

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
DIVERSIDADE E MANEJO DE VIDA SILVESTRE
NÍVEL DOUTORADO

SILVIA MARTINS DE SALLES

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO TRITRÓFICA DE SOJA *BT*, *SPODOPTERA*
ERIDANIA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *DOLICHOZELE SP.*
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

SÃO LEOPOLDO

2017

Silvia Martins de Salles

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO TRITRÓFICA DE SOJA *BT*, *SPODOPTERA*
ERIDANIA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E *DOLICHOZELE SP.*
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE)

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora em Biologia,
pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia
da Universidade do Vale do Rio dos Sinos -
UNISINOS

Orientador: Dr. Uwe Horst Schulz

Coorientadora: Prof.^a Dra. Laura Massochin Nunes Pinto

São Leopoldo

2017

S168a Salles, Silvia Martins de.
Avaliação da interação tritrófica de Soja *Bt*, *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae) / Silvia Martins Salles. – 2017.
77 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, São Leopoldo, 2017.

“Orientador: Dr. Uwe Horst Schulz ; coorientadora: Prof.^a Dra. Laura Massochin Nunes Pinto.”

1. *Spodoptera eridania*. 2. Pragas - controle. 3. *Dolichozele* sp. I. Título.

CDU 576.88

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Bibliotecária: Bruna Sant’Anna – CRB 10/2360)

AGRADECIMENTOS

Existem situações na vida em que é fundamental poder contar com o apoio e a ajuda de algumas pessoas. Para a realização deste trabalho, pude fazê-lo com algumas, a quem prestarei, em poucas palavras, os mais sinceros agradecimentos.

Aos meus pais, Luis Olavo (em memória) e Fanny Helena de Salles, que apostaram em mim e incentivaram a concretização deste sonho.

Ao meu esposo, Francisco Guimarães Silveira, pela ajuda sem contestação em todas as fases de desenvolvimento da presente tese.

À Prof.^a Dra. Lidia Mariana Fiuza, ex-orientadora deste trabalho, pelos conhecimentos, pela atenção e pela boa vontade.

Ao Prof. Uwe, orientador deste trabalho, pela pronta disponibilidade, pelas sugestões, pelos conhecimentos e pela atenção, em todos os momentos.

Ao pesquisador Samuel Roggia, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela atenção, pelos conhecimentos transmitidos, pela cedência do laboratório e pelo financiamento dos experimentos.

À Dra. Laura Pinto, pelo saber compartilhado durante o período de trabalho, pelo apoio e pela amizade construída desde meu ingresso no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da UNISINOS.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia e da EMBRAPA, pela cooperação, pelas ideias no trabalho e pelos momentos de descontração.

A todos os professores do PPG-Biologia, pela essencial formação científica.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de Pós-Graduação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento da resistência representa uma ameaça ao controle de pragas com a utilização de plantas *Bt*. A conservação de inimigos naturais pode contribuir para reduzir a evolução da resistência à soja *Bt*, e entre os insetos de interesse para uso no controle de espécies do gênero *Spodoptera*, os parasitoides têm sido considerados os mais importantes devido à sua eficiência e à sua especificidade em relação ao hospedeiro. Nessa perspectiva, este estudo teve como objetivo avaliar as interações de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) e o endoparasitoide *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae), quando tratados com a soja *Bt* que sintetiza a proteína Cry1Ac. Para tanto, lagartas de *S. eridania* foram expostas aos seguintes tratamentos: (T1) não parasitadas e alimentadas com soja convencional, (T2) não parasitadas e alimentadas com soja *Bt*, (T3) parasitadas e alimentadas com soja convencional, (T4) parasitadas e alimentadas com soja *Bt*, e (T5) parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR. A biologia dos parasitoides descendentes de lagartas alimentadas com soja *Bt* foi avaliada através da observação da data de formação do casulo do parasitoide, a data de emergência, o sexo, a longevidade do parasitoide adulto e a sobrevivência. Na avaliação de preferência do parasitoide por lagartas alimentadas com soja *Bt* e soja não *Bt*, as lagartas receberam tempos de exposição diferentes à fêmea do parasitoide – a saber, 2h, 4h e 6h. Nos tratamentos com *Dolichozele* sp. isolados ou em conjunto com soja *Bt*, a mortalidade foi significativamente maior que o tratamento-controle ($F= 63,5$; $gl= 4,14$; $p=0,001$), apresentando mortalidade média de lagartas de 17,0 (T3), 20,2 (T4) e 17,5 (T5). Através dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), foi possível detectar a presença da proteína Cry1Ac em folhas de soja *Bt*, fezes de *S. eridania* e em larvas de *Dolichozele* sp. Os parasitoides emergidos de lagartas alimentadas com soja *Bt* e soja RR evidenciaram diferenças significativas na fase de pupa ($F= 15,058$; $gl=2$; $P=0,001$) nos tratamentos T4 (16,6 dias) e T5 (17,08 dias), quando comparados com o controle, T3 (18,2 dias). Parasitoides submetidos ao T4 (lagartas alimentadas com soja *Bt*) apresentaram menor sobrevivência em relação aos outros tratamentos (Kaplan–Meier, Log Rank, $X^2 =8,22$, $gl=2$, $p = 0,016$; Breslow, $X^2 =9,58$, $gl=2$, $P = 0,008$; Tarone-Ware, $X^2 =9,94$, $gl=2$, $p = 0,007$). Observou-se correlação positiva entre o tempo de exposição e a taxa de parasitismo de *Dolichozele* sp. em *S. eridania* (Rho de Spearman = 0,758, $p=0,001$). Portanto, os resultados deste estudo indicam que o parasitoide tem efeito positivo no controle de *S. eridania*, entretanto seu desenvolvimento e sua sobrevivência podem se influenciar pela presença da toxina *Bt*. *Dolichozele* sp. revelou potencial para agir de forma eficiente em estratégias de manejo da evolução da resistência às proteínas Cry em soja *Bt*, pois podem ajudar a suprimir as populações de pragas alvo e não alvo.

Palavras-chave: Soja *Bt*, *Spodoptera eridania*, *Dolichozele* sp.

ABSTRACT

The development of insect resistance poses a threat to pest control using *Bt* plants. The conservation of natural enemies may contribute to reduce the evolution of *Bt* soybean resistance. Among the insects of interest for use in the control of species of the genus *Spodoptera*, parasitoids have been considered the most important due to their efficiency and specificity in relation to the host. In this way, this study aimed to evaluate the interactions of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) and the endoparasitoid *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae) when treated with *Bt* soybean that synthesizes Cry1Ac protein. For this purpose, *S. eridania* larvae were exposed to the following treatments: (T1) non-parasitized and fed with conventional soybean; (T2) non-parasitized and fed with *Bt* soybean; (T3) parasitized and fed with conventional soybean; (T4) parasitized and fed with *Bt* soybean; and (T5) parasitized and fed with transgenic BRR soybean. The biology of the parasitoids descendant from larvae fed with *Bt* soybean was evaluated by observing the date of formation of the parasitoid pupa, date of emergence, sex, adult parasitoid longevity and survival. In the evaluation of the parasitoid preference for larvae fed with *Bt* soybean and non-*Bt* soybean, larvae received different exposure times to the parasitoid female, of 2h, 4h and 6h. In the treatments using *Dolichozele* sp. isolated or in conjunction with *Bt* soybean, mortality was significantly higher than the control treatment ($F = 63.5$; $gl = 4.14$; $P = 0.001$), with a mean larval mortality of 17.0 (T3), 20.2 (T4) and 17.5 (T5). Through the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), it was possible to detect the transfer of the Cry1Ac protein in *S. eridania* and *Dolichozele* sp.). The parasitoids emerged from larvae fed *Bt* soybean showed significant difference in the pupal phase ($F = 15.058$, $gl = 2$, $P = 0.001$) in the treatments T4 (16.6 days) and T5 (17.08 days) when compared as control T3 (18.2 days). The survival of the parasitoids that emerged from larvae fed with *Bt* soybean (T4) was lower (Kaplan-Meier, Log Rank, $X^2 = 8.22$, $gl = 2$, $p = 0.016$, Breslow, $X^2 = 9.58$, $gl = 2$, $p = 0.008$; Tarone-Ware, $X^2 = 9.94$, $gl = 2$, $p = 0.007$). There was a positive correlation between the exposure time and the parasitism rate of *Dolichozele* sp. in *S. eridania* (Spearman's Rho = 0.758, $p = 0.001$). The results of this study indicate that the parasitoid has a positive effect on the control of *S. eridania*, however its development and survival may be influenced by the presence of the *Bt* toxin. *Dolichozele* sp. presented the potential to act positively in strategies to manage the evolution of resistance to Cry proteins in *Bt* soybeans, as they may help suppress pest populations.

Keywords: *Bt* soybean. *Spodoptera eridania*. *Dolichozele* sp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	7
1.1 Parasitoides	7
1.2 <i>Spodoptera eridania</i>	9
1.3 Soja <i>Bt</i>	10
1.4 Justificativa	13
1.5 Objetivos	15
1.5.1 Objetivo Geral	15
1.5.2 Objetivos Específicos	15
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Cultivares de Soja	16
2.2 Levantamento de Parasitoides de <i>Spodoptera eridania</i> para Estabelecimento da Criação em Laboratório	17
2.3 Manutenção de <i>Dolichozele</i> sp. (Hymenoptera: Braconidae) em Laboratório	18
2.4 Manutenção de <i>Spodoptera eridania</i> (Lepidoptera: Noctuidae) em Laboratório	18
2.5 Bioensaios de Mortalidade de <i>S. eridania</i> Parasitadas por <i>Dolichozele</i> sp. e Alimentadas com Soja <i>Bt</i>	19
2.6 Detecção da Proteína Cry1Ac	20
2.7 Biologia de <i>Dolichozele</i> sp. Provenientes de Lagartas de <i>S. eridania</i> Alimentadas com Soja BRS (convencional), Soja <i>Bt</i> e Soja RR	21
2.8 Preferência de Fêmeas de <i>Dolichozele</i> sp. por <i>S. eridania</i> Alimentadas com Soja <i>Bt</i> e Soja Não <i>Bt</i>	21
2.9 Análise Estatística	22
3 RESULTADOS	23
3.1 Bioensaios de Mortalidade de <i>S. eridania</i> Parasitadas por <i>Dolichozele</i> sp. e Alimentadas com Soja <i>Bt</i>	23
3.2 Detecção da Proteína Cry1Ac	24
3.3 Biologia do parasitoide <i>Dolichozele</i> sp. oriundo de lagartas de <i>S. eridania</i> tratadas com Soja <i>Bt</i>	26
3.4 Preferência de Fêmeas de <i>Dolichozele</i> sp. por <i>S. eridania</i> Alimentadas com Soja <i>Bt</i> e Soja Não <i>Bt</i>	30
4 DISCUSSÃO	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE A - TRABALHOS PUBLICADOS NO PERÍODO	45

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Parasitoides

No MIP, a ação de inimigos naturais representa uma alternativa de redução populacional de insetos-praga, com vistas à otimização da produção agrícola e ao mesmo tempo à garantia de benefícios significativos, como a sustentabilidade do sistema de cultivo em longo prazo e a proteção do agroecossistema. (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Nesse sentido, os parasitoides e os predadores abarcam função importante na regulação de pragas. Estudos sobre o impacto direto e indireto de plantas *Bt* sobre esses insetos benéficos foram conduzidos (BORTOLOTTO et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2015; WOLFENBARGER et al., 2008). O impacto nos organismos não alvo resultantes da utilização da tecnologia *Bt* deve-se aos efeitos diretos - ou indiretos - da toxina pela redução na quantidade e na qualidade do hospedeiro (parasitoide) ou da presa (predador), cujos efeitos potenciais têm sido investigados. (DUTTON; ROMEIS; BIGLER, 2003; ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006).

Para avaliar de forma eficiente a ação das proteínas Cry no terceiro nível trófico (parasitoides), os hospedeiros, não podem ser suscetíveis à toxina Cry, para que os efeitos diretos possam ser eficientemente avaliados, e com isso, os indiretos, possivelmente descartados. A segurança de algumas proteínas *Bt* foi averiguada em estudos tritróficos realizados com herbívoros resistentes ou não suscetíveis a *Bt* que evitaram os problemas da qualidade da presa ou do hospedeiro. (CHEN et al., 2008; DESNEUX et al., 2010).

A manutenção de inimigos naturais - os quais ajudam a controlar as populações de pragas em áreas de culturas *Bt* - também configura uma possibilidade para retardar a evolução da resistência. (DESNEUX et al., 2010; GOULD; KENNEDY; JOHNSON, 1991; LUNDGREN et al., 2009). De mais a mais, uma meta-análise confirmou a segurança das proteínas de *Bt*, principalmente em comparação com inseticidas tradicionais. (NARANJO, 2009). Quando os efeitos negativos das proteínas Cry foram observados sobre inimigos naturais, aparentaram ser devido à má qualidade do hospedeiro, e não diretamente ao dano da proteína. (ROMEIS; McLEAN; SHELTON, 2013).

Os parasitoides são muito sensíveis às alterações dos seus hospedeiros após a ingestão das toxinas, posto que costumam completar o seu desenvolvimento em um único hospedeiro. Quando os hospedeiros suscetíveis são tratados com toxinas-*Bt*, a possibilidade de os parasitoides serem afetados é maior que a dos predadores, que são muitas vezes generalistas e

se alimentam de diferentes presas. (RAMIRES-ROMERO et al., 2007; VOJTECH; MEISSLE; POPPY, 2005). Receptores para proteína Cry1Ac são atualmente desconhecidos em Hymenoptera, portanto, essas toxinas não devem ter efeitos diretos ou subletais em parasitoides da ordem Hymenoptera. Alguns estudos anteriores desvendaram que os biopesticidas à base de *Bt*, em que as protoxinas são inativas, não tiveram efeito quando ingeridos por parasitoides adultos. (BLUMBERG et al., 1997; CHILCUTT; TABASHNIK, 1999). No entanto, alguns efeitos diretos e indiretos podem ser observados quando os parasitoides têm como hospedeiros insetos expostos a plantas *Bt* que expressam proteínas Cry ativadas. (LIU; SUN; ZHANG et al., 2005; ZHANG et al., 2006).

A maior parte das superfamílias de himenópteros parasitoides de importância econômica - exceto Chrysidoidea e Vespoidea - se reúne no grupo Parasitica. (FUJIHARA et al., 2011). A segunda maior família de Hymenoptera, com cerca de 14.890 espécies descritas e 40.000 espécies estimadas e distribuídas pelo mundo inteiro é representada pelos Braconidae. (SHARKEY, 1993; WHARTON; MARSH; SHARKEY, 1997). Comunidades desses insetos são de grande importância na estrutura dos ecossistemas; alguns estudos avaliaram a relação de predador-presa (BEGON; SAIT; THOMPSON, 1995) e modelos, onde provaram que os parasitoides possuem alto potencial de controle de insetos fitófagos, quando comparados com outros agentes de controle natural como: predadores e patógenos (HAWKINS; CORNELL; HOCHBERG, 1997).

A maioria dos braconídeos consiste em parasitoides primários de outros insetos e normalmente estão associados, apenas a um hospedeiro durante o seu desenvolvimento. Os mais comuns são larvas holometábolos (Lepidoptera, Coleoptera e Diptera). Os Braconidae de acordo com a estratégia de vida que apresentam, podem ser classificados em endoparasitoides (larvas dos parasitoides que se alimentam internamente do hospedeiro) e ectoparasitoides (que se desenvolvem externamente sobre o hospedeiro e se alimentam através de uma lesão tegumentar). Em duas outras categorias, a saber, cenobiontes (paralisam momentaneamente o hospedeiro, permitindo o seu desenvolvimento após a oviposição) e idiobiontes (paralisam permanentemente o hospedeiro, impedindo que este se desenvolva). A maioria das espécies é endoparasitoide cenobionte, ainda que um grande número seja ectoparasitoide idiobionte. Embora muitos braconídeos sejam estritamente solitários, o parasitismo gregário é comum, particularmente entre os Microgastrinae, Braconinae e Doryctinae. (WHARTON; MARSH; SHARKEY, 1997; YAMADA, 2001).

A biologia, o tamanho, a etiologia e a morfologia são altamente variáveis: a maioria tem coloração preta, castanha ou alaranjada; o tamanho do corpo pode variar de 1 mm a 30

mm de comprimento, excluindo-se o ovipositor, que pode ser igual ou mais longo que o comprimento do corpo em algumas espécies; são também insetos muito ativos e mostram grau variável de especificidade ao hospedeiro. (MATTHEWS, 1974). Além da importância ecológica dos Braconidae como agentes reguladores de diversos grupos de insetos fitófagos, servem também como indicadores da presença (ou da ausência) dessas populações. No aspecto econômico, a família inclui espécies utilizadas em programas de controle biológico em ecossistemas agrícolas tropicais e subtropicais. (GONZÁLEZ; RUIZ, 2000).

Nos resultados de Luz (2017), parasitoides representantes do gênero *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae: Macrocentrinae) foram associados ao parasitismo em *Anticarsia gemmatalis*. Já Silva, Cruz e Penteado-Dias (2014) registraram o gênero como parasitoide de *Spodoptera frugiperda*, o que possibilita presumir que o grupo possa agir no controle biológico de lagartas de diversas espécies.

1.2 *Spodoptera eridania*

Dentre os organismos não alvo que estão se tornando pragas com importância econômica para a soja *Bt*, ressalta-se a lagarta-da-vagem *Spodoptera eridania*, a qual se alimenta tanto das folhas da soja quanto das vagens. (SANTOS; NEVES; MENEGUIM, 2005). A espécie já é reconhecida como uma praga-chave em algumas áreas de produção de soja brasileira (BUENO et al., 2011; SANTOS; NEVES; MENEGUIM, 2005; SUJII et al., 2006), por apresentar alta tolerância à proteína Cry1Ac expressa na soja *Bt*. (BERNARDI et al., 2014).

No Brasil, *S. eridania* é citada atacando algodão, soja, amendoim, alface, tomate, couve, mamona, pimentão e aboboreira. (BERNARDI et al., 2014). Na cultura da soja, o potencial de desfolha de *S. eridania* é semelhante ao de *A. gemmatalis* e *C. includens*. (BUENO et al., 2011). Essa praga possui alto potencial reprodutivo com capacidade de ovipositar de 600 a 900 ovos. Em laboratório, *S. eridania* apresenta de 6 a 7 ínstaras larvais, quando alimentadas com folhas de soja e de algodão, respectivamente. (SANTOS; NEVES; MENEGUIM, 2005). A duração da fase larval varia de doze a dezoito dias, e dependendo da planta hospedeira, poderá haver variações no desenvolvimento. (LYNCH; PARIR; JOHNSON, 1983). A lagarta de *S. eridania*, pode medir 50 mm de comprimento, apresentando cor geral castanha a cinza escura, com três listras longitudinais sobre o dorso. O adulto é uma mariposa de cor cinza, com uma mancha preta no primeiro par de asas. (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; LYNCH; PARIR; JOHNSON, 1983).

No estudo promovido por Bernardi et al. (2012), as espécies de *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda* desvelaram baixa - ou nenhuma - suscetibilidade à soja *Bt* contendo a proteína Cry1Ac. Das três espécies, a *S. frugiperda* mostrou alguma suscetibilidade à Cry1Ac purificada, mas mesmo a concentração máxima testada não causou alta mortalidade. Logo, essas espécies de *Spodoptera* evidenciam maior tolerância à proteína Cry1Ac do que outras espécies de lepidópteros. (LUTTRELL; WANKNIGHTEN, 1999).

Segundo Oliveira et al. (2013), muitos produtores têm observado o crescimento populacional de *S. eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) em lavouras de milho *Bt*, sugerindo que o inseto possa estar encontrando condições favoráveis para o seu desenvolvimento nas lavouras *Bt*. As razões que podem favorecer o crescimento populacional de pragas não alvo abrangem o menor uso de inseticidas e a menor competição por alimento com outras pragas. (ZEILINGER; OLSON; ANDOW, 2011). Além disso, por ser polífaga, *S. eridania* (DELANEY, 2012; MICHEREFF-FILHO et al., 2008) pode desenvolver rápida adaptação a diferentes agroecossistemas e suas variações, ilustrando a importância da espécie para o MIP - soja. Inseticidas sintéticos são comumente utilizados no controle de infestações de lepidópteros da soja - muitas vezes, com sucesso limitado em pragas-alvo e não alvo, em razão das diferenças existentes na atividade intrínseca dos produtos, desenvolvendo assim tolerância ao inseticida e hábitos alimentares abrigados abaixo do dossel da planta. (MARTINS; TOMQUELSKI, 2015; OLIVEIRA; FERREIRA; ROMAN, 2010).

1.3 Soja *Bt*

A soja *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae: Phaseoleae) representa a leguminosa mais importante do mundo, com 90% de sua produção cultivada em países como Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e Índia. (CHANG; HUNGRIA, 2015). Nesse panorama, o Brasil figura como segundo maior produtor de soja, com a produção estimada em 100 milhões de toneladas na safra 2015-2016, depois dos Estados Unidos, que contabilizou quase 107 milhões de toneladas. (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), 2016).

O crescimento da cultura da soja no país esteve sempre associado aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias do setor produtivo. A mecanização e a criação de cultivares altamente produtivas adaptadas às diversas regiões, o desenvolvimento de tecnologias relacionadas aos manejos de solos, de adubação e de calagem, as pragas e as doenças e a identificação e a solução sintetizam os principais fatores responsáveis por perdas

no processo de colheita. Já os fatores promotores de avanço se evidenciam como responsáveis pela alta produção nacional - em especial, no ano agrícola de 2015/2016. (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB), 2016).

Dentre os principais fatores limitantes da produção de soja, elencam-se os insetos-praga, com destaque às lagartas desfolhadoras, que se alimentam tanto do limbo como das nervuras foliares, o que pode acarretar o desfolhamento total e ocorrer durante todo o desenvolvimento da planta, ocasionando assim perdas na produtividade de até 75% (BUENO et al., 2011). O sucesso na expansão da leguminosa no território brasileiro se deve também ao desenvolvimento de variedades resistentes a algumas pragas que afetam a cultura. A comercialização de plantas *Bt*- geneticamente modificadas com genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e aplicadas no manejo dos insetos - revolucionou a agricultura e se tornou uma ferramenta relevante para os programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). (ROMEIS; SHELTON; KENNEDY, 2008).

