91, 1988.

GALINAT, W.C. The origin of maize: grain of humanity. New York: **New York Botanical Garden Journal**, v. 44, p.3-12, 1995.

GALLO, D.; et al.. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002.

GASSMANN, A. J. et al. Effect of entomopathogenic nematodes on the fitness cost of resistance to Bt toxin Cry1Ac in pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 3, p. 920-926, 2006.

GAUTAM, S., et al. Tri-trophic studies using Cry1Ac-resistant *Plutella xylostella* demonstrate no adverse effects of Cry1Ac on the entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 1, p. 115-120, 2014.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**. v.43, p. 701-726. 1998

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 488-497, Aug. 1976.

GREWAL, P.S. & R. GEORGIS. Entomopathogenic nematodes, p.271-299. In F.R. Hall & J.J. Menn (eds.), **Biopesticides: use and delivery**. Humana Press, Totowa, NJ, p.,677, 1998.

GREWAL, P. S.; NARDO, E. A.B DE; AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.

GRIFFIN, C. T. Perspectives on the behavior of entomopathogenic nematodes from dispersal to reproduction: traits contributing to nematode fitness and biocontrol efficacy. **Journal of nematology**, v. 44, n. 2, p. 177, 2012.

GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. S. ; DA CUNHA, U. S. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B(Coord.). **Produção de milho e sorgo em várzea**. 2000, p. 87-102.

HALLAUER,A.R.; EBERHART, S.A. Reciprocal full-sib. **Crop science**, v.10 p. 315-316. 1970.

HEAD G.P. ; GREENPLATE J., The design and implementation of insect resistance management programs for *Bt* crops. **GM Crops & Food**,v.3,p.144–153, 2012.

HOFFMAN,J.A. The immune response of *Drosophila*. **Nature** , v. 426, p. 33-38. 2003.

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. 2016.

HUEY, R.B.& PIANKA, E.R. Ecological consequences of foraging mode. **Ecology**, Washington, .62, n.4, p.991-999, 1981.

KAYA, H. K.; BURLANDO, T. M. Development of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in diseased insect hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 164-168, 1989.

KNIPLING, E. F. Regional management of the fall armyworm – a realistic approach? **Florida Entomologist**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 468-480, 1980.

KOPPENHOFER AM, Kaya HK.. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. **Biological Control**. V. 8, p.131–137, 1997.

KOPPENHÖFER, A.M. **Nematodes**. In: LACEY, L.A. & H.K. KAYA (ed). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Springer, New York., p. 249- 266, 2007.

KOPPENHOFER, A.M. et al. Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. **Biological Control**, v.14, p.37 44,1999.

LABAUDE, S. & GRIFFIN, C. Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. **Insects**, v. 9, n. 2, p. 72, 2018.

LALITHA, K. et al. Effect of entomopathogenic nematode of *Heterorhabditis indica* infection on immune and antioxidant system in lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, n. 2, p. 204-211, 2018.

Laznik, Ž. et al. The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. **Journal of Food, Agriculture and Environment.**, v. 8, p. 150–154,2010.

LEE, M.K. et al.. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab d-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n. 8, p. 4648–4657, 2003.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milharais. **O Biológico**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 105-113, 1953.

LI, X.-Y. et al. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 3-4, p. 365-374, 2007.

- LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Milho BT: alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. **Embrapa Milho e Sorgo- Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2002.
- 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.
- LUGINBILL, P. **The fall armyworm**. United States Department of Agriculture Technical Bulletin, Washington, v.34, p.1-91, 1928.
- MA, G., H. et al. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.35. p.729-739. 2005.
- MENTI, H.; WRIGHT, D.J.; PERRY, R.N. Infectivity of populations of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* in relation to temperature, age and lipid content. **Nematology** v. 2, p.515–521, 2000.
- MOLINA-OCHOA, J. et al. Virulence of six entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Vedalia Revista Internacional de Control Biológico (Mexico)**, v.3,p. 25-29,1996.
- MIRANDA, J. E. & SUASSUNA, N. D. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. **Embrapa Algodão-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2004.
- MOLINA, J. P. A.; MOINO JR, A.; CAVALCANTI, R. S. Produção in vivo de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 347-354, 2004.
- 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.

NODARI, R. O. Biossegurança, transgênicos e risco ambiental: os desafios da nova Lei de Biossegurança. **LEITE, RM; FAGÚNDEZ, PRA Biossegurança e novas tecnologias na sociedade de risco: aspectos jurídicos, técnicos e sociais.** Florianópolis: Conceito Editorial, p. 17-90, 2007.

O'BRIEN, W. J.; EVANS, B. I.; BROWMAN, H. I. . Flexible search tactics and efficient foraging in saltatory searching animals. **Oecologia**, New York, v.80, n.1, p.100-110, 1989.

OMOTO, Celso et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest management science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho.** Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

PATEL, M.N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D.J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: Observations on four *Steinernema* species. **Parasitology** , v.114, p. 489–496, 1997 a

PATEL, M.N. & WRIGHT, D.J. Glycogen: Its importance in the infectivity of aged juveniles of *Steinernema carpocapsae*. **Parasitology** , v.114, p. 591–596. 1997 b

PATERNIANI, E. Importância do milho na agroindústria. In: OSUNA, J. A; MORO, J. R. (Ed.). **Produção e melhoramento do milho.** Jaboticabal: Funep, 1995. p. 1-11..

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. SILVA. Melhoramento do milho. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p. 429-485, 1999.

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.

PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 2101-2103, 2001.

PIPERNO, D. R. et al. Late Pleistocene and Holocene environmental history of the Iguala Valley, central Balsas watershed of Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 11874-11881, 2007.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, v. 74, p. 24-33, 2005.

PONS, A.; BRESOLIN, M. A cultura do milho. **Trigo e Soja**. Porto Alegre, n. 57, p. 6-31, 1981.

RAHMAN, M.M., et al. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA v. 101, p. 2696-2699. 2004.

RICHTER, A.R. ; J.R. FUXA. Effect of *Steinernema feltiae* on *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Journal Economic Entomology**. v.83, p. 1286-1291, 1990.

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.

ROUSH, R. T. Managing pests and their resistance to *Bacillus-thuringiensis* – Can transgenic crops be better than sprays. **Biocontrol Science and Technology**, v.4, p.501–516, 1994.

SABINO, PH de S. et al. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with insecticides used in the tomato crop. **Nematoda**, v. 1, 2014.

SANAHUJA, G. et al. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 283-300, 2011.

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.

SHAMSELDEAN, M. M. M.& ISMAIL, A. A. Effect of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and the bacterium *Bacillus thuringiensis* as integrated biocontrol agents of

the black cutworm. **Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz**, v. 70, n. 4, p. 77-79, 1997.

SHAMSELDEAN, M. M., & ATWA, A. A. Comparative infectivity and reproduction of entomopathogenic nematodes isolated from the Arabian gulf, Egypt, France and USA. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.11(1/2), p.143-151.,2001.

SHAPIRO-ILAN, D., et al. Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, with entomopathogenic nematodes: effects of application timing, alternate host plant and nematode strain. **Biological Control**. 44, 207-215, 2008.

MENDES, S. M. et al. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A (b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 239-244, 2011.

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.

TABASHNIK B.E.; BREVAULT T.; CARRIERE Y. Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. **National Biotechnology** v.31,p.510–521,2013.

VERTUAN, H. V. et al. Eficácia de tecnologias de milho Bt no manejo de lepidópteros-pragas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 2017.

Wang, P., J. Z. et al. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73, p.1199-1207. 2007.

WILKES, G.H. Maize and its Wild Relatives. **Science**, v.177, n.4054, p.1071- 1077, 22 setembro 1972.

WOODRING, L.; KAYA, H.K. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques cooperative. **Southern cooperative series bulletin (USA)**, 1988.

UDRY, C. V.; DUARTE, W. **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Paralelo 15, 2000.