Em 2016, pelo oitavo ano consecutivo, o Brasil foi o propulsor do crescimento mundial, aumentando sua área cultivada com culturas biotecnológicas mais que qualquer outro país, com 49,1 milhões de hectares (ha), o que simbolizou aumento de 11%, em relação a 2015 (44,2 milhões de ha). Esse incremento de 4,9 milhões de hectares repercutiu em todo o mundo, tornando o Brasil o motor do crescimento em culturas biotecnológicas internacionalmente. Nesse sentido, a soja *Bt* (Intacta™: MON 87701 x MON 89788) potencializou tal crescimento, devido à economia de inseticidas, à tecnologia de plantio direto e ao aumento da produtividade. (JAMES, 2017).

As cultivares transformadas com genes *cry* (plantas *Bt*) apresentam diversas vantagens em relação aos formulados de *B. thuringiensis*, já que não necessitam de pulverização foliar para o controle dos insetos, pois a toxina é produzida pela própria planta e diminui a quantidade de inseticidas químicos liberados no ambiente. Além disso, ocasiona a redução dos gases emitidos pelo maquinário agrícola empregado na sua utilização e o custo de produção aplicado tanto na compra quanto na aplicação desses produtos químicos. (JAMES, 2017).

Os genes utilizados na transformação vegetal visando à resistência a insetos-praga provêm, em sua maioria, da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis*, a qual se caracteriza pela produção de inclusões paraesporais na célula-mãe durante sua esporulação, que contém delta-endotoxinas ativas contra diversas ordens de insetos. (HOFTE; WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 2002; VAN FRANKENHUYZEN, 2009). A relevância das proteínas Cry, sintetizadas pela bactéria *B. thuringiensis*, esta relacionada às suas propriedades tóxicas

produzidas após a ingestão a diversas ordens de insetos (CRICKMORE 2005). No caso de lepidópteros suscetíveis, depois de ingeridos os cristais são solubilizados no meio alcalino do intestino médio liberando as protoxinas, as quais são ativadas pelas enzimas digestivas, formando pequenos fragmentos protéicos que atravessam a membrana peritrófica ligando-se a receptores específicos das membranas apicais das células intestinais, causando destruição às microvilosidades, seguida de vacuolização do citoplasma e rompimento celular, fazendo com que o inseto pare de se alimentar, levando-o à morte (FIUZA 2009; KNAAK; FRANZ; FIUZA, 2010).

Em 2010, a soja *Bt* (MON 87701 x MON 89788) desenvolvida pela empresa Monsanto Ltda. foi liberada no Brasil. Essa variedade se caracteriza por possuir o gene *cryIAc* de *Bt*, que codifica a proteína Cry1Ac, assim como a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato síntase (EPSPS) de *Agrobacterium* sp., que confere tolerância ao herbicida glifosato. A soja *Bt* demonstra eficiência na regulação populacional dos principais lepidópteros-praga da cultura, como *Anticarsia gemmatalis* (HUBNER, 1818), *Crysoideixis includens* (WALKER, 1858), *Heliothis virescens* (FABRICIUS, 1781), *Crosidosema aporema* (WALSINGHAM, 1914) e *Rachiplusia nu* (GUENÉE, 1852) (BERNARDI, 2012).

Para então minimizar as consequências de insetos-praga na cultura da soja e regular o uso de inseticidas, o Manejo Integrado de Pragas da soja (MIP-soja) foi implementado, integrando o uso de várias estratégias e táticas de controle (CORRÊA-FERREIRA et al., 2010), como a utilização de plantas geneticamente modificadas (transgênicas) resistentes a pragas. Apesar das vantagens apuradas na utilização de plantas *Bt* resistentes a insetos, ainda se verificam preocupações sobre os possíveis efeitos associados a essa tecnologia. (Kouser; QAIM, 2011; NUNES, 2010). Além de conhecer a ação da soja *Bt* em organismos-alvo (BERNARDI et al., 2012; HOMRICH et al., 2008), também convém avaliar os seus efeitos sobre pragas não alvo e inimigos naturais, uma vez que esses insetos podem estar direta (ou indiretamente) expostos à toxina *Bt* por longos períodos. Ademais, a adoção da tecnologia *Bt* pode desencadear mudança do status de pragas por suprimir as populações das principais espécies-alvo e diminuir a utilização de inseticidas (CATARINO et al., 2015; CIVIDANES et al., 2017; REICHERT et al., 2017).

Por conseguinte, assim como acontece com outras culturas *Bt*, a principal barreira à utilização contínua de soja *Bt* envolve a evolução da resistência por pragas-alvo. A avaliação do risco de resistência das pragas-alvo e de organismos não alvo à soja *Bt* se revela, portanto,

de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). (CROFT; VAN DE BANN, 1988; GOULD, 1998; HEAD; GREENPLATE, 2012). Há vinte anos, desde que as culturas *Bt* foram comercializadas, a estratégia de refúgio contemplou a principal técnica usada para retardar a resistência das pragas. (CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015; TABASHNIK et al., 2013). Nessa estratégia, com a utilização de áreas de refúgios com plantas não *Bt*, permite-se a sobrevivência de pragas suscetíveis que podem se acasalar com pragas resistentes que emergem de plantas *Bt*. Através das comparações de padrões de resistência desenvolvida em alguns estudos realizados em laboratório, casa de vegetação e a campo, constatou-se então que os refúgios podem retardar a resistência. (JIN et al., 2015; ZHAO et al., 2005).

1.4 Justificativa

As plantas *Bt* denotam elevada eficiência no controle dos insetos-alvo. (AREAL; RIESGO, 2015; BLANCO et al., 2016; SINGH; DUBEY, 2015). Além disso, proporcionam benefícios econômicos aos produtores e diminuição significativa do uso de inseticidas (HUTCHISON et al., 2010; LU et al., 2012), auxiliando assim na conservação de inimigos naturais (NARANJO, 2009) e promovendo o controle biológico em áreas agrícolas. (LU et al., 2012). Contudo, alguns aspectos da tecnologia *Bt* se tornam motivo de preocupações que geram constantes debates entre profissionais da área, dentre as quais, o impacto sobre organismos não alvo, sendo eles inimigos naturais das pragas-alvo (parasitoides, predadores) e/ou pragas secundárias, que aumentam em frequência com a eliminação ou a redução do tamanho populacional da espécie-alvo.

Estudos que tratam dos impactos das toxinas *Bt* sobre os inimigos naturais das espécies-alvo explicitaram resultados controversos: alguns demonstraram a ausência de efeitos sobre os inimigos naturais, e outros indicaram a presença de efeitos negativos. (LIU et al., 2014; TIAN et al., 2015). As pragas secundárias, por não serem suscetíveis à toxina *Bt*, tornam-se uma ameaça à tecnologia *Bt*, como comprovaram alguns estudos que examinaram o impacto dessas espécies na cultura do algodão (LI et al., 2011; NARANJO, 2011) e do milho *Bt*. (MEINKE et al., 2009; VAN WYK et al., 2007). Até o momento, não foram obtidos resultados suficientes que avaliassem o impacto das plantas *Bt* sobre espécies não alvo, entretanto os resultados dessa interação mostraram-se fundamentais para o desenvolvimento e

a implementação de técnicas de MIP. (ANDOW; LOVEI; ARPAIA, 2009; CATARINO et al., 2015; GARCIA; ALTIERI, 2005; HO; ZHAO; XUE, 2009; KRISHNA; QAIM, 2012; SMALE; ZAMBRANO; CARTEL, 2006).

Os cultivares de soja *Bt* (Cry1Ac) foram comercializados pela primeira vez no Brasil, no Paraguai, na Argentina e no Uruguai em 2013 (BROOKES; BARFOOT, 2015; YANO et al., 2015), com eficiência no controle das principais pragas dessa cultura, como: *Anticarsia gemmatalis*, *Crysothrips includens* e *Heliothis virescens* (BERNARDI et al., 2012). No entanto, as linhagens de soja *Bt* disponíveis no mercado revelaram baixa eficiência no controle de espécies do gênero *Spodoptera* (BERNARDI et al., 2014; YU et al., 2013). Das pragas secundárias que causam danos significativos em áreas de soja *Bt* no Brasil, listam-se *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania*. (BUENO et al., 2011, BORTOLOTTI et al., 2014; MOSCARDI et al., 2012; TOMQUELSKI; MARUYAMA, 2009). A espécie *S. eridania* alimenta-se das folhas e das vagens da soja, o que a torna reconhecida como uma praga-chave em algumas áreas de produção de soja no Brasil com alta tolerância à proteína Cry1Ac em soja *Bt*. (BERNARDI et al., 2014; BUENO et al., 2011).

O conhecimento acerca das espécies e do fluxo de agentes naturais de controle biológico em áreas agrícolas é essencial para estabelecer programas de manejo integrado. Dentre os insetos de interesse para o controle biológico de *Spodoptera* spp., os parasitoides têm sido considerados os mais importantes devido à sua eficiência e à sua especificidade em relação ao hospedeiro. (SILVA; CRUZ.; PENTEADO-DIAS 2014). A subfamília Macrocentrinae Foerster (Hymenoptera: Braconidae) congloba cerca de 150 espécies descritas que podem ser solitárias ou gregárias - as últimas, poliembriônicas. A maioria dos membros dessa subfamília possui pernas longas e são endoparasitoides de lepidópteros das famílias: Gelechiidae, Noctuidae, Oecophoridae, Pyralidae, Tineidae, Tortricidae e Sesiidae. (ACHTERBERG, 1993).

Estudos preliminares identificaram a presença do endoparasitoide larval solitário *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae) em frequência elevada em larvas de *Spodoptera frugiperda* no Brasil. Os adultos do gênero *Dolichozele* sp. ovipositam em lagartas hospedeiras de 1º e 2º instar, cujas larvas alimentam-se principalmente da hemolinfa do hospedeiro, enquanto no último instar, matam o hospedeiro, alimentando-se de tecidos, emergindo do corpo da lagarta para formação da pupa. (SILVA; CRUZ.; PENTEADO-DIAS, 2014). As pesquisas atinentes aos aspectos biológicos dos inimigos naturais (parasitoides) em interações tritróficas com plantas geneticamente modificadas, como a soja *Bt*, permitem a obtenção de conhecimentos básicos para sua utilização em estratégias do MIP, de grande

relevância para a manutenção da eficiência da tecnologia *Bt*. A soja *Bt* (Cry1Ac), apresenta baixa eficiência no controle de espécies do gênero *Spodoptera*, a conservação de parasitoides do gênero *Dolichozele* sp. pode ser uma estratégia viável para substituir o controle químico e, ao mesmo tempo, se beneficiar da diminuição do uso de inseticidas associada às culturas *Bt*.

1.5 Objetivos

Delineiam-se a seguir os objetivos que nortearam a elaboração deste estudo.

1.5.1 Objetivo Geral

A presente pesquisa visou avaliar a interação tritrófica de soja *Bt* (Cry1Ac) *Spodoptera eridania* e seu inimigo natural, o parasitoide *Dolichozele* sp.

1.5.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos, elencam-se:

- a) avaliar a mortalidade de *S. eridania* parasitadas por *Dolichozele* sp.;
- b) detectar a presença da proteína Cry1Ac nos três níveis tróficos (soja *Bt*, *Spodoptera eridania* e *Dolichozele* sp.);
- c) analisar a duração dos estágios de vida e a proporção sexual de *Dolichozele* sp. desenvolvidos em lagartas de *S. eridania* alimentadas com soja *Bt*;
- d) avaliar a sobrevivência de *Dolichozele* sp. desenvolvidos em lagartas de *S. eridania* alimentadas com soja *Bt*;
- e) verificar se houve preferência de fêmeas de *Dolichozele* sp., em tempos de exposições diferentes, por *S. eridania* alimentadas com soja *Bt* e soja não *Bt*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Descreve-se na sequência a metodologia adotada para a construção do estudo.

2.1 Cultivares de Soja

Os ensaios foram executados no Laboratório de Entomologia do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) de Londrina/PR (como exhibe a Fotografia 1). Para tanto, utilizaram-se três genótipos distintos de soja, quais sejam: (1) cultivar não transgênica BRS 284; (2) uma linhagem BRR (cp4-epsps); e (3) cultivar BRS 1001 IPRO (cry1Ac e cp4-epsps). Os genótipos são derivados de cultivar BRS 284 (não transgênica), como o genitor majoritário para quatro ciclos de retrocruzamento, empregados para a incorporação de genes transgênicos. A linhagem de soja BRR contém o gene cp4-epsps, o que confere tolerância ao herbicida glifosato. A cultivar BRS 1001 IPRO (Bt RR), além do gene cp4-epsps, contém o gene *cry1Ac*, o que assegura tolerância às principais espécies de lagartas pragas da soja.). O gene exógeno *cry1Ac* é proveniente da bactéria *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD73, o qual confere resistência das plantas às principais lagartas da cultura da soja. O Cultivar de soja MON 87701- 2 foi produzido através da transferência do gene *cry1Ac* utilizando um gene promotor de controle *rbcS4* da espécie *Arabidopsis thaliana*. Este promotor, expressa as características do gene de interesse em todos tecidos da planta. A sequência proteica é 99% idêntica ao da proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis kurstaki*. A proteína Cry1Ac é expressa em folhas, pólen/anteras, sementes e vagens, exceto raízes. A concentração nas folhas pode atingir cerca de 450 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco (MONSANTO, 2003).

As sementes foram cultivadas em doze caixas de amianto (capacidade de 50 L), com solo cultivado há cerca de três anos. Em cada caixa, foram cultivadas duas sementes de cada um dos três genótipos em estudo, totalizando seis plantas por caixa. Considerando que cada caixa representa uma repetição, ao total, foram doze repetições avaliadas. Nos experimentos, a semeadura foi escalonada, em que foram semeadas quatro caixas no início de abril, quatro caixas no final de abril e as quatro restantes em maio. A coleta de folhas para ofertar às lagartas ocorreu a partir do estágio V7 de desenvolvimento da cultura. (FEHR; CAVINESS, 1977). O solo utilizado para o cultivo das plantas teve o mesmo nível de nutrientes em todos os tratamentos.

Fotografia 1 - Plantas de soja cultivadas em sala de vegetação na EMBRAPA-Soja



Fonte: Registrada pela autora.

2.2 Levantamento de Parasitoides de *Spodoptera eridania* para Estabelecimento da Criação em Laboratório

O levantamento de parasitoides foi efetuado na Estação Experimental da EMBRAPA Soja, em Londrina (Paraná), no ano agrícola de 2015/2016, em áreas de cultivo de soja. As lagartas coletadas foram levadas ao Laboratório de Entomologia, na EMBRAPA de Londrina. Em seguida, os insetos foram individualizados em frascos de polipropileno de 50 mL até a emergência dos adultos ou dos parasitoides, identificados com o auxílio do Dr^o. Adriano Hoshino especialista da ordem Hymenoptera do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR).

2.3 Manutenção de *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae) em Laboratório

Os parasitoides de *Dolichozele* sp. (que se observam na Fotografia 2) foram multiplicados a partir da exposição de trinta lagartas de *S. eridania* de 2º instar a um casal de parasitoides, em mangas de vidro (11 cm de altura e 7 cm de diâmetro), por aproximadamente vinte e quatro horas. Para a alimentação das lagartas, foram utilizadas porções de dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976), e para os parasitoides, solução de glicose a 10%. Após, as lagartas foram individualizadas em potes plástico de 50 mL, com dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) e avaliadas até a formação das crisálidas ou a obtenção dos parasitoides. Tanto as lagartas quanto os parasitoides foram mantidos em Câmara Incubadora tipo Biological Oxygen Demand (BOD), regulada a 25°C, por doze horas de fotofase e Umidade Relativa (UR) de aproximadamente 65%.

Fotografia 2 - *Dolichozele* sp.: (a) larva emergindo da lagarta (*S. eridania*), (b) larva e pupa, (c) adultos

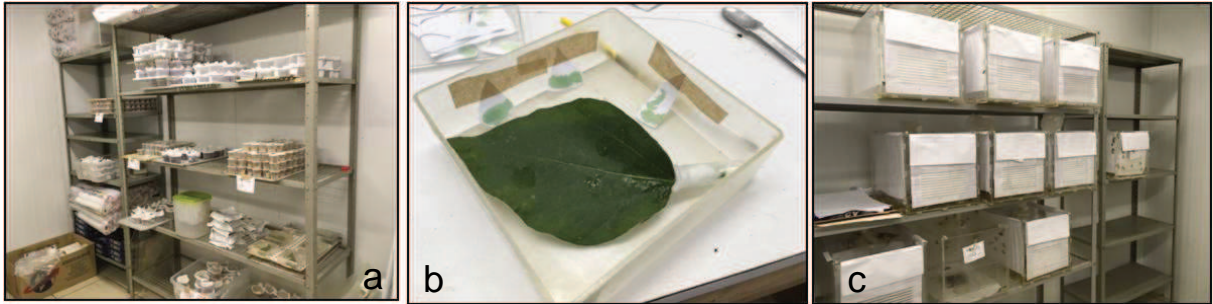


Fonte: Registrada pela autora.

2.4 Manutenção de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) em Laboratório

Lagartas de 2º a 3º instar de *S. eridania* empregadas neste estudo foram obtidas a partir de uma criação artificial permanente no Laboratório de criação de insetos da EMBRAPA Soja de Londrina/PR (como ilustra a Fotografia 3). As lagartas foram alimentadas com dieta artificial desenvolvida por Greene, Lepla e Dickerson (1976), e os adultos, com glicose a 10%, mantidos em câmara regulada a 25°C, em doze horas de fotofase e UR de aproximadamente 65 %.

Fotografia 3 - Criação de *Spodoptera eridania*: (a) lagartas isoladas, (b) posturas expostas aos cultivares dos respectivos tratamentos, (c) mariposas em gaiolas



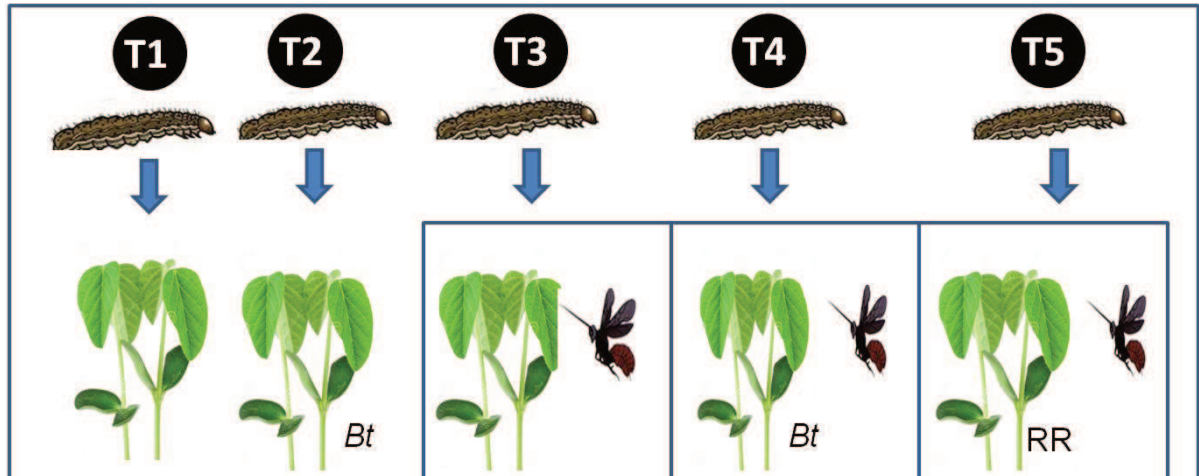
Fonte: Registrada pela autora.

2.5 Bioensaios de Mortalidade de *S. eridania* Parasitadas por *Dolichozele* sp. e Alimentadas com Soja *Bt*

Nesses ensaios, as lagartas eclodidas foram alimentadas com cultivares de soja, conforme se descreveu no item 2.1. As lagartas foram expostas aos seguintes tratamentos: (T1) não parasitadas e alimentadas com soja convencional (BRS 284); (T2) não parasitadas e alimentadas com soja *Bt* (BRS 1001 IPRO); (T3) parasitadas e alimentadas com soja convencional, (T4) parasitadas e alimentadas com soja *Bt*; e (T5) parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR (como se verifica na Figura 1). Para cada tratamento, foram utilizadas trinta lagartas de 2° a 3° instar, e realizadas quatro repetições, totalizando-se 120 lagartas avaliadas por tratamento. Na obtenção dos insetos para os tratamentos com parasitoides (T3), (T4) e (T5), lagartas de 2° instar foram expostas aos parasitoides em gaiolas de acrílico, nas quais permaneceram por vinte e quatro horas.

A exposição das lagartas à soja *Bt* e à soja RR ocorreu em potes plásticos (50 mL), com fundo coberto por papel de filtro umedecido e um disco de folha da planta. O mesmo procedimento foi adotado nos tratamentos (T1) e (T3), porém substituindo-se a soja *Bt* pela soja não transgênica (testemunha). As lagartas de todos os tratamentos permaneceram expostas às folhas de soja, com monitoramento regular da umidade do papel filtro. Diariamente executaram-se a troca das folhas e o registro do número de lagartas mortas, vivas e parasitadas. Já os potes plásticos com as lagartas foram mantidos em câmara incubadora BOD, regulada a 25°C, por 12h de fotofase e UR de aproximadamente 65%.

Figura 1 - Esquema representativo dos tratamentos nos ensaios de mortalidade.



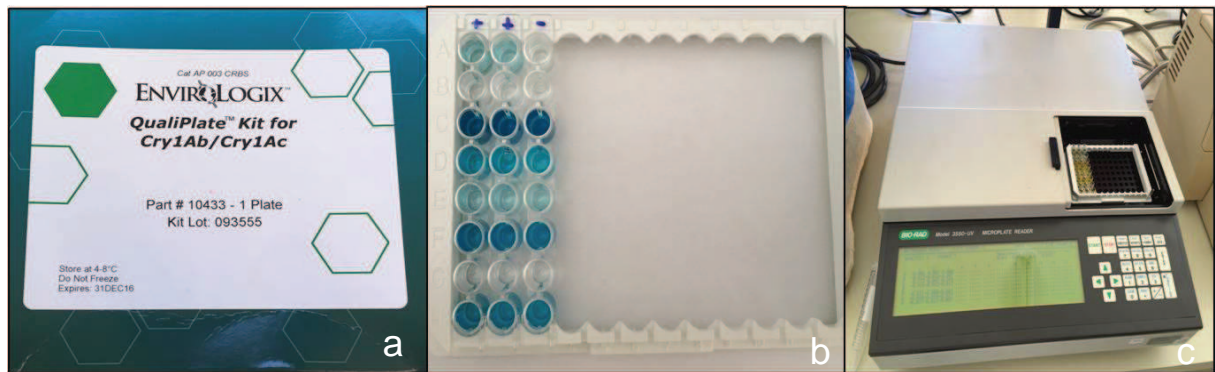
Elaborada pela autora.

2.6 Detecção da Proteína Cry1Ac

Para a detecção da proteína Cry1Ac nos três níveis tróficos (folhas de soja *Bt*- fezes de lagartas *S. eridania*- larva do parasitoide), o material biológico adotado no presente ensaio foi proveniente dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 - relatados no item anterior. As larvas do parasitoide *Dolichozele* sp. foram coletadas após emergência do corpo da lagartas, os materiais foram acondicionados a - 20° C até a detecção da proteína Cry1Ac. As amostras foram medidas por ensaios Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) do tipo duplo-sanduíche com enzima ligada da EnviroLogix Inc. (Portland, ME), através de placas PathoScreen®, já preparadas com anticorpos para *Bt*-Cry1Ac/Cry1Ab e conjugados à enzima peroxidase, fornecidos pelo kit (como se vê na Figura 2).

As amostras foram constituídas dos tratamentos e das respectivas concentrações - evidentes na Tabela 1 - os quais foram maceradas (1 g de peso fresco da planta- fezes da lagarta ou larva do parasitoide) em solução Phosphate Buffered Saline + Tween 20 (PBST) na diluição de 1:10 ou 1:5 (amostra g/tampão mL), O produto sobrenadante foi transferido para novos tubos e centrifugados a 5000 rpm. A detecção dos níveis de toxinas nas amostras foi determinada através das leituras de absorvência com espectrofotômetro a 450 nm.

Figura 2 - Detecção de proteína Cry1Ac: (a) teste EnviroLogix Inc. (b) placas PathoScreen® (c) espectrofotômetro (BIO-RAD/ 3550-UV)



Fonte: Registrada pela autora.

Tabela 1 - Tratamentos experimentais para detecção de proteína Cry1Ac

Tratamentos	Concentrações	Repetições
T1 (Controle positivo, proteína cry1Ac)	1:10	3
T2 (Controle negativo, tampão)	1:10	3
T3 (Soja convencional)	1:10	3
T4 (Soja <i>Bt</i>)	1:10	3
T5 (Fezes das lagartas alimentadas com soja <i>Bt</i>)	1:10	3
T6 (larvas provenientes de lagartas alimentadas com soja <i>Bt</i>)	1:10	3
T1 (larvas provenientes de lagartas alimentadas com soja convencional)	1:5	3
T2 (larvas provenientes de lagartas alimentadas com soja <i>Bt</i>)	1:5	3

Fonte: Elaborada pela autora.

2.7 Biologia de *Dolichozele* sp. Provenientes de Lagartas de *S. eridania* Alimentadas com Soja BRS (convencional), Soja *Bt* e Soja RR

Nesses experimentos, as lagartas de *S. eridania* foram expostas aos tratamentos (T3), (T4) e (T5), mencionados no item 2.5. Para cada tratamento, usaram-se 100 lagartas, garantindo assim a emergência do número suficiente de parasitoides. O procedimento se repetiu por três vezes, com a observação diária de cada lagarta. Também foram avaliadas as datas de formação do casulo do parasitoide, a data de emergência, o sexo, a longevidade do parasitoide adulto e a sobrevivência.

2.8 Preferência de Fêmeas de *Dolichozele* sp. por *S. eridania* Alimentadas com Soja *Bt* e Soja Não *Bt*

Antes da montagem do experimento, ovos de *S. eridania* foram expostos aos tratamentos T1 (lagartas foram alimentadas com cultivar não transgênica, BRS 284) e T2 (cultivar *Bt*, BRS 1001 IPRO). Três frascos de 2,5 L foram utilizados, cada um com dez lagartas

de cada tratamento, e uma única fêmea de *Dolichozele* sp. com cinco dias de idade. Em cada um dos frascos, as lagartas receberam tempos de exposição diferentes à fêmea do parasitoide - 2h, 4h e 6h. Foram realizadas nove repetições. As fêmeas de *Dolichozele* sp., após contato prévio de cinco dias com os machos, não ovipositaram até o momento do experimento. As lagartas de cada tratamento foram diferenciadas através da marcação com caneta (permanent Lumocolor marker, black, Staedtler, Germany), assinalando-se com um ponto de cor, logo atrás da cabeça da lagarta. Após, as lagartas foram individualizadas em potes plásticos de 50 mL, com dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) e avaliadas até a formação das crisálidas ou a obtenção dos parasitoides.

2.9 Análise Estatística

Recorreu-se ao programa estatístico SPSS 13.0 para Windows (SPSS, 1998) em todos os testes. Para a análise estatística, os dados foram transformados por $\log(x+10)$ para alcançar a distribuição normal. Os dados de mortalidades em cada tratamento e a avaliação da média de tempo do ciclo de vida dos parasitoides foram submetidos à análise de variância Anova *One-way*, seguido de *Tukey* a 5% de probabilidade. O efeito dos tratamentos sobre a proporção sexual foi avaliada pelo teste de Quiquadrado. A detecção de proteína Cry entre parasitoides provenientes de lagartas alimentadas com soja *Bt* e convencional na concentração de 1:5 foram comparadas pelo teste “t” de *Student* a 5% de probabilidade. Os dados obtidos na concentração de 1:10 foram submetidos à análise de variância, Anova, seguido de *Tukey*, a 5% de probabilidade. Os dados de preferência de fêmeas de *Dolichozele* sp. por *S. eridania* alimentadas com soja *Bt* e soja não *Bt* foram comparadas pelo teste “t” de *Student* a 5% de probabilidade. Para correlacionar a taxa de parasitismo com os diferentes tempos de exposição os dados, foram submetidos ao teste de Rho de Spearman. A análise da sobrevivência dos parasitoides foi conduzida utilizando-se o teste Kaplan-Meier e Breslow (Wilcoxon). Em todos os testes, os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

Redigem-se a seguir os resultados dos experimentos efetuados.

3.1 Bioensaios de Mortalidade de *S. eridania* Parasitadas por *Dolichozele* sp. e Alimentadas com Soja *Bt*

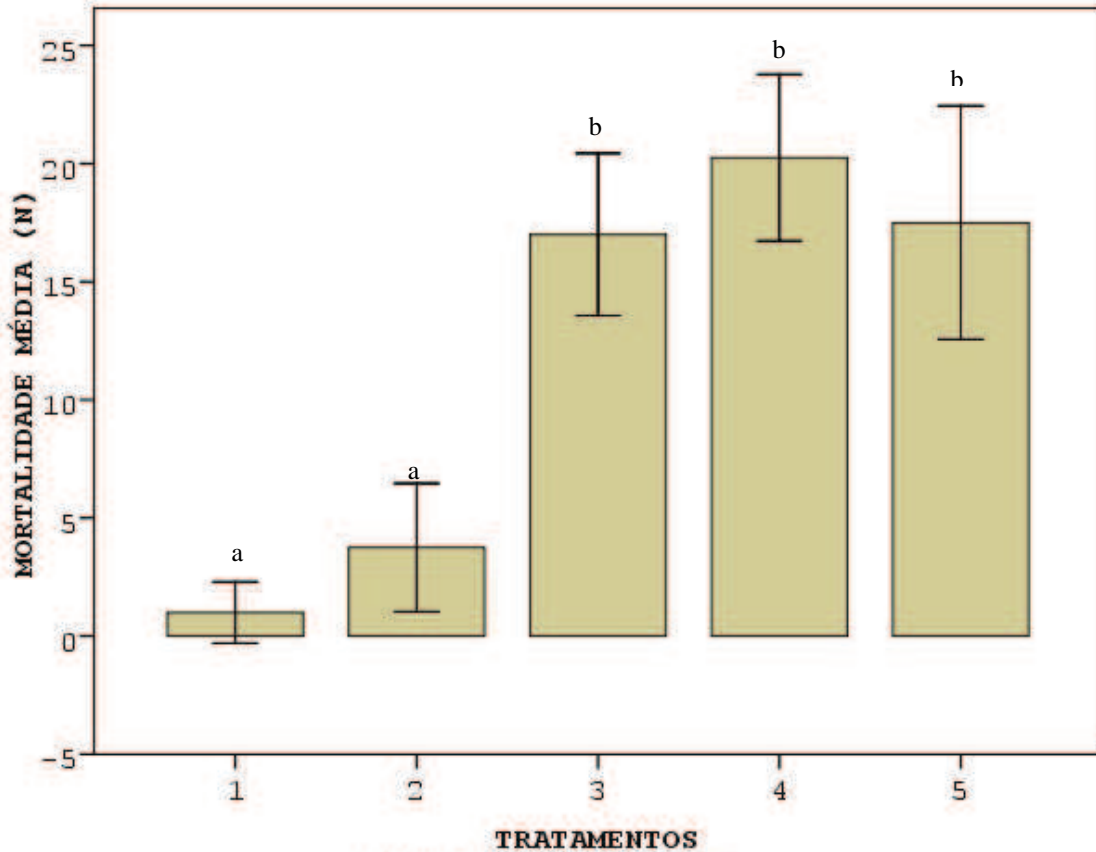
Os resultados obtidos nos bioensaios de mortalidade (como se pode conferir na Tabela 2) com lagartas de *S. eridania* expostas ao parasitismo e alimentadas com cultivares de soja BRS, *Bt* e RR (T3, T4 e T5) mostraram-se eficientes ($F= 63,5$; $gl= 4,14$; $P=0,001$), apresentando mortalidade média (%) de lagartas de 56,6 (T3), 67,3 (T4) e 58,3 (T5), o que evidencia alto potencial do parasitoide *Dolichozele* sp. no controle de *S. eridania*. Todavia, no tratamento T2, em que as lagartas foram alimentadas com soja *Bt* como único método de controle, não foi percebida diferença significativa em relação ao controle, o que sinaliza baixa eficiência da soja *Bt* no controle de *S. eridania*. As médias de mortalidade das lagartas, em cada tratamento, estão representadas no Gráfico 1.

Tabela 2 - Mortalidade de lagartas (n) de *Spodoptera eridania* submetidas ao parasitismo por *Dolichozele* sp. e expostas aos tratamentos: (T1) não parasitadas e alimentadas com soja convencional; (T2) não parasitadas e alimentadas com soja *Bt*, T3 (parasitadas e alimentadas com soja convencional), T4 (parasitadas e alimentadas com soja *Bt*) e T5 (parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR). (Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade)

Tratamentos	Indivíduos (n)	Média (%)±Erro-padrão
T1	120	3,0±0,0816a
T2	120	12,3±1,708a
T3	120	56,6±2,160b
T4	120	67,3±2,217b
T5	120	58,3±3,109b

Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 1 - Mortalidade de lagartas (n) de *Spodoptera eridania* submetidas ao parasitismo por *Dolichozele* sp. e expostas aos tratamentos: T1 (não parasitadas e alimentadas com soja convencional); T2 (não parasitadas e alimentadas com soja *Bt*), T3 (parasitadas e alimentadas com soja convencional), T4 (parasitadas e alimentadas com soja *Bt*) e T5 (parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR). (Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade)

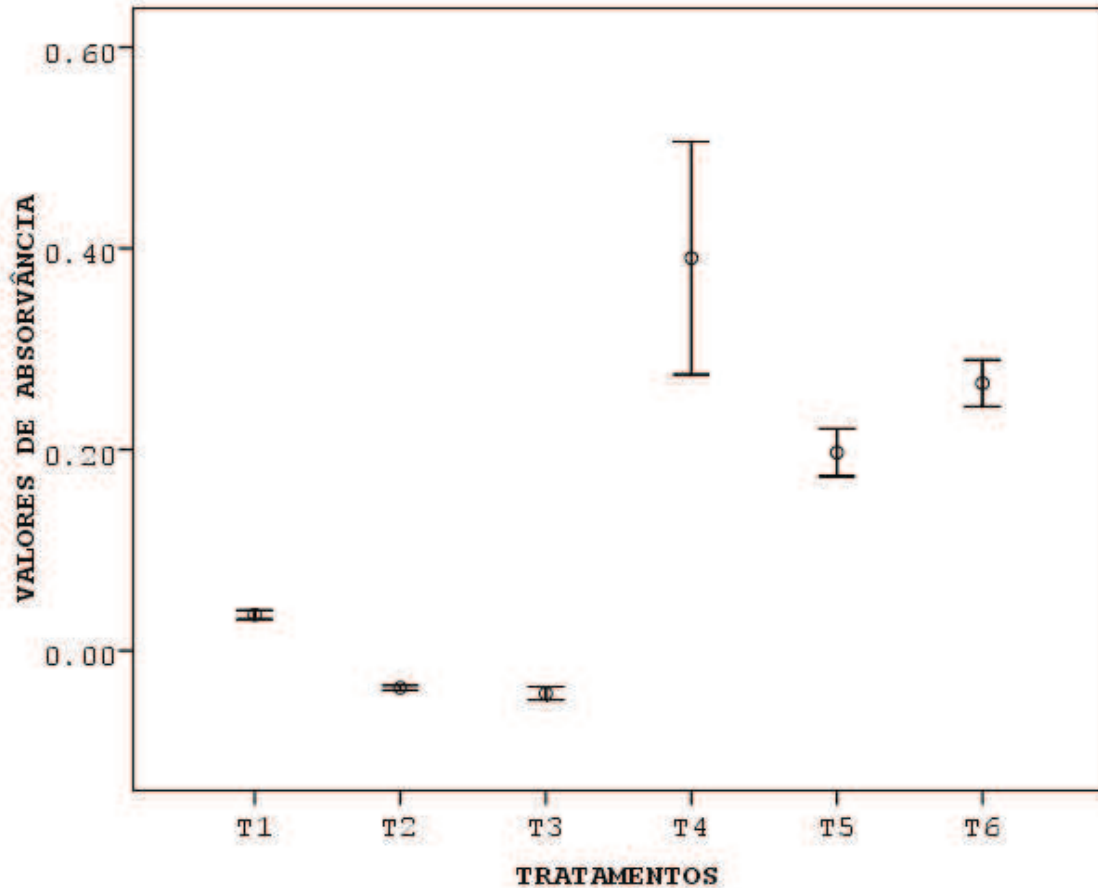


Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Detecção da Proteína Cry1Ac

A detecção da proteína Cry1Ac, nos três níveis tróficos, variou consideravelmente entre os tratamentos. A detecção de Cry1Ac em folhas de soja *Bt* (T4) foi significativamente maior ($F= 23,6$; $gl= 5$; $P=0,001$), seguida pelas larvas de parasitoides provenientes de *S. eridania* (T6) e pelas fezes de lagartas alimentadas com soja *Bt* (T5), em conformidade com os dados ilustrados no Gráfico 2. Esses resultados salientam que a proteína Cry1Ac presente na Soja *Bt* foi detectada no segundo e no terceiro nível trófico.

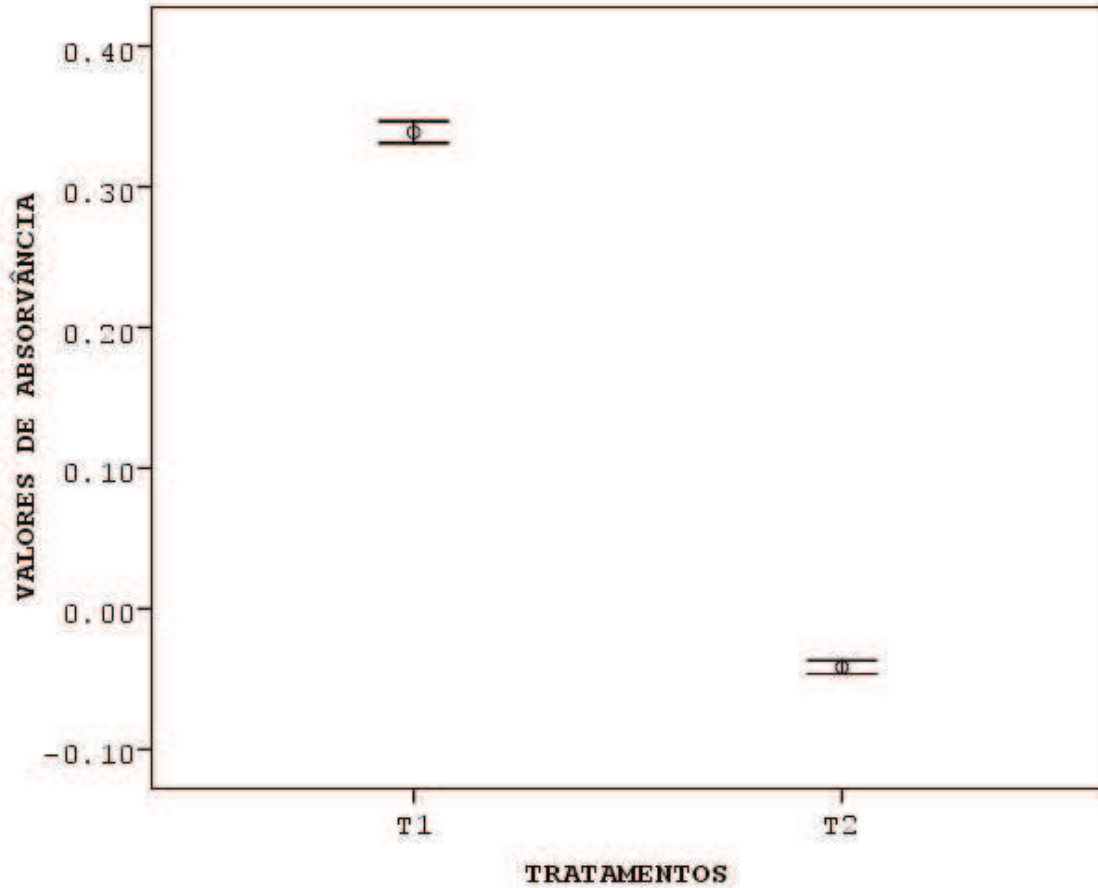
Gráfico 2 - Detecção de proteína Cry1Ac nos três níveis tróficos (folhas de soja *Bt* - fezes de *Spodoptera eridania* - larva parasitoide). T1 (Controle positivo, proteína Cry1Ac), T2 (Controle negativo, tampão), T3 (soja Convencional), T4 (soja *Bt*), T5 (fezes das lagartas alimentadas com soja *Bt*), T6 (parasitoides provenientes de lagartas alimentadas com *Bt*)



Fonte: Elaborada pela autora.

Adicionalmente, avaliaram-se as larvas dos parasitoides provenientes de lagartas de *S. eridania* alimentadas com soja *Bt* na diluição 1:5. Nesses insetos, foram detectadas altas concentrações de proteína Cry1Ac, quando comparadas ao controle (em consonância com o Gráfico 3) ($t= 180,04$; $gl= 4$; $P=0,001$).

Gráfico 3 - Detecção de proteína Cry1Ac em larvas dos parasitoides provenientes de lagartas de *Spodoptera eridania* expostas aos tratamentos: T1 (Parasitoides provenientes de lagartas alimentadas com soja *Bt*) e T2 (Parasitoides provenientes de lagartas alimentadas com soja convencional)



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Biologia do parasitoide *Dolichozele* sp. oriundo de lagartas de *S. eridania* tratadas com Soja *Bt*

Dados pertinentes à biologia de *Dolichozele* sp. foram mensurados a partir de parasitoides emergidos de lagartas expostas aos tratamentos: T3, T4 e T5. O período médio de duração de cada fase de desenvolvimento de *Dolichozele* sp. consta na Tabela 3.

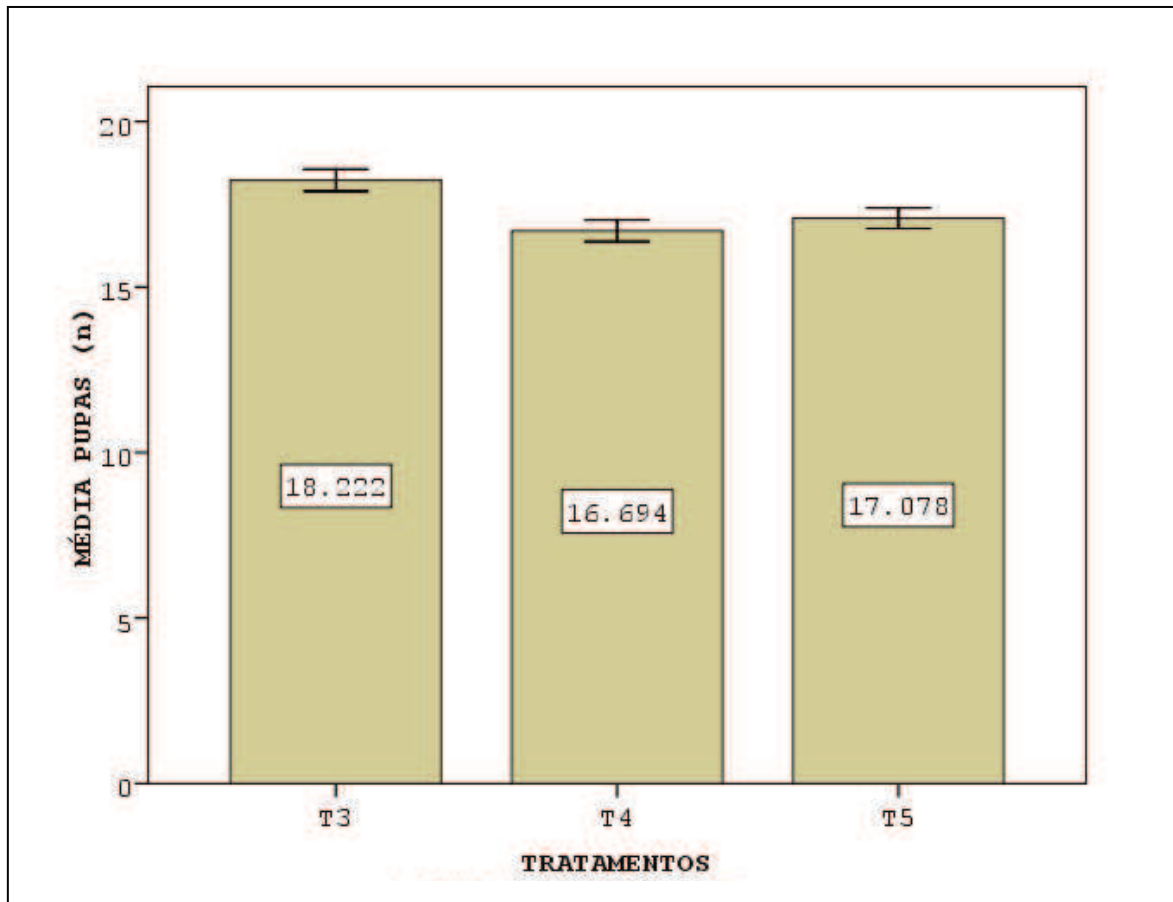
Tabela 3 - Duração média das fases de desenvolvimento (em dias) de *Dolichozele* sp. provenientes de lagartas de *Spodoptera eridania* expostas aos tratamentos: T3 (parasitadas e alimentadas com soja convencional), T4 (parasitadas e alimentadas com soja *Bt*) e T5 (parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR). (Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade)

	T3		T4		T5	
Fases de Desenvolvimento	Média (d)± Erro-padrão	Indivíduos (n)	Média (d)± Erro-padrão	Indivíduos (n)	Média (d)± Erro-padrão	Indivíduos (n)
Ovo-larva	17.81±2.5a	80	18.61±1.6a	87	18.03±2.4a	96
Pupa	18.22±1.1a	54	16.69±1.1b	49	17.08±1.1b	51
Longevidade	16.23±2.5a	48	16.30±1.6a	40	16.11±3.0a	44
Tempo total	39.8±1.5a	80	35.5±1.5a	87	34.4±1.4a	96

Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação dos diferentes tratamentos sobre a duração dos estágios de desenvolvimento apurou diferenças significativas apenas para o estágio de pupa ($F= 15,058$; $gl=2$; $P=0,001$). Para larvas e adultos, as diferenças não foram significativas, variando entre 17,8 e 18,6 para o período ovo-larva; 16,1 e 16,3 para longevidade; e 34,4 e 39,8 para o tempo total de vida.

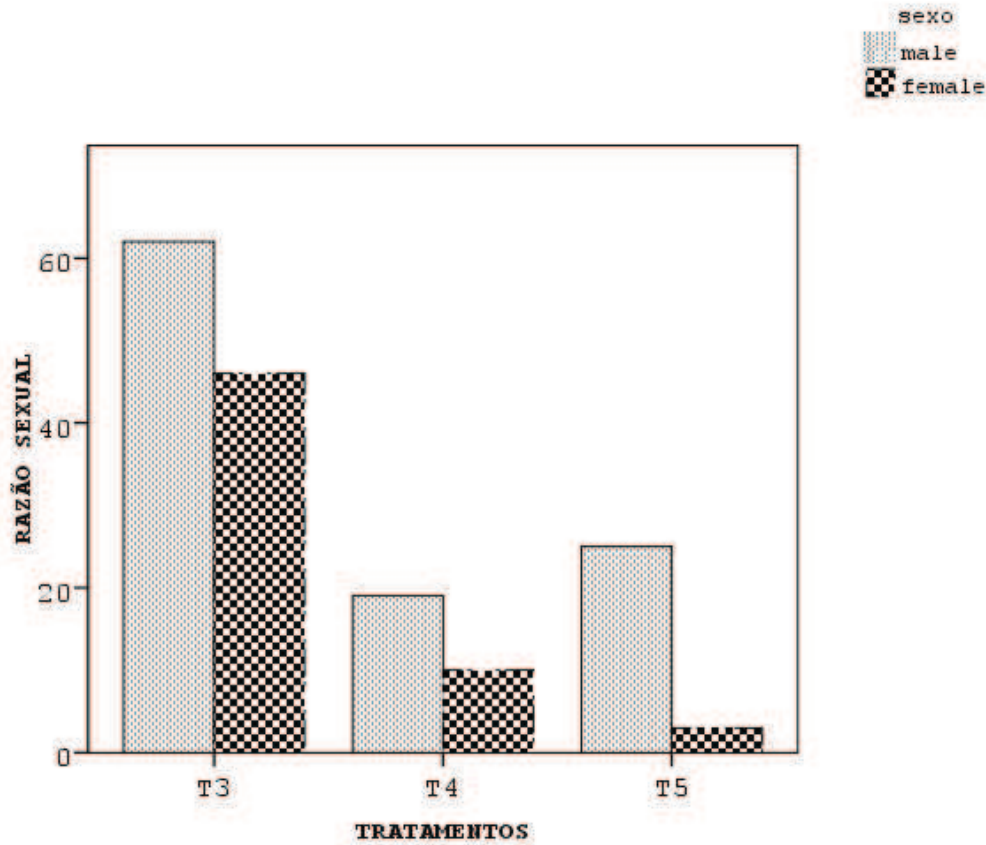
Gráfico 4 - Distribuição média de indivíduos de *Dolichozele* sp, entre os diferentes períodos da fase de pupa, provenientes de lagartas de *Spodoptera eridania* expostas aos tratamentos: T3 (parasitadas e alimentadas com soja convencional), T4 (parasitadas e alimentadas com soja *Bt*) e T5 (parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR).



Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação da proporção sexual (em concordância com a Gráfico 5) apontou diferenças significativas na proporção de machos (♂) e fêmeas (♀) nos descendentes de lagartas expostas ao T5 (parasitadas e alimentadas com soja BRR, 25 ♂ e 3 ♀), quando comparada aos demais tratamentos ($X^2= 4,793$, $gl=1$, $P=0,007$), T3 (parasitadas e alimentadas com soja convencional: 62 ♂ e 46 ♀) e T4 parasitadas e alimentadas com soja *Bt* (19 ♂ e 10 ♀).

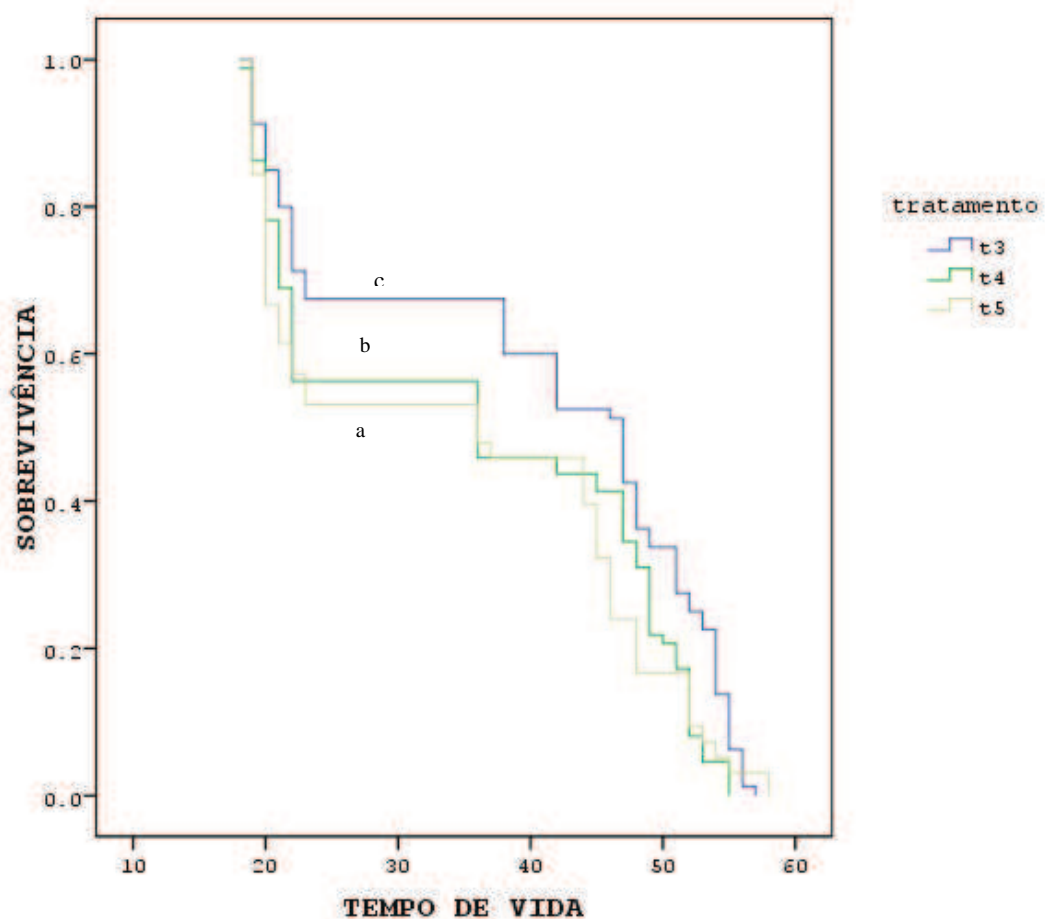
Gráfico 5 - Razão sexual de parasitoides emergidos de lagartas de *Spodoptera eridania* expostas aos tratamentos: T3 (parasitadas e alimentadas com soja convencional), T4 (parasitadas e alimentadas com soja *Bt*) e T5 (parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR)



Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação à sobrevivência dos parasitoides emergidos de lagartas durante todos os estágios de vida (como se nota no Gráfico 6), as curvas de sobrevivência mostraram-se diferentes entre os tratamentos (T3, T4 e T5): os parasitoides emergidos de lagartas alimentadas com soja BRR (T5) apresentaram maior sobrevivência, e os parasitoides que emergiram de lagartas alimentadas com soja *Bt* (T4), menor (Gráfico 1, Kaplan–Meier, Log Rank, $X^2=8,22$, $gl=2$, $P=0,016$; Breslow, $X^2=9,58$, $gl=2$, $P=0,008$; Tarone-Ware, $X^2=9,94$, $gl=2$, $P=0,007$). Esse resultado salienta a influência negativa da proteína Cry1Ac expressa pela soja *Bt* na sobrevivência do parasitoide *Dolichozele* sp.

Gráfico 6 - Sobrevivência de parasitoides *Dolichozele* sp. emergidos de lagartas de *Spodoptera eridania* expostas aos tratamentos: T3 (parasitadas e alimentadas com soja convencional), T4 (parasitadas e alimentadas com soja *Bt*) e T5 (parasitadas e alimentadas com soja transgênica BRR), submetidos ao teste de Kaplan-Meier (letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade)

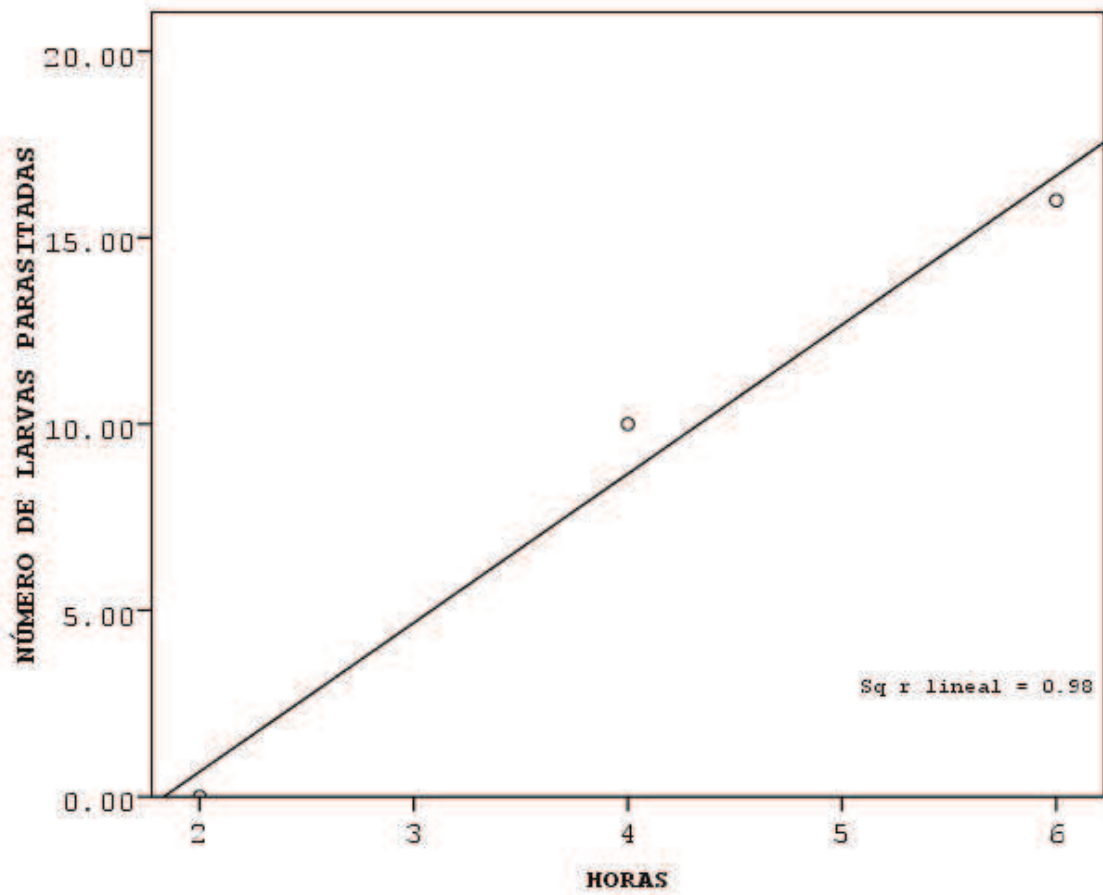


Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Preferência de Fêmeas de *Dolichozele* sp. por *S. eridania* Alimentadas com Soja *Bt* e Soja Não *Bt*

A avaliação dos resultados obtidos no presente estudo não explicitou diferença significativa entre a taxa de parasitismo de lagartas alimentadas com soja *Bt* e convencional ($F=0,031$; $P=0,864$). No que tange aos diferentes tempos de exposição, observou-se correlação positiva entre o tempo e a taxa de parasitismo de *Dolichozele* sp. em *S. eridania* alimentadas com soja convencional (Rho de Spearman= $0,758$, $P=0,001$), cujos dados se visualizam no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Numero de parasitismo de *Dolichozele* sp. em lagartas de *Spodoptera eridania* nos diferentes tempos de exposição alimentadas com soja *Bt* e soja convencional.



Fonte: Elaborada pela autora.

4 DISCUSSÃO

As interações entre plantas *Bt*-hospedeiro-parasitoide são importantes para examinar a eficiência dos inimigos naturais no controle de insetos-pragas. A relação entre soja *Bt* e o controle biológico configura uma associação relevante para o desenvolvimento de técnicas eficazes para o MIP e MIR. (BORTOLOTTO et al., 2014; LIU et al., 2014; ROMEIS; SHELTON; KENNEDY, 2008;)

No presente estudo, não houve diferença significativa entre as mortalidades de *S. eridania* alimentadas com soja *Bt*, quando comparadas às lagartas alimentadas com soja convencional. A baixa suscetibilidade de *S. eridania* à proteína Cry1Ac foi confirmada pelos resultados semelhantes na taxa de mortalidade das lagartas alimentadas com soja *Bt* e não *Bt*, além da menor influência observada da proteína nas características biológicas da praga, durante os estágios larvais e adultos. (BORTOLOTTO et al., 2014). A tolerância de lagartas do gênero *Spodoptera* spp. à Cry1Ac foi relatada anteriormente (ADAMCZYK et al., 2008; BERNARDI et al., 2014; BORTOLOTTO et al., 2014; GREENBERG; LI; LIU, 2010; LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; SANTOS et al., 2009) e pode estar relacionada à inativação das proteínas inseticidas pelas proteases produzidas por esses insetos. (MIRANDA; ZAMUDIO; BRAVO, 2001; RAHMAN et al., 2012).

Os tratamentos em que as lagartas foram expostas ao parasitismo por *Dolichozele* sp. (T3, T4 e T5) mostraram-se eficientes quando comparados ao controle, indicando alto potencial do endoparasitoide *Dolichozele* sp. no controle de *S. eridania*. No estudo realizado por Chen et al. (2008) as plantas *Bt* não afetaram negativamente o índice de parasitismo do parasitoide *Diadegma insulare*, enquanto alguns inseticidas formulados reduziram significativamente. Silva, Cruz e Penteado-Dias (2014), identificaram, pela primeira vez, a ocorrência da espécie *Dolichozele koebelei* Viereck, 1911 (Hymenoptera: Braconidae) em lagartas de *S. frugiperda* nas lavouras de milho orgânico e convencional. Souza, em 2015, em um estudo da diversidade de himenópteros parasitoides em agroecossistemas, relatou maior abundância do gênero *Dolichozele*. (SOUZA, 2015).

Através dos ensaios imunoenzimáticos para a detecção proteica realizada neste estudo, foi possível identificar a toxina *Bt* nos diferentes níveis tróficos, detectando a proteína Cry1Ac nas folhas de soja *Bt*, nas fezes de lagartas (*S. eridania*) alimentadas com soja *Bt* e nas larvas do parasitoide *Dolichozele* spp. emergidas de lagartas expostas à soja *Bt*, em que todos os tratamentos diferiram significativamente do controle. Assim, os efeitos diretos da soja *Bt* nos parasitoides não podem ser excluídos, embora sejam pouco prováveis, visto que as

proteínas Cry se ligam a receptores específicos no intestino de insetos-alvo e Cry1Ac demonstra ser específica a lepidópteros e a alguns coleópteros. (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; VOJTECH; MEISSLE; POPPY, 2005).

No estudo de Vojtech, Meissle e Poppy (2005), foi quantificada a proteína Cry1Ab em folhas de milho *Bt* (1,597 µg / g de peso fresco do tecido vegetal), e em lagartas *Spodoptera littoralis* (0,595 e 0,645 µg de toxina Cry1Ab / g de peso corporal fresco), porém em pupas de *Cotesia marginiventris* foram detectados apenas vestígios de Cry1Ab. Já nos parasitoides adultos, não foi detectada a proteína. Na análise de Sanders et al. (2007), aproximadamente 40% da concentração de Cry1Ab de plantas de milho *Bt* foi relatada em lagartas de *S. frugiperda* de 4º e 6º instar. Nas pupas do parasitoide *Campoletis sonorensis*, observaram-se aproximadamente 6% da quantidade de toxina encontrada no milho *Bt*, o que representou 16% da toxina localizada em *S. frugiperda*. Em adultos de *C. sonorensis*, a concentração residual foi zero ou abaixo do limite de detecção nos ensaios imunoenzimáticos realizados. No presente estudo, a detecção de proteína nas larvas de *Dolichozele* spp. pôde ser explicada pela contaminação da larva pela matéria fecal do hospedeiro. (QUICKE, 1997).

As fases de desenvolvimento, de ovo-larva e de longevidade do parasitoide *Dolichozele* spp emergidos de seu hospedeiro exposto aos tratamentos T3, T4 e T5 não diferiram entre si. O período de pupa em que lagartas foram alimentadas com soja *Bt* (T4) e soja RR (T5) foi significativamente mais curto, quando comparadas com o controle (T3). A detecção da proteína e a alteração no ciclo de vida em parasitoides desenvolvidos em hospedeiros alimentados por plantas *Bt* dependem da biologia do parasitoide. Parasitoides do gênero *Dolichozele* precisam de um período de dezessete a dezenove dias (ovo-larva) para desenvolver-se dentro da lagarta, enquanto o tempo larval de *Spodoptera eridania* varia entre vinte e um a vinte e três dias (BORTOLOTTI et al., 2014), portanto, qualquer alteração no ciclo de vida do hospedeiro pode afetar indiretamente o parasitoide, impossibilitando seu desenvolvimento. Em contraste com *Cotesia marginiventris*, as larvas do parasitoide do gênero *Dolichozele* - assim como *Campoletis sonorensis* (Carlson) - consomem todo o corpo do hospedeiro. (WILSON; RIDGWAY, 1975). Por conseguinte, podem ser mais afetados por alterações tanto da qualidade como da quantidade de nutrientes na larva hospedeira, quando comparados a parasitoides que se alimentam apenas de uma parte do corpo do hospedeiro, como *C. marginiventris*.

No estudo promovido por Liu, Sun e Zhang (2005), no qual foram avaliados os aspectos biológicos do parasitoide *Campoletis chlorideae* emergidos de *Helicoverpa armigera* alimentadas com algodão *Bt* (Cry1Ac), não foram observadas diferenças no período

de pupa quando comparadas ao controle. Entretanto, o período de ovo-larva foi significativamente mais longo. Zhang et al. (2006) repararam que a duração do período de pupa do parasitoide *C. chlorideae* emergidos *H. armigera* expostas ao tratamento com *Bt* (Cry1Ac) foi significativamente menor, quando comparada ao controle.

No presente trabalho, essa diferença não atestou ser consequência do efeito da proteína Cry1Ac presente na soja *Bt*, tendo em vista que no tratamento em que as lagartas foram alimentadas com soja RR também foi observado leve diminuição no período de pupa. Na frequência de machos e de fêmeas avaliados, os resultados revelaram que a proporção sexual de parasitoides emergidos das lagartas expostas ao T5 (parasitadas e alimentadas com soja BRR) diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (T3 e T4). Sanders et al. (2007), também não constataram diferença significativa na razão sexual quando avaliaram o parasitoide *Campoletis sonorensis* emergido de *Spodoptera frugiperda* alimentada com milho *Bt* e convencional. Essa alteração na razão sexual de parasitoides emergidos de lagartas expostas à soja BRR pode ser explicada por estudos, os quais avaliaram que linhagens transgênicas em geral possuem altas concentrações de aminoácidos, quando comparadas com suas linhagens isogênicas - especialmente para os aminoácidos essenciais, que estão todos positivamente ligados às variedades transgênicas, com exceção de leucina/isoleucina. (FARIA et al., 2007).

De acordo com o que confirmam Arruda et al. (2013), modificações genéticas em plantas resistentes ao glifosato alteram o metabolismo de toda a planta. De fato, há evidências de que o metabolismo do teor de lignina nas raízes de plantas de soja transgênicas seja diferente em comparação com a linha isogênica. (ZONETTI et al., 2012). As alterações potenciais nos metabólitos primários e secundários em plantas resistentes ao glifosato que mediam as interações planta-inseto, ainda devem ser mais estudadas.

Os resultados deste estudo desvelaram ainda que os parasitoides emergidos de lagartas alimentadas com soja BRR (T5) apresentaram maior sobrevivência, ao contrário dos que emergiram de lagartas alimentadas com soja *Bt* (T4). Esse resultado se alinha ao encontrado por Dhillon e Sharma 2010, que viram a sobrevivência reduzida do endoparasitoide *Campoletis chlorideae* emergidos de *Helicoverpa armigera* alimentadas com grão-de-bico *Bt*. No estudo conduzido por Ramires-Romero et al. (2007), os índices de parasitismo, o tempo de desenvolvimento, o tamanho e a fecundidade de adultos foram significativamente afetados em *Cotesia marginiventris* desenvolvidos em *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho *Bt*, embora outros parâmetros, como a mortalidade de casulo-adulto e razão sexual, não tenham sido afetados. O teste de preferência especificou não haver qualquer influência da soja

Bt e convencional na taxa de parasitismo por *Dolichozele* sp. em lagartas de *S. eridania*. Esses resultados corroboram com os achados de Sanders et al. (2007), que não anunciaram diferença significativa na avaliação de preferência do parasitoide *Campoletis sonorensis* por lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com Milho *Bt* (Cry1Ac) e milho convencional.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A evolução da resistência de insetos-pragas a plantas *Bt* continua como preocupação constante. Em contrapartida, os resultados obtidos neste estudo registraram que o controle de lagartas de *S. eridania* por *Dolichozele* sp. se mostrou eficiente, quando comparado a lagartas não submetidas ao parasitismo, o que pressupõe a importância do papel deste parasitoide no controle de lagartas *S. eridania*, que mesmo alimentando-se de soja *Bt*, pode ajudar retardar a evolução da resistência à soja *Bt*. (BATES et al., 2005). Com o objetivo de eliminar qualquer efeito indireto no parasitoide, devido à qualidade do hospedeiro, escolheu-se trabalhar com a *Spodoptera eridania* resistente ou não suscetível à soja *Bt*. Neste estudo, foram utilizadas folhas de soja *Bt* em vez de incorporar a toxina em dietas artificiais, e as larvas foram expostas continuamente à proteína Cry1Ac, e não apenas por algumas horas ou dias. Conseqüentemente, esses experimentos viabilizaram um nível de exposição muito semelhante ao percebido nos agroecossistemas, o que é essencial para a avaliação mais acurada dos riscos. (POPPY, 2004). Em suma, os parasitoides provenientes de lagartas alimentadas de soja *Bt* apresentaram sobrevivência e período de pupa reduzidos, quando comparados ao controle. Esse possível efeito negativo da soja *Bt* no parasitoide ainda é menor, quando comparado às alterações nocivas sabidamente causadas pelos inseticidas químicos. Ademais, para a avaliação adequada dos riscos e dos benefícios das alternativas de manejo de pragas, sugere-se que as comparações aos inseticidas formulados de uso geral sejam incluídas, em futuras avaliações.

REFERÊNCIAS

- ACHTERBERG, C. van. Revision of the subfamily Macrocentrinae Foerster (Hymenoptera: Braconidae) from the Palearctic region. *Zool. Verh.*, [S.l.], n. 286, p. 1–110, 1993.
- ADAMCZYK, J. J. et al. Evaluations of Bollgard® Bollgard II® and Widestrike® technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla. Entomol.*, [S.l.], 91, p. 531–536, 2008.
- ANDOW, D. A.; LOVEI, G. L.; ARPAIA, S. Cry toxins and proteinase inhibitors in transgenic plants do have non-zero effects on natural enemies in the laboratory: rebuttal to Shelton et al. *Environ. Entomol.*, [S.l.], n. 38, p. 1528–1532, 2009.
- AREAL, F. J.; RIESGO, L. Probability functions to build composite indicators: a methodology to measure environmental impacts of genetically modified crops. *Ecol. Indic.* [S.l.], n. 52, p. 498–516, 2015.
- ARRUDA, M. A. Z. et al. Comparative studies involving transgenic and non-transgenic soybean: what is going on? In: BOARD, J. E. (Ed.). *A comprehensive survey of international soybean research: genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships*. Croatia: INTECH, 2013. cap. 27. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40087.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2015.
- BATES, S. L. et al. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nat. Biotechnol.*, [S.l.], n. 23, p. 57-62, 2005.
- BEGON, M., S.M. SAIT Y D.J. Thompson. Persistence of a parasitoid-host system: refuges and generation cycles? *Proceedings of the Royal Society of London*, n. 260, p. 131-137, 1995.
- BERNARDI, O. et al. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Manag. Sci.*, [S.l.], n. 68, p. 1083-1091, 2012.
- BERNARDI, O. et al. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. *Crop Prot.*, [S.l.], n. 58, p. 33-40, 2014.
- BLANCO, C. A. et al. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. *Curr. Opin. Insect Sci.*, [S.l.], n. 15, p. 131-138, 2016.
- BLUMBERG, D. et al. Interactions among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Micropilis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, [S.l.], n. 90, p. 1181–1186, 1997.
- BORTOLOTTO, O. C., et al. Development and reproduction of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) and its egg parasitoid *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) on the genetically modified soybean (Bt) MON 87701× MON 89788. *Bulletin of entomological research*, [S.l.], n. 104.06, p. 724-730, 2014.

- BROOKES, G.; BARFOOT, P. *GM Crops: global socio-economic and environmental impacts 1996–2013*. Dorchester: PG Economics, 2015. Disponível em: <<http://www.appgag.science.org.uk/linkedfiles/GMcrops-globalimpactstudyfinalMay2015.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- BUENO, R. C. et al. Lepidoptean larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Manag. Sci.*, [S.l.], n. 67, p. 170-174, 2011.
- CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic *Bt* crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnol.*, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 161–168, 2015.
- CATARINO, R. et al. The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. *Plant Biotechnol. J.*, [S.l.], n. 13, p. 601-612, 2015.
- CHANG, W. S., H. I. L.; HUNGRIA, M. Soybean production in the Americas. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). *Principles of plant-microbe interactions*. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 393–400.
- CHEN, M. et al. A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *PLoS ONE*, [S.l.], v. 3, n. 5, p. 2284, 2008.
- CHILCUTT, C. F.; TABASHNIK, B. E. Effects of *Bacillus thuringiensis* on adults of *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the *Diamondback Moth*, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Biocontrol Sci. Technol.*, [S.l.], n. 9, p. 435–440, 1999.
- CIVIDANES, F. J. et al. Edge effects on carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) between forest fragments and agricultural fields in south-east Brazil. *Austral Entomology*, [S.l.], Jan. 2017.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). *Acompanhamento da safra Brasileira*. Porto Alegre, 04 ago. 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/user/Documents/Documents/doutorado/relat%C3%B3rios/16_08_09_12_08_19_boletim_graos_agosto_2016.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2016.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S. et al. Práticas de manejo de pragas utilizadas na soja e seu impacto sobre a cultura. *Soja. Circ. Técnica*, Londrina, n.78, jul. 2010.
- CRICKMORE N. 2006. Beyond the spore--past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *Journal of applied microbiology*, 101(3): 616–9.
- CROFT, B. A.; VAN DE BANN, H. E. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Exp. Appl. Acarol.*, [S.l.], v.4, p. 277-300, 1988.
- DELANEY, K. J. Nerium oleander indirect leaf photosynthesis and light harvesting reductions after clipping injury or *Spodoptera eridania* herbivory: high sensitivity to injury. *Plant Science*, [S.l.], v. 185–186, p. 218–226, 2012.

- DESNEUX, N. et al. Attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* to host (*Spodoptera frugiperda*) frass is affected by transgenic maize. *Ecotoxicology*, [S.l.], n. 19, p. 1183–1192, 2010.
- DHILLON, M. K.; SHARMA, H. C. Chickpea-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* on *Helicoverpa armigera* and its larval parasitoid, *Camponotus chlorideae*. *J. Appl. Entomol.*, [S.l.], n. 134, p. 682-693, 2010.
- DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. *Biocontrol*, [S.l.], n. 48, p. 611–636, 2003.
- FARIA, C.A. et al. High susceptibility of Bt maize to Aphids enhances the performance of parasitoids of Lepidopteran pests. *PLoS One*, [S.l.], n. 2, e600, 2007.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. *Stages of soybean development*. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. (Special Report, 80).
- FIUZA, L. M. 2009. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. *Biociência & Desenvolvimento*, 38: 32-35.
- FUJIHARA, R. T. et al. *Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias*. Botucatu: FEPAF, 2011.
- GARCIA, M. A.; ALTIERI, M. A. Transgenic crops: implications for biodiversity and sustainable agriculture. *Bull. Sci. Technol. Soc.*, [S.l.], n. 25, p. 335–353, 2005.
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. New York: John Wiley and Sons, 2000.
- GONZÁLEZ, H.D.; RUÍZ, D.B. Los Braconidos (Hymenoptera: Braconidae) como grupo parâmetro de biodiversidade em las selvas deciduas del tropic: uma discussion acerca de su possible uso. *Acta Zoologica Mexica* (n.s) 79, p.43-56, 2000.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu Rev Entomol*, [S.l.], n. 43, p. 701–726, 1998.
- GOULD, F.; KENNEDY, G. G.; JOHNSON, M. T. Effects of natural enemies on the rate of herbivore adaptation to resistant host plants. *Entomol Exp Appl*, [S.l.], n. 58, p. 1–14, 1991.
- GREENBERG, S. M.; LI, Y. X.; LIU, T. X. Effect of age of transgenic cotton on mortality of lepidopteran larvae. *Southwest. Entomol.*, [S.l.], n. 35, p. 261–268, 2010.
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, n. 69, p. 488-497, 1976.
- HAWKINS, B.A. Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology* 78(7): 2145-2152, 1997.
- HEAD, G. P.; GREENPLATE, J. The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. *GM Crops Food*, [S.l.], v. 3, p. 144–153, 2012.

- HO, P.; ZHAO, J. H.; XUE, D. Access and control of agro-biotechnology: Bt cotton, ecological change and risk in China. *J. Peasant Stud.*, [S.l.], n. 36, p. 345–364, 2009.
- HOFFMAN-CAMPO, C.B. et al. *Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado*. Londrina: Embrapa Soja, 2000. (EMBRAPA. Circular Técnica, n. 30).
- HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* *Microbiological Reviews*, [S.l.], v. 53, p. 242-255, 1989.
- HOMRICH, M. S. et al. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar 'IAS5' expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genet. Mol. Biol.*, [S.l.], n. 31, p. 522–531, 2008.
- HUTCHISON, W. D. et al. Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. *Science*, [S.l.], n. 330, p. 222–225, 2010.
- JAMES, C. *Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2017*. Ithaca: ISAAA, 2016. (ISAAA Brief, n. 52).
- JIN et al. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. *Nat. Biotechnol.*, [S.l.], n. 33, p. 169–174, 2015.
- KNAAK, N., FRANZ, A. R., AND FIUZA, L. M. 2010. Histopathology and the Lethal Effect of Cry Proteins and Strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). *Brazilian journal of biology*, 70: 677–84.
- KOUSER, S.; QAIM, M. Impact of Bt cotton on pesticide poisoning in smallholder agriculture: a panel data analysis. *Ecol. Econ.*, [S.l.], n. 70, p. 2105-2113, 2011.
- KRISHNA, V. V.; QAIM, M. Bt cotton and sustainability of pesticide reductions in India. *Agric. Syst.*, [S.l.], n. 107, p. 47–55, 2012.
- LASALLE, J.; GAULD, I. D. *Hymenoptera and biodiversity*. Wallingford: C. A. B. International. 1993.
- LI, G. et al. Impacts of transgenic Bt cotton on a non-target pest, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) (Hemiptera: Miridae), in northern China. *Crop Prot.*, [S.l.], n. 30, p. 1573–1578, 2011.
- LIU, X. X. et al. Natural enemies delay insect resistance to Bt crops. *PLoS One*, [S.l.], n. 9, e90366. 2014.
- LIU, X. X.; SUN, C. G.; ZHANG, Q. W. Effects of transgenic Cry1A+CpTI cotton and Cry1Ac toxin on the parasitoid, *Campoketis chloridae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect Sci.*, [S.l.], n. 12, p. 101–107. 2005.
- LU, Y. et al. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, [S.l.], n. 487, p. 362–365, 2012.
- LUNDGREN, J.G. et al. Ecological compatibility of GM crops and biological control. *Crop Protection* 28: 1017–1030, 2009.
- LUTTRELL, R. G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and

commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, [S.l.], n. 92, p. 21–32, 1999.

LUZ, M. P. C. Noctuídeos e parasitoides associados à soja não-Bt e Bt (Cry1Ac) no Cerrado. Dissertação (Mestrado em Zoologia) -- Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23416/1/2016_PriscilaMariaColombodaLuz.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2016.

LYNCH, R. E.; PARIR, S. D.; JOHNSON, R. Fall armyworm fecundity: relationships of egg mass weight to number of eggs. *Journal of the Georgia Entomological Society*, Athens, v. 18, n. 4, p. 507-513, 1983.

MAGALHÃES, G.O. et al. Interactions Between Bt-Bioinsecticides and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), a Predator of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Neotropical entomology*, [S.l.], n. 44.5, p. 521-527, 2015.

MARTINS, G. L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Eficiência de inseticidas no controle de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. *Revista de Agricultura Neotropical*, Cassilândia, n. 2, p. 25–30, 2015.

MATTHEWS, R. W. Biology of Braconidae. *Annual Review of Entomology*, [S.l.], v. 19, p. 15-32, 1974.

MEINKE, L. J. et al. Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) population dynamics. *Agric. For. Entomol.*, [S.l.], n. 11, p. 29-46, 2009.

MICHEREFF-FILHO, M. et al. Effect of some biorational insecticides on *Spodoptera eridania* in organic cabbage. *Pest Management Science*, [S.l.], n. 64, p. 761–767, 2008.

MIRANDA, R.; ZAMUDIO, F. Z.; BRAVO, A. Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, [S.l.], n. 31, p. 1155-1163, 2001.

MONSANTO. Application for authorization to place on the market MON 87701 × MON 89788 soybean in the European Union, according to Regulation (EC) No <http://www.gmocompass.org/pdf/regulation/soybean/MON87701xMON89788_soybean_application_food_feed.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2015. 1829/2003 on genetically modified food and feed. 2003. Disponível em: 2899-2914, 2015.

MOSCARDI, F. et al. Artropodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Ed.). *Soja: manejo integrado de insetos e outros artropodes-praga*. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 213–334.

NARANJO, S. E. Impacts of Bt crops on non-target organisms and insecticide use patterns. *CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources*, [S.l.], v. 4, n. 11, 2009. Disponível em: <DOI10.1079/PAVSNNR20094011>. Acesso em: 10 fev. 2016.

NARANJO, S. E. Impacts of Bt transgenic cotton on integrated pest management. *J. Agric. Food Chem.*, [S.l.], n. 59, p. 5842–5851, 2011.

NUNES, D. H. *Efeitos do algodoeiro geneticamente modificado Bollgard® em organismos não-alvo*. 2010. 211f. Tese (Doutorado em Ciências) -- Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.

OLIVEIRA, J. R. G.; FERREIRA, M. C.; ROMAN, R. A. A. Diferentes diâmetros de gotas e equipamentos para aplicação de inseticida no controle de *Peudoplusia includens*. *Eng. Agric. Jaboticabal*, v. 30, n. 1, p. 92-99, jan./fev. 2010.

OLIVEIRA, K. B. et al. Aspectos Biológicos de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) Desenvolvida em Milho Bt e Não Bt. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 8., Londrina, 2013. *Anais eletrônicos...* Londrina: Embrapa Soja, 2013. p. 119-124.

POPPY, G. M. Geneflow from GM plants-towards a more quantitative risk assessment. *Trends Biotechnol.*, [S.l.], n. 59, p. 22, 436-438, 2004.

QUICKE, D. L. *Parasitic wasps*. London: Chapman & Hall, 1997.

RAHMAN, K. et al. Differential protection of Cry1Fa toxin against *Spodoptera frugiperda* larval gut proteases by cadherin orthologs correlates with increased synergism. *Appl. Environ. Microbiol.*, [S.l.], n. 78, p. 354-362, 2012.

RAMIREZ-ROMERO, R. et al. Impact assessment of Bt-maize on a moth parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), via host exposure to purified Cry1Ab protein or Bt-plants. *Crop Prot*, [S.l.], n. 26, p. 953-962. 2007.

REICHERT, M. B., et al. Biological performance of the predatory mite *Neoseiulus idaeus* (Phytoseiidae): a candidate for the control of tetranychid mites in Brazilian soybean crops. *Brazilian Journal of Biology AHEAD*, São Carlos, 2017.

ROMEIS, J.; McLEAN, M. A.; SHELTON, A. M. When bad science makes good headlines: the case of Bt maize and regulatory bans. *Nat Biotechnol*, [S.l.], n. 37, p. 386-7. 2013.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, [S.l.], n. 24, p. 63–71, 2006.

ROMEIS, J.; SHELTON, A. M.; KENNEDY, G. G. Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. *Dordrecht, Springer*, 2008.

SANDERS, C. J. et al. Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Biol. Control*, [S.l.], n. 40, p. 362-369, 2007.

SANTOS, K. B. et al. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control*, [S.l.], n. 50, p. 157-163, 2009.

- SANTOS, K. B.; NEVES, P. M. O. J.; MENEGUIM, A. M. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. *Neotropical Entomology*, [S.l.], n. 34, p. 903–910, 2005.
- SCHNEPF, E. et al. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.*, [S.l.], v. 47, p. 845–881, 2002.
- SHARKEY, M. J. Family Braconidae. In: GOULET, H.; HUBER, J. T. *Hymenoptera of the world: an identification guide to families*. Ottawa: Research Branch Agriculture Canada Publication, 1993. p. 362-395.
- SHELTON, A. M. et al. Setting the Record straight: a rebuttal to an erroneous analysis on transgenic insecticidal crops and natural enemies. *Transgenic Research*, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 317–322, Jun. 2009.
- SILVA, R.; CRUZ, I.; PENTEADO-DIAS, A. First report of *Dolichozele koebelei* Viereck, 1911 (*Hymenoptera: Braconidae*) on larvae of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize (*Zea mays* L.) under different cropping systems. *Braz. J. Biol.*, [S.l.], n. 74, S218–S222, 2014
- SINGH, A. K.; DUBEY, S. K. Current trends in *Bt* crops and their fate on associated microbial community dynamics: a review. *Protoplasma*, [S.l.], n. 253, p. 663–681, 2016.
- SMALE, M.; ZAMBRANO, P.; CARTEL, M. Bales and balance: a review of the methods used to assess the economic impact of *Bt* cotton on farmers in developing economies. *AgBioForum*, [S.l.], n. 9, p. 195–212, 2006.
- SOUZA, A. E. R. A. *Diversidade de himenópteros parasitoides em agroecossistemas*. Dissertação (Mestrado em Zoologia) -- Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.
- SPSS. *SPSS user's guide*. Chicago: SPSS, 1998.
- SUJII, E. R. et al. Non-target and biodiversity impacts on non-target herbivorous pests. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). *Environmental risk assessment of genetically modified organisms*. Wallingford: CBA International, 2006. v. 2: Methodologies for assessing *Bt* cotton in Brazil, p. 133-154.
- TABASHNIK, B. E.; BREVAULT, T.; CARRIÈRE, Y., Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. *Nat. Biotechnol.*, [S.l.], v. 31, 510–521, 2013.
- TIAN, J. C. et al. *Bt* crops benefit natural enemies to control non-target pests. *Sci. Rep.*, [S.l.], n. 5, p. 16636, 2015.
- TOMQUELSKI, G. V.; MARUYAMA, L. C. T. Lagarta-da-maca em soja. *Rev. Cultiv.*, [S.l.], n. 117, p. 20-22, 2009.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Department of Agriculture World Agricultural Supply and Demand Estimates. *WASDE-552*, Washington, 12 Apr. 2016.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, [S.l.], p. 1-16, 2009.

VAN WYK, A.; VAN DEN BERG, J.; VAN HAMBURG, H. Diversity and comparative phenology of Lepidoptera on Bt and non-Bt maize in South Africa. *Int. J. Pest Manag.*, [S.l.], n. 54, p. 77–87, 2007.

VOJTECH, E.; MEISSLE, M.; POPPY, G. M. Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Transgenic Res.*, [S.l.], n. 14, p. 133–144, 2005.

WHARTON, R. A.; MARSH, P. M.; SHARKEY, M. J. (Ed.). *Manual of the new world Genera of the family Braconidae (Hymenoptera)*. Washington: Special Publication of the International Society of Hymenopterists, 1997. v. 1.

WILSON, D.; RIDGWAY, R. Morphology, development, and behavior of the immature stages of the parasitoid, *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, [S.l.], n. 54, p. 191-196, 1975.

WOLFENBARGER, L. L. et al. Bt crops effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *PLoS ONE*, [S.l.], v. 3, p. 22-84, 2008.

YAMADA, M.V. Estudo da Biodiversidade dos Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonidae) em áreas de Mata Atlântica do Parque Estadual do Jaraguá, São Paulo/SP. Dissertação de mestrado (Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 97, 2001.

YANO, S. A. et al. High susceptibility and low resistance allele frequency of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to Cry1Ac in Brazil. *Pest Manag. Sci.*, [S.l.], n. 72, p. 1578-1584, 2015.

YU, H. et al. Expression of Cry1Ac in transgenic Bt soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. *Pest Manag. Sci.*, [S.l.], n. 69, p. 1326–1333, 2013.

ZEILINGER, A. R.; OLSON, D. M.; ANDOW, D. A. Competition between sting bug and heliothine caterpillar pests on cotton at within-plant spatial scales. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, [S.l.], ed. 141, p. 59-70, 2011.

ZHANG, S. Y. et al. Biology of *Campoletis chlorideae* (Uchida) (Hym., Ichneumonidae) developing in Bt-treated, Bt-resistant *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae) larvae. *J. Appl. Entomol.*, [S.l.], n. 130, p. 268–274, 2006.

ZHAO, J. Z. et al. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. *Proc. Natl.Acad.Sci., U.S.A.*, n. 102, p. 8426–8430, 2005.

ZONETTI, P. C. et al. High temperatures on root growth and lignification of transgenic glyphosate-resistant soybean. *Agrociencia, Texcoco*, p. 557–565, 2012.

APÊNDICE A - TRABALHOS PUBLICADOS NO PERÍODO

RESUMOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

SALLES, S.; PAVANI, F.; FIUZA, L. Ocorrência de *Campoletis Flavicincta* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* coletadas no município de Cachoeirinha- RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 8, 2013, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: Park Hotel Morotin, 2013. p. 35-36.

SALLES, S.; PINTO, L.; FIUZA, L. Comparação da Abundância de Insetos da Ordem Lepidoptera Coletados em Campo no Cultivo de Soja-*Bt* (Cry1Ac) e Não-*Bt*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 25, Goiânia. *Anais...* Goiânia: Centro de Convenções, 2014.

SALLES, S. et al. Diversidade de lepidópteros em áreas de cultivo de soja *Bt* e não *Bt*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 7, 2015, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: Centro de Convenções Centro Sul, 2015.

ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO:

Salles, S ; Machado V; Pinto, L, Fiuza, L. Genetically Modified Soybean Expressing Insecticidal Protein (Cry1ac): Management Risk and Perspectives. ***Facets: Canadian Science Publishing***. May 2017.

ESTÁGIO TÉCNICO:

SALLES, S. *Treinamento técnico*: Laboratório de Entomologia - Embrapa/Soja. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina: Maio-Agosto 2016. Paraná.

Genetically modified soybean expressing insecticidal protein (Cry1Ac): Management risk and perspectives

Silvia Martins-Salles^{a*}, Vilmar Machado^b, Laura Massochin-Pinto^c, and Lidia M. Fiuza^d

^aPPG Biology, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Avenida Unisinos, 950, São Leopoldo, RS 93022-750, Brazil; ^b Pós graduação em biotecnologia, Universidade do Oeste de Santa Catarina—UNOESC, R. Antônio Pinto, 21—Alvorada, Videira, SC 89560-000, Brazil; ^cInstitute of Technology in Food for Health—itt-Nutrifor, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Av. Unisinos, 950, Cristo Rei, São Leopoldo, RS CEP 93.022-000, Brazil; ^dLaboratory of Microbiology and Toxicology; EEA—Instituto Rio Grandense do Arroz, Avenida José Bonifácio de Cavalho Bernardes, 1494, Cachoeirinha, RS CEP 94930-030, Brazil
[*silviamsalles@hotmail.com](mailto:silviamsalles@hotmail.com)

Abstract

A *Bt* soybean has been recently developed, thus, efficiently regulating the populations of major lepidopteran pests. However, in other cases, these benefits have been reduced or lost because of the rapid evolution of pest resistance to the *Bt* toxins in transgenic crops. When pest populations are exposed to *Bt* crops and to refuges (non-*Bt* plants), the evolution of resistance is governed by the fitness of resistant individuals relative to susceptible individuals for both the presence and absence of *Bt* toxins. One major ecological concern regarding the biosafety of *Bt* crops on the environment is their potential effects on non-target organisms, especially predators and parasitoids that play an important role in pest control. This information is important for supporting insect resistance management (IRM) programs and for improving agricultural practices in a crop production system with *Bt* plants. Before the use of *Bt* plants for insect pest control in Brazil is adopted, IRM programs should be established to ensure the sustainability of this technology for integrated pest management (IPM). This review presents data on *Bt* soybean and lepidopteran pests as well as on the importance of natural enemies as a form of biological control, and applications for IPM and IRM.

Key words: *Bt* soybean, lepidopteran pests, natural enemies, integrated pest management, insect resistance management.

Introduction

Genetically modified (GM) plants resistant to insects represent a new insect pest control method for integrated pest management (IPM) programs in various agroecosystems. These plants are characterized by expressing genes of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) that encode the expression of proteins with insecticidal effects. There are many benefits of using *Bt* plants in agriculture, including a more efficient control of insect pests, reducing the use of insecticides, and facilitating and maintaining populations of natural enemies in the farming areas (Roush and McKenzie 1987). The use of *Bt* plants facilitates integration with biological control in IPM programs and enables more sustainable agricultural practices (Roush and McKenzie 1987).

In 2015, Brazil ranked second only to the USA in the world for biotech crop hectareage, with 44.2 million ha (up from 42.2 million in 2014); the increase in 2015 was 2 million ha, equivalent to a growth rate of 5%. Brazil commercially planted a soybean stacked with insect resistance and herbicide tolerance on 11.9 million ha for a third year, increasing from 2.3 million ha in 2013 to 5.2 million ha in 2014 (a fivefold increase) (James 2015).

As the Cry proteins expressed in the commercialized *Bt* crops are highly selective and have a narrow spectrum of activity, they can form an important component of IPM (Naranjo 2011). These protoxins kill lepidopteran pests because they specifically interact with receptors found in the insect gut and induce the formation of pores in the apical membrane of the cells, destroying the intestinal tissue, allowing bacterial septicemia in the hemocoel, and resulting in larval death (Raymond et al. 2010; Gomez et al. 2014). The protoxins are activated by digestive enzymes in the midgut and bind to specific receptors in the microvilli of the apical membranes of the columnar cells of the lepidopteran's gut (Höfte and Whiteley 1989; Soberón et al. 2016; Jurat-Fuentes and Crickmore 2017). The binding of Cry toxins to the apical microvillus of the membrane vesicles of the insect determines the specificity of the Cry toxins (Bravo et al. 2007). Different proteins have been identified as receptors for *Bt* in Lepidoptera and can be highlighted within Lepidoptera, including aminopeptidases (de Maagd et al. 2001; Onofre et al. 2017), "cadherin-like protein" (Gahan et al. 2001; Xiao et al. 2017), and alkaline phosphatase (Jurat-Fuentes and Adang 2004; Yuan et al.

2017). In addition to the cry genes, some *Bt* plants such as corn and cotton express vegetative insecticidal proteins from *Bt*, which proved effective in the control of some economically important insect pests.

The *Bt* soybean MON 87701 ×MON 89788 efficiently targets a range of species, including *Anticarsia gemmatalis* (velvetbean caterpillar) Hübner (Lepidoptera: Erebidae) and *Chrysodeixis includens* (soybean looper) Walker (Lepidoptera: Noctuidae) (Bernardi et al. 2012), but it is not efficient against *Spodoptera* spp. (armyworms) (Bernardi et al. 2014b).

Some studies have already reported that the adoption of *Bt* crops leads to a reduction in insecticide use (Hutchison et al. 2010; Kouser and Qaim 2011; Lu et al. 2012), possibly favoring certain nontarget pest outbreaks (Zhao et al. 2011). Therefore, it is important to understand the direct and indirect impacts of *Bt* plants on both nontarget pest species and their natural enemies. The maintenance of natural enemies is of paramount importance for preventing phytophagous insects from reaching population levels capable of causing economic damage (Berti and Ciociola 2002). Despite being important, there are few studies of the interactions between *Bt* plants and parasitoids of insect pests (Tian et al. 2013; Liu et al. 2014).

Before the use of *Bt* plants for insect pest control in Brazil is adopted, insect resistance management (IRM) programs should be established to ensure the sustainability of this technology for IPM. There is still a need for IRM strategies to be implemented effectively, and mitigation strategies must be designed for cases in which there is an increased frequency of resistant alleles in the populations of the target pest in *Bt* plants. This review presents data on *Bt* soybean and lepidopteran pests as well as on the importance of natural enemies as a form of biological control, and applications for IPM and IRM.

***Bt* soybean**

Early efforts to obtain *Bt* soybean cultivars showed to be promising alternatives to control defoliating caterpillars in soybeans. The first report of the successful introgression and expression of a native cry1Ab *Bt* gene in soybeans was published in 1994 (Parrott et al. 1994), and several more studies on the subject have since been published. Stewart et al. (1996) produced a transgenic soybean plant with synthetic *Bt*

cryIAc (tic 107) and described the tissue culture and transformation procedures and the molecular and biotic characteristics of the *Bt* soybean that was produced. Walker et al. (2000) demonstrated a transgenic lineage of the soybean 'Jack', *Glycine max* (L.) Merrill, expressing a synthetic *cryIAc* gene from *B. thuringiensis* variety *kurstaki* (Jack-Bt), which was evaluated for resistance to four lepidopteran pests in the field: *Helicoverpa zea* (corn earworm) Boddie, *A. gemmatalis* (soybeans caterpillar) Hubner, *C. includens* (soybean looper) Walker, and *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer) Zeller, and data from these experiments suggested that expression of this cryIAc construct in the soybean should provide adequate levels of resistance to several lepidopteran pests under field conditions. MacRae et al. (2005) developed lineages containing the event MON 87701 and expressing the synthetic protein TIC 107, which is nearly identical to the native CryIAc protein. Homrich et al. (2008) evaluated the agronomic performance and chromosomal stability of transgenic homozygous progenies of the soybean and confirmed the resistance of these plants to *A. gemmatalis*.

Bt soybean has recently been developed by combining the transformation events MON 87701 (expressing CryIAc protein) and MON 89788 (glyphosate tolerance). This soybean cultivar is characterized by having the *cryIAc Bt* gene encoding the CryIAc protein and the protein 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from *Agrobacterium* spp. that confers tolerance to the herbicide glyphosate. The *cryIAc* gene is an exogenous gene from the bacterium *B. thuringiensis kurstaki* HD73, which confers to the plant resistance to major soybean Caterpillar pests. The soybean cultivar MON 87701-2 was produced by transferring the *cryIAc* gene using a gene promoter *rbcS4* control of the species *Arabidopsis thaliana*. This promoter expresses the characteristics of the gene of interest at high levels in green tissue (Cui et al. 2015). The protein sequence is 99% identical to the CryIAc protein from *B. thuringiensis kurstaki*. The high-dose expression (25 times the amount required to kill 99% of a susceptible population) and concentration in the leaves can reach approximately 450 µg/g of the dry weight (MacRae et al. 2005).

This product was commercially released in Brazil in 2013/2014. Based on the experiences with *Bt* maize and cotton, *Bt* soybean technology is expected to control major Lepidoptera pests. Considering the ease of *Bt* soybean cultivation in addition to the increasing problems of caterpillars faced by Brazilian farmers, it is conceivable that this new technology will be widely adopted (Bernardi et al. 2012).

Lepidopteran pests

Bt soybean offers efficient population regulation of major lepidopteran agricultural pests such as *A. gemmatalis* (velvetbean caterpillar) and *C. includens* (soybean looper), and secondary target pests such as *Heliothis virescens* (tobacco budworm) Fabricius, *Crociosema aporema* (bean shoot moth) Walsingham, and *Rachiplusia nu* (sunflower looper) Guenée (Bernardi 2012).

Caterpillars of the genus *Spodoptera* have been causing damage to soybean fields in Brazil in recent years (Bueno et al. 2011). Within the *Spodoptera* complex, *S. eridania* (southern armyworm) Stoll, *S. cosmioides* (black armyworm) Walker, and *S. frugiperda* (fall armyworm) J.E. Smith are prominent in causing damage. These species have attacked soybeans in central and southern Brazil (Hoffmann- Campo et al. 2000; dos Santos et al. 2005). The high potential for the defoliation of soybean plants (Bueno et al. 2011) and damage to flowers and pods (Hoffmann-Campo et al. 2000) by *Spodoptera* species requires the adoption of control tactics to prevent the loss of grain yield, but there are no sufficient data available in the literature demonstrating the impact of the protein Cry1Ac on the life history parameters of *Spodoptera* species.

This information is important due to the threat of pests evolving resistance to *Bt* crops (Bernardi et al. 2014b). According to Bernardi et al. (2014b), *S. cosmioides*, *S. eridania*, and *S. frugiperda* exhibited low to no susceptibility to MON 87701 × MON 89788 soybean containing the protein Cry1Ac. These *Spodoptera* species showed higher tolerance to the Cry1Ac protein than some other Lepidoptera species, such as *C. includens*, *H. virescens*, and *H. zea* (Luttrell et al. 1999).

Yu et al. (2013) showed that the *Bt* transgenic soybean exhibited high efficacy against *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm) throughout the growing season, whereas it caused low toxicity to *Spodoptera litura* (tobacco cutworm), especially in the growth stages during and after anthesis. No toxicity of the *Bt* soybeans to *Spodoptera exigua* (beet armyworm) and *Agrotis ypsilon* (Black cutworm) larvae was observed. Therefore, planting of Cry1Ac-expressing soybeans will not effectively manage all key lepidopteran soybean pests in China (Bernardi et al. 2014a).

The low toxicity of Cry1Ac to *Spodoptera* species can be related to the high genetic variability among populations and the natural tolerance of insects to different *Bt*

proteins. This was demonstrated for native populations of *S. frugiperda* in Mexico, Brazil, and Colombia, which showed differences in susceptibility to *Bt* strains due to high genetic variability among populations; a fact that results in groups lacking receptors for certain *Bt* proteins and, thus, are insensitive to insecticidal proteins (Monnerat et al. 2006). Aranda et al. (1996) demonstrated in trials with *S. frugiperda* that insufficient and (or) a weak link of the insecticidal protein in the midgut binding sites can also affect the susceptibility to Cry1Ac, which can also be related to the inactivation of the insecticidal protein by proteases (Rahman et al. 2012).

Natural enemies

Globally, insecticides are the most widely used control method for reducing damage caused by insect pests, but they have often been overused (Bueno et al. 2011). Subsequently, as an alternative to pesticide use, there has been an increase in the use of biological controls in IPM programs, both through the release of a large number of natural enemies (applied biological control) and through the use of cultural practices that preserve extant populations of natural enemies in the crop (Van Lenteren and Bueno 2003). Studies have revealed that parasitoids of the order Hymenoptera can promote the natural control of pests, especially Lepidoptera and Hemiptera (Martins et al. 2004; Sharma et al. 2007).

The consequences of the effects of *Bt* plants on parasitoids have received attention, and studies have revealed both positive and negative impacts (Baur and Boethel 2003; Sanders et al. 2007; Dhillon and Sharma 2010). When negative effects on natural enemies have been observed with *Bt* proteins, they appear to be due to the poor quality of the host and not the Cry protein (Romeis et al. 2013).

The safety of several *Bt* proteins has been verified in tritrophic studies conducted with herbivores resistant or non susceptible to *Bt* that avoided the problems of prey quality in some other previous studies (Romeis et al. 2013). The practice of allowing *Bt*-resistant hosts to ingest *Bt* proteins and then feeding the hosts to natural enemies (both predators and parasitoids) has shown no effects on the natural enemies (Chen et al. 2008; Tian et al. 2012). However, some reports continue to suggest that natural enemies may be harmed by *Bt* proteins (Lövei et al. 2009), but these reports have been challenged (Shelton et al. 2009).

Despite being important, few studies of the interactions between *Bt* plants and the parasitoids of insect pests have been performed (Tian et al. 2013; Liu et al. 2014). Silva et al. (2014) suggested that there was no direct effect of *Bt* soybean (Cry1Ac) on the biological traits of *Euchistos heros* or its egg parasitoid *Telenomus podisi*. According to Bortolloto et al. (2014), it is important to emphasize that based on the mode of action of the *Bt* protein (gut-active), it is unlikely that the Cry1Ac, found in the *Bt* soybean, would be transferred from *S. eridania* larvae to adults to eggs. Therefore, *Telenomus remus* exposure to Cry1Ac would be zero or very low (close to zero) in this case, and direct effects are excluded. Any possible effect would be indirectly associated with the *Bt* protein insertion.

De Jesus et al. (2014) observed that the predation of nymphs and adults, and the effects on the life cycle of the predator *Podisus nigrispinus* were higher on *S. frugiperda* larvae fed with cotton NuOpal (Cry1Ac); however, the total viability of *P. nigrispinus* was lower when predating on *S. frugiperda* fed with NuOpal (transgenic cultivar). *Spodoptera frugiperda* acquires toxins from transgenic cotton, which can affect its natural predator *P. nigrispinus*. A study by Carvalho et al. (2012) showed that the integrated management of *Plutella xylostella* is feasible by using the HD1 strain of *B. thuringiensis* and the predator *P. nigrispinus* because the predator showed no preference for infected or healthy *P. xylostella* larvae and the strain *B. thuringiensis* HD1 did not affect the biological characteristics of *P. nigrispinus* when fed with infected larvae and water or healthy larvae and a *B. thuringiensis* suspension.

In a study of interactions among transgenic cotton (Cry1Ac), *Helicoverpa armigera*, and *Campoletis chloridae*, Sharma et al. (2007) observed that there was a slight reduction in adult weight and fecundity and a prolongation of the larval period, both before and after parasitization, when the parasitoid was raised on *H. armigera* larvae fed on the leaves of transgenic cotton. Survival and development of *C. chloridae* was also poor when *H. armigera* larvae were fed on the leaves of transgenic cotton. The adverse effects of transgenic cotton on the survival and development of *C. chloridae* were largely due to early mortality, and also possibly the poor nutritional quality of the *H. armigera* larvae due to toxic effects of the transgenic cotton.

Parasitoids are very sensitive to changes in their hosts after the ingestion of toxins, as they usually complete their development in a single host. When susceptible hosts are treated with *Bt* toxins, the possibility of affecting the parasitoids is greater than

it affecting the predators, which are often generic and feed on different prey (Salama et al. 1983). Godfray (1994) suggested that the host quality may affect parasitoid size, development, and survival. If the host is not able to survive, the parasitoid will not complete its development (Godfray 1994).

Management of resistance

Croft and Van de Bann (1988) defined resistance as the development of an inherited ability of an organism to tolerate doses of a toxicant that would be lethal to the majority of individuals of the species. In this context, the evaluation of the risk of resistance of target and non-target soybean pests MON 87701 × MON 89788 is of fundamental importance to the establishment of IRM management strategies. Establishing IRM strategies to prevent or delay the evolution of insect resistance to GM soybeans is one of the main challenges for the sustainability of this new technology for the IPM of soybean crops in Brazil. An important step in the management strategy of IRM practices includes the development of appropriate techniques for bioassays to assess the response of target pest populations to the *Bt* protein by obtaining lineages of basic plant susceptibility, from which it is possible to identify the diagnostic doses to be used in monitoring the resistance, allowing a discrimination between susceptible and resistant phenotypes, and the identification of potential changes in the susceptibility of the population in response to the selection pressure exerted by the *Bt* culture (Fischhoff 1996).

Among the various IRM strategies that have been proposed, one that is widely used is the high-dose expression of the insecticidal protein in plant tissues and in planting and maintaining refuge areas with non-*Bt* plants (Fig. 1) (Alstad and Andow 1995; Gould 1998; Caprio et al. 2000; Huang et al. 2011). These strategies are based on two important observations: resistance is a recessive trait, and crosses between resistant and non-resistant individuals occur at random (Fig. 2) (Machado and Fiuza 2011).

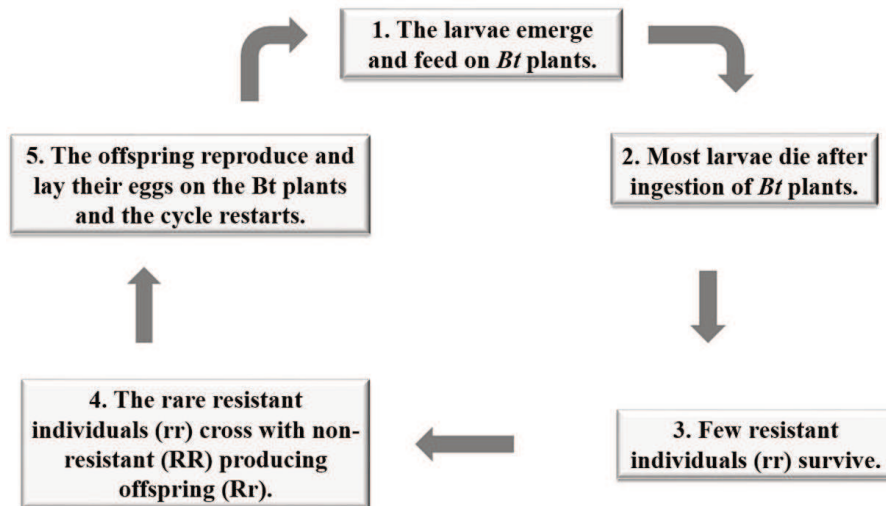


Figure 1. Basic aspects of the resistance management on requirement of the high dose and structured refuge theory

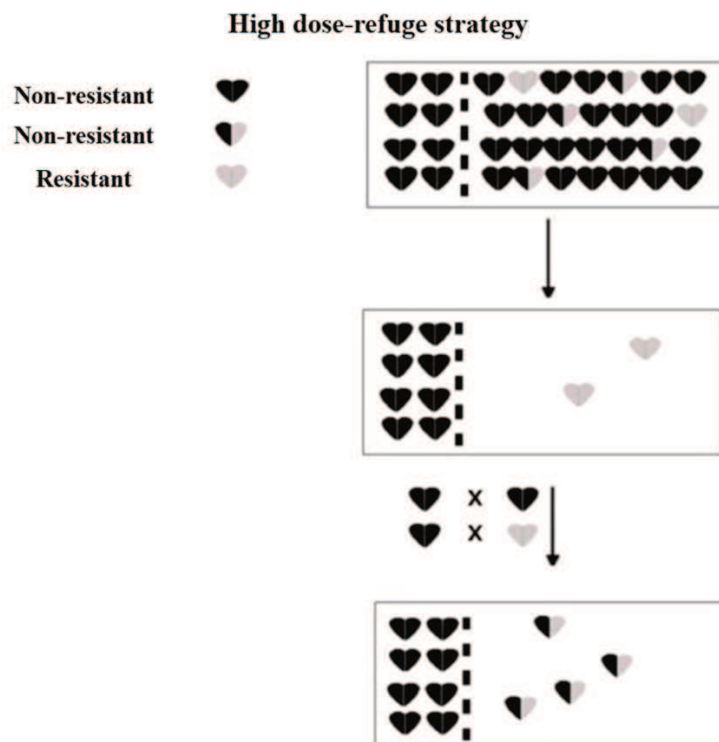


Figure 2. High dose and structured refuge strategy (the acceptances for this strategy are: the gene for resistance occurs at low frequency in populations; the amounts of *Bt* toxin produced by plants are high enough to eliminate nonresistant (homozygous recessive) insects from the populations; and resistant heterozygotes and resistant individuals (dominant homozygotes) born in areas with *Bt* plants randomly interbreed with the nonresistant individuals born in the refuge areas. The purpose of the refuges is to keep individuals susceptible to *Bt* toxin in the population, expressly, those that do not have genes for resistance. Their contribution is the production of adult insects susceptible to *Bt* toxin for breeding with resistant homozygous insects, thus “diluting” the resistance in the population. Dispersion out of refuge areas is necessary for breeding to occur.

Refuge areas then supply susceptible individuals to minimize non-random mating among the rare resistant homozygotes that survive on *Bt* plants, ensuring that the next generation consists of either susceptible or heterozygous resistant individuals. These insects are all phenotypically susceptible to the high-dose plant (Andow 2008; Tabashnik et al. 2009).

For the MON 87701 × MON 89788 soybean, the recommendation of a refuge area (with non-*Bt* soybean) of at least 20% of the area planted soybean *Bt* was approved in Brazil (CTNBio 2010). The wide use of MON 87701 × MON 89788 by Brazilian producers increases concern of the evolution of resistance. The main risks for the maintenance of this lineage over time are the failure to observe the three main foundations of the management strategy used, namely high doses, low frequency of the gene for resistance, and maintenance of the areas of refuge, according to the recommendations (Huang et al. 2011; Tabashnik et al. 2013; Omoto et al. 2016).

A study by Dourado et al. (2016) evaluating the efficiency of this lineage in the control of *H. armigera* indicated that the first two conditions are present in Brazil. The great concern of the authors the maintenance of the areas of refuge, as these are not obligatory in Brazil; areas for cultivation of *Bt* soybean may be an additional challenge for the management of resistance in the country, because temperatures are higher and the cultivation time is longer than in temperate areas. The concern with the effects of other factors is not exclusive to *Bt* soybeans, but to all *Bt* plants. It is extremely important to adopt adequate management procedures in each region, because it is necessary to consider the differences in geography, climate, size of cultivated area, number of transgenic species cultivated, biology of insect pests, and spatial and temporal genetic variability of the target species (Omoto et al. 2016; Ives et al. 2017).

The need for transgenic plants expressing different genes is reinforced by the evolution of pest lineages resistant to *Bt* plants in the field (Table 1). Field-evolved resistances in different insect pests in other regions such as the resistance of *Pectinophora gossypiella* to Cry1Ac in *Bt* cotton in India (Dhurua and Gujar 2011), the resistance of *H. zea* to Cry1Ac in *Bt* cotton in the USA (Tabashnik et al. 2013), and the resistance of *Diabrotica virgifera* to Cry3Bb in *Bt* corn in the USA (Gassmann et al. 2011) have also been reported. In addition, the resistance of *S. frugiperda* to Cry1F in maize (Storer et al. 2010; Farias et al. 2014) and the resistance of *P. gossypiella* (Saunders) to Cry1Ac in cotton (Dhurua and Gujar 2011) have been reported.

For many researchers, second generation transgenic plants, i.e., those that express two or more *Bt* toxins, are a more effective option for pest control and also to increase the longevity of transgenic plants (Carrière et al. 2015; Sheikh et al. 2017). In Brazil, for example, studies demonstrated a high efficiency of the *Bt* soybean strain DAS-81419-2 (expressing two proteins) in the reduction of damage caused by *A. gemmatilis*, *C. includens*, *H. virescens*, and *S. cosmioides* during the vegetative and reproductive stages (Marques et al. 2016). Recent studies have suggested the use of RNA interference as a promising alternative or complementary strategy for pest control and management (Asokan et al. 2014; Kim et al. 2015; Fishilevich et al. 2016; Yu et al. 2016; Ni et al. 2017).

Table 1. Species with field resistance to *Bt* plants

Pest	Resistance detected	crop	Country	gene
<i>Helicoverpa zea</i>	2002	cotton	USA	<i>cryIAc</i>
<i>Busseola fusca</i>	2004	maize	South Africa	<i>cryIF</i>
<i>Spodoptera frugiperda</i>	2007	maize	Puerto Rico/Brazil	<i>cryIAc</i>
<i>Pectinophora gossypiella</i>	2009	cotton	India	<i>cry3Bb1</i>
<i>Dibartotica virgifera virgifera</i>	2010	maize	USA	<i>cryIAb</i>

Final considerations

In Brazil, as in other countries that grow *Bt* soybeans, the main strategy for pest management is high doses and maintenance of refuges. The main objective is to delay the evolution of resistance to *Bt* toxins in the target pests. Studies indicate that this strategy is efficient to ensure the longevity of *Bt* plants (Shelton et al. 2002; Wenes et al. 2006; Yang et al. 2015; Garcia et al. 2016).

One of the main problems in the cultivation of *Bt* soybeans in Brazil is the emergence of secondary pests. Several studies have reported significant losses in production by the action of these species (Ferreira et al. 2015; Pomari-Fernandes et al. 2015). The technological solution to this problem is the production of transgenic plants expressing a higher number of *Bt* toxins, as indicated in the results obtained by Marques et al. (2017), which show the high efficiency of a soybean variety containing two *Bt* toxins in the control of primary and secondary pests. The recommended strategies for controlling problematic pests are the cultivation of plants expressing genes for two or three *Bt* toxins, the expansion of refuge areas, and the use of other management tactics (Carrière et al. 2016a, 2016b; Ni et al. 2017).

The emergence of secondary pests is a possibility that can not be discounted, especially for plants such as soybeans that are targets of different insect species (Zeilinger et al. 2016; Marques et al. 2017). The relevant question here is as follows: how are we going to address this possibility? To use only the technological solution of increasing the number of toxins expressed by *Bt* plants, or seek ecological solutions of greater complexity? A more complex solution requires a more accurate assessment of the effective contribution of natural enemies in reducing the impact of primary and secondary pests as well as changes in the methods of large-scale plant cultivation. In addition, it should take into account other information, such as geographical aspects of cultivated areas, target pest biology, and genetic variability (Omoto et al. 2016; Ives et al. 2017).

Several studies have indicated the potential of natural enemies to help in the fight against soybean pests (Liu et al. 2014; Macfadyen et al. 2015; Zalucki et al. 2015), but the introduction of these species is difficult in homogeneous crops, as they occur over large areas of cultivation. Perhaps in the near future it will be necessary to implement cultivation processes in large areas that will increase plant diversity and, thus, favor the presence of the natural enemies of the main pests.

González et al. (2017) found a greater diversity of the natural enemies of soybean pests in cultivated areas with a greater diversity of vegetal species nearby. In these areas there was a greater contribution of the natural enemies to the control of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). The importance of plant diversity for the development and maintenance of the diversity of natural enemies in cultivated areas has also been highlighted by Harterreiten-Souza et al. (2014), Venugopal et al. (2014), Mitchell et al. (2014a, 2014b), Cohen and Crowder (2017), and Maisonhaute et al. (2017). In Brazil, there are studies indicating the possibility of using natural enemies in the fight against soybean pests (Reichert et al. 2014, 2016; Paz-Neto et al. 2015; Cividanes et al. 2017).

The history of pest control shows that the evolution of resistance to the control agents that are developed is only a matter of time. Over the course of the relationship of human beings with the pests of cultivated plants, we have developed a set of strategies to minimize losses in production and have become aware that our relationship with pests is continuous in space and time. These strategies minimized the losses and increased the useful life of the control agents. The strategy of “high doses and structured shelter” should be considered the minimum necessary in terms of pest control and management. It is necessary, however, to extend the set of procedures used. In this sense, the development of management strategies that are more complex and that really favor the increase of the diversity of agroecosystems is fundamental; these strategies will enable an increase in and maintenance of the diversity of natural enemies.

Acknowledgements

We thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support and the Brazilian Coordination of Improvement of High-level Education (Capes) for granting a doctoral scholarship to the senior author.

Author contributions

Conceived and designed the study: SM-S, LMF. Performed the experiments/collected the data: SM-S, LM-P. Analyzed and interpreted the data: SM-S, LM-P. Contributed resources: SM-S, VM, LM-P. Drafted or revised the manuscript: SM-S, VM, LM-P, LMF.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Data accessibility statement

All relevant data are within the paper.

References

- Alstad DN, and Andow DA. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science*, 268: 1894–1896. PMID:17797533. doi:10.1126/science.268.5219.1894.
- Andow DA. 2008. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of Biosafety Reviews*, 4: 142–199.
- Aranda E, Sanchez J, Peferoen M, Güereca L, and Bravo A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 203–212. PMID:8931361. doi:10.1006/jipa.1996.0087.
- Asokan R, Chandra GS, Manamohan M, Kumar NKK, and Sita T. 2014. Response of various target genes to diet-delivered dsRNA mediated RNA interference in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Pest Science*, 87: 163–172. doi:10.1007/s10340-013-0541-7.
- Baur ME, and Boethel DJ. 2003. Effect of Bt-cotton expressing Cry1A(c) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biological Control*, 26: 325–332. doi:10.1016/S1049-9644(02)00160-3.
- Bernardi O. 2012. Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON87701 × MON89788. Ph.D. thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil. 117 p.
- Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, et al. 2012. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pest Management Science*, 68: 1083–1091. PMID:22407725. doi:10.1002/ps.3271.
- Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Berger GU, Head GP, et al. 2014a. High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 × MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 70: 588–594. PMID:23687086. doi:10.1002/ps.3581.
- Bernardi O, Sorgatto RJ, Barbosa AD, Domingues FA, Dourado PM, Carvalho RA, et al. 2014b. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. *Crop Protection*, 58: 33–40. doi:10.1016/j.cropro.2014.01.001.

Berti FE, and Ciociola AI. 2002. Parasitoides ou predadores? Vantagens e desvantagens. In *Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores*. Edited by JRP Parra, PSM Botelho, BS Corrêa-Ferreira, and JMS Bento. Editora Manole, Barueri, Brazil. pp. 29–41.

Bortolloto OC, Silva GV, de Freitas Bueno A, Pomari AF, Martinelli S, Head GP, et al. 2014. Development and reproduction of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) and its egg parasitoid *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae) on the genetically modified soybean (Bt) MON 87701 × MON 89788. *Bulletin of Entomological Research*, 104: 724–730. doi:10.1017/S0007485314000546.

Bravo A, Gill SS, and Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423–435. PMID:17198720. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.022.

Bueno RCOF, Bueno AF, Moscardi F, Parra JRP, and Hoffmann-Campo CB. 2011. Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Management Science*, 67: 170–174. PMID:20981726. doi:10.1002/ps.2047.

Caprio MA, Summerford DV, and Sims SR. 2000. Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. In *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Edited by LA Lacey and HK Kaya. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands. Chapter 8, pp. 805–828.

Carrière Y, Crickmore N, and Tabashnik BE. 2015. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology*, 33(2): 161–168. PMID:25599179. doi:10.1038/nbt.3099.

Carrière Y, Fabrick JA, and Tabashnik BE. 2016a. Advances in managing pest resistance to Bt crops: pyramids and seed mixtures. In *Advances in insect control and resistance management*. Edited by AR Horowitz and I Ishaaya. Springer International Publishing, Cham, Switzerland. pp. 263–286.

Carrière Y, Fabrick JA, and Tabashnik BE. 2016b. Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? *Trends in Biotechnology*, 34: 291–302. PMID:26774592. doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.011.

Carvalho VFP, Vacari AM, Pomari AF, De Bortoli CP, Ramalho DG, and De Bortoli SA. 2012. Interaction between the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) and the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Entomology*, 41: 1454–1461. PMID:23321092. doi:10.1603/EN12060.

Chen M, Zhao JZ, Collins HL, Earle ED, Cao J, and Shelton AM. 2008. A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *PLoS ONE*, 3: e2284. PMID:18523682. doi:10.1371/journal.pone.0002284.

Cividanes FJ, dos Santos-Cividanes TM, Ferraudo AS, and da Matta DH. 2017. Edge effects on carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) between forest fragments and agricultural fields in south-east Brazil. *Austral Entomology*. doi:10.1111/aen.12263.

- Cohen AL, and Crowder DW. 2017. The impacts of spatial and temporal complexity across landscapes on biological control: a review. *Current Opinion in Insect Science*, 20: 13–18. doi:10.1016/j.cois.2017.02.004.
- Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). 2010. Commercial release of genetically modified insect-resistant and herbicide-tolerant soy containing genetically modified events MON87701 and MON 89788. Technical Opinion No. 2542/2010 [online]: Available from ctnbio.mcti.gov.br/documents/566529/686342/Extrato+de+Parecer+n%C2%BA%202542.2010.pdf/3f5030f6-c71d-4999-9504-72239fc4f9c4?version=1.0.
- Croft BA, and Van De Bann HE. 1988. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Experimental & Applied Acarology*, 4: 277–300. doi:10.1007/BF01196191.
- Cui XY, Chen ZY, Wu L, Liu XQ, Dong YY, Wang FW, et al. 2015. rbcS SRS4 promoter from *Glycine max* and its expression activity in transgenic tobacco. *Genetics and Molecular Research*, 14: 7395–7405. PMID:26214418. doi:10.4238/2015.July.3.15.
- De Jesus FG, Boiça AL Jr, Alves GCS, and Zanuncio JC. 2014. Behavior, development, and predation of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed transgenic and conventional cotton cultivars. *Annals of the Entomological Society of America*, 107(3): 601–606. doi:10.1603/AN13100.
- de Maagd RA, Bravo A, and Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17: 193–199. PMID:11275324. doi:10.1016/S0168-9525(01)02237-5.
- Dhillon KM, and Sharma CH. 2010. Chickpea-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* on *Helicoverpa armigera* and its larval parasitoid, *Campoletis chlorideae*. *Journal of Applied Entomology*, 134: 682–693. doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01506.x.
- Dhuraa S, and Gujar GT. 2011. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest Management Science*, 67: 898–903. PMID:21438121. doi:10.1002/ps.2127.
- dos Santos KB, Meneguim AM, and Neves PMOJ. 2005. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. *Neotropical Entomology*, 34: 903–910. doi:10.1590/S1519-566X2005000600005.
- Dourado PM, Bacalhau FB, Amado D, Carvalho RA, Martinelli S, Head GP, et al. 2016. High susceptibility to Cry1Ac and low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt soybean in Brazil. *PLoS ONE*, 11(8): e0161388. PMID:27532632. doi:10.1371/journal.pone.0161388.
- Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Dos Santos AC, et al. 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64: 150–158. doi:10.1016/j.cropro.2014.06.019.

- Ferreira BGC, Freitas MML, and Moreira GC. 2015. Custo operacional efetivo de produção de soja em sistema de plantio direto. *Revista iPecege*, 1: 39–50. doi:10.22167/r.ipecege.2015.1.39.
- Fischhoff DA. 1996. Insect-resistant crop plants. In *Biotechnology and integrated pest management*. Edited by GJ Persley. Cabi International, Wallingford, UK. pp. 214–227.
- Fishilevich E, Vélez AM, Storer NP, Li H, Bowling AJ, Rangasamy M, et al. 2016. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Management Science*, 72: 1652–1663. PMID:27218412. doi:10.1002/ps.4324.
- Gahan LJ, Gould F, and Heckel DG. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857–860. PMID:11486086. doi:10.1126/science.1060949.
- Garcia AG, Ferreira CP, Cónsoli FL, and Godoy WA. 2016. Predicting evolution of insect resistance to transgenic crops in within-field refuge configurations, based on larval movement. *Ecological Complexity*, 28: 94–103. doi:10.1016/j.ecocom.2016.07.006.
- Gassmann AJ, Petzold-Maxwell JL, Keweshan RS, and Dunbar MW. 2011. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. *PLoS ONE*, 6: e22629. PMID:21829470. doi:10.1371/journal.pone.0022629.
- Godfray HCJ. 1994. *Parasitoids: behavioural and evolutionary ecology*. Princetown University Press, Princetown, New Jersey. 473 p.
- Gómez I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Matus V, Gill SS, Soberón M, et al. 2014. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochemical Journal*, 459: 383–396. PMID:24456341. doi:10.1042/BJ20131408.
- González E, Salvo A, and Valladares G. 2017. Arthropod communities and biological control in soybean fields: forest cover at landscape scale is more influential than forest proximity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 239: 359–367. doi:10.1016/j.agee.2017.02.002.
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701–726. PMID:15012402. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.701.
- Harterreiten-Souza ÉS, Togni PHB, Pires CSS, and Sujii ER. 2014. The role of integrating agroforestry and vegetable planting in structuring communities of herbivorous insects and their natural enemies in the Neotropical region. *Agroforestry Systems*, 88(2): 205–219. doi:10.1007/s10457-013-9666-1.

Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Ferreira BC, Oliveira LJ, Sosa DRG, Panizzi AR, et al. 2000. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. EMBRAPA, Dourados, Brazil. pp. 30–70.

Höfte H, and Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 53: 242–255. PMID:2666844.

Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Bertagnolli PF, Pasquali G, Zaidi MA, et al. 2008. Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. Genetics and Molecular Biology, 31: 522–531. doi:10.1590/S1415-47572008000300020.

Huang F, Andow DA, and Buschman LL. 2011. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. Entomologia Experimentalis et Applicata, 140: 1–16. doi:10.1111/j.1570-7458.2011.01138.x.

Hutchison WD, Burkness EC, Mitchell PD, Moon RD, Leslie TW, Fleischer SJ, et al. 2010. Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. Science, 330: 222–225. PMID:20929774. doi:10.1126/science.1190242.

Ives AR, Paull C, Hulthen A, Downes S, Andow DA, Haygood R, et al. 2017. Spatio-temporal variation in landscape composition may speed resistance evolution of pests to Bt crops. PLoS ONE, 12: e0169167. PMID:28046073. doi:10.1371/journal.pone.0169167.

James C. 2015. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief No. 51. ISAAA, Ithaca, New York.

Jurat-Fuentes JL, and Adang MJ. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. European Journal of Biochemistry, 271: 3127–3135. PMID:15265032. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04238.x.

Jurat-Fuentes JL, and Crickmore N. 2017. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. Journal of Invertebrate Pathology, 142: 5–10. PMID:27480404. doi:10.1016/j.jip.2016.07.018.

Kim YH, Issa MS, Cooper AMW, and Zhu KY. 2015. RNA interference: applications and advances in insect toxicology and insect pest management. Pesticide Biochemistry and Physiology, 120: 109–117. PMID:25987228. doi:10.1016/j.pestbp.2015.01.002.

Kouser S, and Qaim M. 2011. Impact of Bt cotton on pesticide poisoning in smallholder agriculture: a panel data analysis. Ecological Economics, 70: 2105–2113. doi:10.1016/j.ecolecon.2011.06.008.

- Liu X, Chen M, Collins HL, Onstad DW, Roush RT, Zhang Q, et al. 2014. Natural enemies delay insect resistance to Bt crops. *PLoS ONE*, 9: e90366. PMID:24595158. doi:10.1371/journal.pone.0090366.
- Lövei GL, Andow DA, and Arpaia S. 2009. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. *Environmental Entomology*, 38: 293–306. PMID:19389277. doi:10.1603/022.038.0201.
- Lu Y, Wu K, Jiang Y, Guo Y, and Desneux L. 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487: 362–365. PMID:22722864. doi:10.1038/nature11153.
- Luttrell RG, Wan L, and Knighten K. 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 92: 21–32. doi:10.1093/jee/92.1.21.
- Macfadyen S, Davies AP, and Zalucki MP. 2015. Assessing the impact of arthropod natural enemies on crop pests at the field scale. *Insect Science*, 22: 20–34. PMID:25219624. doi:10.1111/1744-7917.12174.
- Machado V, and Fiuza LM. 2011. Manejo da resistência: na era das plantas transgênicas. *Oecologia Australis*, 15: 291–302. doi:10.4257/oeco.2011.1502.07.
- Macrae TC, Baur ME, Boethel DJ, Fitzpatrick BJ, Gao AG, Gamundi JC, et al. 2005. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology*, 98: 577–587. PMID:15889751. doi:10.1093/jee/98.2.577.
- Maisonhaute JÉ, Labrie G, and Lucas E. 2017. Direct and indirect effects of the spatial context on the natural biocontrol of an invasive crop pest. *Biological Control*, 106: 64–76. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.12.010.
- Marques LH, Castro BA, Rossetto J, Silva OABN, Moscardini VF, Zobiolo LHS, et al. 2016. Efficacy of soybean's event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac to manage key tropical lepidopteran pests under field conditions in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 109: 1922–1928. PMID:27401112. doi:10.1093/jee/tow153.
- Marques LH, Santos AC, Castro BA, Moscardini VF, Rossetto J, Silva OAN, et al. 2017. Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. *Crop Protection*, 96: 109–115. doi:10.1016/j.cropro.2017.02.014.
- Martins JF, Grutzmacher AD, and Cunha U. 2004. Descrição e manejo integrado de insetos-praga em arroz irrigado. In *Arroz irrigado no Sul do Brasil*. Edited by ASG Gomes and AMJ Magalhães. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Brazil. pp. 635–675.

- Mitchell MG, Bennett EM, and Gonzalez A. 2014a. Agricultural landscape structure affects arthropod diversity and arthropod-derived ecosystem services. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 192: 144–151. doi:10.1016/j.agee.2014.04.015.
- Mitchell MG, Bennett EM, and Gonzalez A. 2014b. Forest fragments modulate the provision of multiple ecosystem services. *Journal of Applied Ecology*, 51: 909–918. doi:10.1111/1365-2664.12241.
- Monnerat R, Martins E, Queiroz P, Ordúz S, Jaramillo G, Benintende G, et al. 2006. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7029–7035. PMID:16936049. doi:10.1128/AEM.01454-06.
- Naranjo SE. 2011. Impact of Bt transgenic cotton on integrated pest management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5842–5851. PMID:20942488. doi:10.1021/jf102939c.
- Ni M, Ma W, Wang X, Gao M, Dai Y, Wei X, et al. 2017. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15(3): 1–10. PMID:28199783. doi:10.1111/pbi.12709.
- Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, et al. 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72: 1727–1736. PMID:26617261. doi:10.1002/ps.4201.
- Onofre J, Gaytán MO, Pena-Cardena A, García-Gomez BI, Pacheco S, Gómez I, et al. 2017. Identification of Aminopeptidase-N2 as a Cry2Ab binding protein in *Manduca sexta*. *Peptides*, 88(1): 1–6. PMID:28108197. doi:10.1016/j.peptides.2017.01.006.
- Parrott WA, All JN, Adang MJ, Bailey MA, Boerma HR, and Stewart CN Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki insecticidal gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 30: 144–149. doi:10.1007/BF02632204.
- Paz-Neto AA, Ranyse BQ, and Margaría CB. 2015. Egg parasitoids of stink bugs (Hemiptera: Coreidae and Pentatomidae) on soybean and cowpea in Brazil. *Florida Entomologist*, 98(3): 929–932. doi:10.1653/024.098.0318.
- Pomari-Fernandes A, De Freitas Bueno A, and Sosa-Gomez DR. 2015. *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. *Current Agricultural Science and Technology*, 21: 1–7. doi:10.18539/cast.v21i1.4234.
- Rahman K, Abdullah MAF, Ambati S, Taylor MD, and Adang MJ. 2012. Differential protection of Cry1Fa toxin against *Spodoptera frugiperda* larval gut proteases by cadherin orthologs correlates with increased synergism. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 354–362. PMID:22081566. doi:10.1128/AEM.06212-11.

- Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, and Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? Trends in Microbiology, 18: 189–194. PMID:20338765. doi:10.1016/j.tim.2010.02.006.
- Reichert MB, Da Silva GL, Rocha MDS, Johann L, and Ferla NJ. 2014. Mite fauna (Acari) in soybean agroecosystem in the northwestern region of Rio Grande do Sul State, Brazil. Systematic and Applied Acarology, 19(2): 123–136. doi:10.11158/saa.19.2.2.
- Reichert MB, Toldi M, Rode PA, Ferla JJ, and Ferla NJ. 2016. Biological performance of the predatory mite *Neoseiulus idaeus* (Phytoseiidae): a candidate for the control of tetranychid mites in Brazilian soybean crops. Brazilian Journal of Biology. PMID:27533728. doi:10.1590/1519-6984.14915.
- Romeis J, McLean MA, and Shelton AM. 2013. When bad science makes good headlines: Bt maize and regulatory bans. Nature Biotechnology, 31: 386–387. PMID:23657387. doi:10.1038/nbt.2578.
- Roush RT, and McKenzie JA. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annual Review of Entomology, 32: 361–380. PMID:3545056. doi:10.1146/annurev.en.32.010187.002045.
- Salama HS, Sharaby A, and Ragaei M. 1983. Chemical changes in the haemolymph of *Spodoptera littoralis* [Lep.: Noctuidae] as affected by *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga, 28: 331–337. doi:10.1007/BF02372185.
- Sanders CJ, Pell JK, Poppy GM, Raybould A, Garcia-Alonso M, and Schuler TH. 2007. Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera:Ichneumonidae). Biological Control, 40: 362–369. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.12.010.
- Sharma HC, Arora R, and Pampapathy G. 2007. Influence of transgenic cottons with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene on the natural enemies of *Helicoverpa armigera*. BioControl, 52: 469–489. doi:10.1007/s10526-006-9032-6.
- Sheikh AA, Wani MA, Bano P, Un S, Nabi TAB, Bhat MA, et al. 2017. An overview on resistance of insect pests against Bt crops. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5: 941–948.
- Shelton AM, Zhao J-Z, and Roush RT. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. Annual Review of Entomology, 47: 845–881. PMID:11729093. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145309.
- Shelton AM, Naranjo SE, Romeis J, Hellmich RL, Wolt JD, Federici BA, et al. 2009. Setting the Record straight: a rebuttal to an erroneous analysis on transgenic insecticidal crops and natural enemies. Transgenic Research, 18: 317–322. PMID:19357987. doi:10.1007/s11248-009-9260-5.

Silva GV, Pasini A, Bueno ADF, Bortolotto OC, Barbosa GC, and Cruz YKS. 2014. No impact of Bt soybean that express Cry1Ac protein on biological traits of *Euschistus heros* (Hemiptera, Pentatomidae) and its egg parasitoid *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 58: 285–290. doi:10.1590/S0085-56262014000300010.

Soberon M, Monnerat R, and Bravo A. 2016. Mode of action of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. In *Microbial toxins*. Edited by P Gopalakrishnakone, B Stiles, A Alape-Girón, JD Dubreuil, and M Mandal. Springer Netherlands, Dordrecht, the Netherlands. pp. 1–13.

Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, et al. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene. *Plant Physiology*, 112: 121–129. PMID:8819322. doi:10.1104/pp.112.1.121.

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, et al. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, 103: 1031–1038. PMID:20857709. doi:10.1603/EC10040.

Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, and Carrière Y. 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology*, 102: 2011–2025. PMID:20069826. doi:10.1603/029.102.0601.

Tabashnik BE, Brévault T, and Carrière Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature Biotechnology*, 31: 510–521. PMID:23752438. doi:10.1038/nbt.2597.

Tian J-C, Collins HL, Romeis J, Naranjo SE, Hellmich RL, and Shelton AM. 2012. Using field-evolved resistance to Cry1F maize in a lepidopteran pest to demonstrate no adverse effects of Cry1F on one of its major predators. *Transgenic Research*, 21: 1303–1310. PMID:22373893. doi:10.1007/s11248-012-9604-4.

Tian J-C, Wang X-P, Long L-P, Romeis J, Naranjo SE, Hellmich RL, et al. 2013. Bt crops producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F do not harm the green lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. *PLoS ONE*, 8: e60125. PMID:23544126. doi:10.1371/journal.pone.0060125.

Van Lenteren JC, and Bueno HPV. 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *Biological Control*, 48: 123–139. doi:10.1023/A:1022645210394.

Venugopal PD, Coffey PL, Dively GP, and Lamp WO. 2014. Adjacent habitat influence on stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) densities and the associated damage at field corn and soybean edges. *PLoS ONE*, 9: e109917. PMID:25295593. doi:10.1371/journal.pone.0109917.

- Walker DR, All JN, McPherson RM, Boerma HR, and Parrott WA. 2000. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 93: 613–622. PMID:10902306. doi:10.1603/0022-0493-93.3.613.
- Wenes A-L, Bourguet D, Andow DA, Courtin C, Carré G, Lorme P, et al. 2006. Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity*, 97: 127–134. PMID:16705321. doi:10.1038/sj.hdy.6800845.
- Xiao Y, Dai Q, Hu R, Pacheco S, Yang Y, Liang G, et al. 2017. A single point mutation resulting in cadherin mislocalization underpins resistance against *Bacillus thuringiensis* toxin in cotton bollworm. *Journal of Biological Chemistry*, 292: 2933–2943. PMID:28082675. doi:10.1074/jbc.M116.768671.
- Yang F, Kerns D, and Huang F. 2015. Refuge-in-the-bag strategy for managing insect resistance to Bt maize. *Outlooks on Pest Management*, 26: 226–228. doi:10.1564/v26_oct_10.
- Yu H, Li Y, Li X, Romeis J, and Wu K. 2013. Expression of Cry1Ac in transgenic Bt soybean lines and their efficiency in controlling lepidopteran pests. *Pest Management Science*, 69: 1326–1333. PMID:23564718. doi:10.1002/ps.3508.
- Yu X-D, Liu Z-C, Huang S-L, Chen Z-Q, Sun Y-W, Duan P-F, et al. 2016. RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Management Science*, 72: 1090–1098. PMID:26888776. doi:10.1002/ps.4258.
- Yuan X, Zhao M, Wei J, Zhang W, Wang B, Khaing MM, et al. 2017. New insights on the role of alkaline phosphatase 2 from *Spodoptera exigua* (Hübner) in the action mechanism of Bt toxin Cry2Aa. *Journal of Insect Physiology*, 98: 101–107. PMID:28034678. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.12.004.
- Zalucki MP, Furlong MJ, Schellhorn NA, Macfadyen S, and Davies AP. 2015. Assessing the impact of natural enemies in agroecosystems: toward “real” IPM or in quest of the Holy Grail? *Insect Science*, 22: 1–5. PMID:25205315. doi:10.1111/1744-7917.12172.
- Zeilinger AR, Olson MD, and Andow AD. 2016. Competitive release and outbreaks of non-target pests associated with transgenic Bt cotton. *Ecological Applications*, 26: 1047–1054. PMID:27509747. doi:10.1890/15-1314.
- Zhao JH, Ho P, and Azadi H. 2011. Benefits of Bt cotton counterbalanced by secondary pests? Perceptions of ecological change in China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 173: 985–994. PMID:20437270. doi:10.1007/s10661-010-1439-y.

SALLES, S.; PAVANI, F.; FIUZA, L. Ocorrência de *Campoletis Flavicincta* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* coletadas no município de Cachoeirinha- RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 8, 2013, Santa Maria. Anais... Santa Maria: Park Hotel Morotin, 2013. p. 35-36

OCORRÊNCIA DE *CAMPOLETIS FLAVICINCTA* EM LAGARTAS DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* COLETADAS NO MUNICÍPIO DE CACHOEIRINHA/RS

Silvia Martins de Salles ; Fernanda Pavani ; Neiva Knaak ; Diouneia Lisiane Berlitz ; Jaime Vargas de Oliveira ; Lidia Mariana Fiuza

Palavras-chave: controle biológico, inimigos naturais, endoparasitoide, lagarta-da-folha.

INTRODUÇÃO

O cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) denota grande importância econômica para o Brasil: sua produção na safra 2012/2013 alcançou 11,9 milhões de toneladas, ou seja, 2,8% maior do que o volume colhido na safra anterior. A Região Sul produziu em torno de 9,1 milhões de toneladas, o que representa 76,6% da estimativa total de produção (CONAB, 2013), embora o cultivo de arroz sofra com o ataque de insetos fitófagos, os quais ocorrem com alta frequência nas principais regiões produtoras. (MARTINS, 2004).

Spodoptera frugiperda, a lagarta-da-folha, é classificada como o principal inseto-praga de vinte e três famílias de gramíneas, ocasionando perdas significativas à cultura do arroz desde a fase vegetativa, alimentando-se das folhas e dos colmos e podendo destruir totalmente a cultura. (CRUZ, 1995). O controle natural da praga ocorre pela ação de inimigos naturais, que são importantes ao agroecossistema pela sua especificidade na escolha do hospedeiro, e conseqüentemente, pela redução da população. Entre os inúmeros parasitoides de *S. frugiperda*, destaca-se o *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae), considerado um dos principais endoparasitoides de lagartas de *S. frugiperda*. O himenóptero completa todo seu ciclo ao alimentar-se do conteúdo interno do hospedeiro, passando posteriormente à fase de pupa, ao final do ciclo e, em substituição ao adulto de *S. frugiperda*, tem-se o adulto do parasitoide (CRUZ, 1995). Apesar da importância deste himenóptero, pouco se conhece

sobre sua distribuição no Estado do Rio Grande do Sul. (DEQUECH, 2004). Nesse contexto, este trabalho se concentra em avaliar a ocorrência de parasitismo por *C. flavicineta* nas lagartas de *S. frugiperda* coletadas a campo.

MATERIAL E MÉTODOS

As lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas nos anos agrícolas de 2010/2011 e de 2011/2012, em agroecossistemas orizícolas pertencentes ao Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA), no município de Cachoeirinha/RS. No primeiro ano, efetuou-se a coleta em uma única área, em dezembro. No segundo ano, utilizaram-se duas áreas e ocorreram três coletas, de dezembro a janeiro. As lagartas coletadas foram acondicionadas em frascos com dieta artificial de Poitout (POITOUT; BUES, 1970) e mantidas no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). Os insetos permaneceram em BOD a 25°C, em 12 h de fustofase e 65% de umidade relativa até a formação de crisálidas do lepidóptero ou da pupa do parasitoide.

As crisálidas de *S. frugiperda* foram inseridas na criação massal do laboratório. As pupas características de *Campoletis flavicineta* foram acondicionadas nas mesmas condições descritas até a emergência do adulto. Os exemplares foram identificados com auxílio de chaves dicotômicas pelos pesquisadores do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da UNISINOS, e com a confirmação da espécie, foram inseridos na criação dos parasitoides no referido local.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de lagartas de *S. frugiperda* coletadas em campo foi correspondente a 537 indivíduos, apesar de o número total de insetos ter variado nos anos agrícolas; já o percentual médio de parasitoides obtidos em laboratório foi de 13,5%, sendo que a espécie *Campoletis flavicineta* representou em média 81,9% dos parasitoides obtidos em Laboratório (como ilustra a Tabela 1).

Tabela 1. Índice de parasitismo e porcentagem de fêmeas e machos de *C. flavicineta* em lagartas de *S. frugiperda* coletadas em agroecossistemas do Rio Grande do Sul.

Coletas/ano agrícola	Nº de lagartas <i>S. frugiperda</i> (nº)	Total de parasitoides %	Representantes da espécie <i>C. flavicineta</i> %	Fêmeas %	Machos %
1º 2010/2011	201	15,2	63,3	19	81
2º 2011/2012	159	30,1	97,8	14,6	85,4
3º 2011/2012	133	2,25	66,6	0	100
4º 2011/2012	44	6,8	100	66,6	33,4
Médias das Avaliações	134,25	13,5	81,9	25,05	74,5

Resultados semelhantes foram encontrados por Dequech (2001), que atingiu índice médio de 18,11% de lagartas naturalmente parasitadas, e 69,95 % em média eram representantes da espécie *C. flavicineta*. Considerando-se o percentual de parasitismo de *C. flavicineta*, infere-se esse parasitoide como o principal inimigo natural de lagartas de *S. frugiperda* em Cachoeirinha/RS. Alguns trabalhos citam o alto índice de parasitismo por *C. flavicineta* em lagartas de *S. frugiperda* em campo, confirmando a abundância do parasitoide em áreas de cultivo agrícola que atraem a lagarta-da-folha. Entre as coletas do parasitoide, houve predominância de machos (como apontou a Tabela 1), diferindo do trabalho de Dequech (2004), no qual se constatou o predomínio de fêmeas (54,5%), nas coletas de *S. frugiperda* em áreas de milho circundadas por áreas orizícolas gaúchas.

CONCLUSÃO

Os resultados parciais apresentados neste trabalho evidenciaram a importância do parasitoide *C. flavicineta* no controle natural de *S. frugiperda*, como a espécie de parasitoide mais abundante no agroecossistema em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Comparativo de Área, Produtividade e Produção. Porto Alegre, 2013. Disponível em: www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_06_06_09_09_27_boletim_graos_-_junho_2013.pdf . Acesso em: junho. 2013.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. 45p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 21).

DEQUECH, S.T.B. et al. Levantamento de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) na região de Cachoeirinha, RS. In: VII SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas, MG. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. p.294.

DEQUECH, S.T.B. et al. Ocorrência de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)(Lep., Noctuidae) em lavouras de milho em Cachoeirinha, RS. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p.1235-1237, 2004.

POITOUT, S. et al. Élevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel rche et sur milieu simplifié. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, v.2, n.1, p.71-91, 1970.

MARTINS, J.F. et al. Descrição e manejo integrado de insetos-praga em arroz irrigado. *Embrapa informação Tecnológica*, Brasília. , p 635-675. 2004.

SALLES, S.; PINTO, L.; FIUZA, L. Avaliação da Abundância de Insetos da Ordem Lepidoptera Coletados em Campo no Cultivo de Soja-Bt (Cry1Ac) e Não-Bt. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 25, Goiânia. Anais... Goiânia: Centro de Convenções, 2014.

AVALIAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE INSETOS DA ORDEM LEPIDOPTERA COLETADOS A CAMPO NO CULTIVO DE SOJA *Bt* (CRY1AC) E NÃO *Bt*.

Silvia. M. Salles¹; Laura. M. Pinto¹; Lidia. M. Fiuza^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia, Laboratório de Microbiologia, Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), CEP: 93001-970 Caixa Postal 275. São Leopoldo, RS, Brasil. E-mail: silviamsalles@hotmail.com

A soja (*Glycine max*) contempla uma das culturas mais importantes para a economia mundial. O sucesso na expansão da leguminosa no território brasileiro ocorreu também pelo desenvolvimento de variedades transgênicas, como a soja *Bt*, resistente a espécies de insetos da ordem Lepidoptera. As formas jovens dessa ordem (lagartas) podem incidir durante todo o desenvolvimento da planta, afetando assim a produtividade da soja. As lagartas alimentam-se tanto do limbo quanto das nervuras foliares, podendo causar o desfolhamento total das plantas e acarretar perdas na produtividade de até 75%. Nesse panorama, este estudo teve como objetivo comparar a abundância de insetos da ordem Lepidoptera, coletados a campo, no cultivo de soja *Bt* (Cry1Ac) e não *Bt* (controle). O estudo foi conduzido em uma propriedade rural situada em Dom Pedrito/RS, no ano agrícola de 2013/2014, em que se executaram duas coletas de insetos na cultura de soja *Bt* Intacta TMRR2 PROT^M, modificada com o gene Cry1Ac da bactéria inseticida *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), e não *Bt*. As amostras foram obtidas através do método de pano-de-batida, totalizando dez pontos em zigue-zague por amostra. Os resultados obtidos desvelaram que, na primeira coleta, a abundância de insetos total foi menor na soja *Bt*. Além disso, houve predominância de insetos representantes da ordem Lepidoptera, tanto na soja não *Bt* (98,1%) quanto na soja *Bt* (60%). Na segunda amostragem, foram coletados 410 insetos na área controle, sendo 97,7 % lepidópteros. Na área plantada com soja *Bt*, dos 107 insetos coletados, 57,7% foram identificados como lepidópteros, indicando predominância dessa ordem em ambos os cultivares. Os dados do presente trabalho apuraram alta efetividade do cultivar de soja *Bt* (Cry1Ac) no controle de lepidópteros.

Palavra- chave: Soja *Bt*, lepidópteros, *Bacillus thuringiensis*

SALLES, S. et al. *Diversidade de lepidópteros em áreas de cultivo de soja Bt e não Bt. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 7, 2015, Florianópolis. Anais... Florianópolis: Centro de Convenções Centro Sul, 2015*

DIVERSIDADE DE LEPIDÓPTEROS EM ÁREAS DE CULTIVO DE SOJA

Bt e NÃO Bt

Salles, S.M.¹; Dos Anjos, F.¹; Pinto, L.²; Fiuza, L.³

Universidade do Vale do Rio dos Sinos– Unisinos, São Leopoldo- RS, silviamssalles@hotmail.com1, Unisinos.

A produção nacional de soja no ano agrícola 2013/2014 alcançou 86.273,2 mil toneladas, representando incremento de 5,9% em relação à safra 2012/2013. (CONAB, 2014). Contudo, alguns fatores seguem como limitantes da produção, dentre os quais, os insetos-praga, com destaque às lagartas, que se alimentam tanto do limbo como das nervuras foliares e das vagens, podendo causar desfolhamento total e ocorrer durante todo o desenvolvimento da planta, ocasionando perdas na produtividade de até 75%. (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

O sucesso na expansão da leguminosa no território brasileiro se deu também pelo desenvolvimento de variedades resistentes a algumas pragas que afetam a cultura. A comercialização de plantas *Bt* aplicadas no manejo dos insetos se tornou uma ferramenta importante para os programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (ROMEIS et al., 2008). Nessa perspectiva, a avaliação do risco de resistência das pragas-alvo e não alvo da soja *Bt* se mostra de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de Manejo da Resistência de Insetos (MRI).

A hipótese do presente estudo é que há menor abundância e diversidade de lepidópteros em área de soja *Bt*, quando comparado com a soja não *Bt*. O objetivo do trabalho foi identificar e avaliar a diversidade dos lepidópteros presentes na área cultivada com soja *Bt*. Os ensaios de campo foram conduzidos de acordo com o zoneamento agrícola para cultura de soja na microrregião 101 (SOMMER et al., 2013), no município de Dom Pedrito/RS(S 31°13'51.7''W 54°37'53.3'').

O experimento foi avaliado no ano agrícola 2013/2014, em que as cultivares foram semeadas (48 kg.ha-1), por meio de semeadoras de plantio direto, com espaçamentos de 50 cm entre linhas, com o objetivo de estabelecer a população de

quatorze plantas por metro e 280.000.ha⁻¹, seguindo as indicações de cada cultivar.

O manejo da lavoura foi realizado em conformidade com as informações técnicas para cultura (EMBRAPA, 2014). Práticas agronômicas convencionais foram seguidas para aumentar a produtividade, como a utilização de fertilizantes basal 200 kg.ha⁻¹ de N(2) P(23) K(23). Não ocorreu a aplicação de inseticidas nas parcelas experimentais durante a época de cultivo, e o herbicida foi aplicado na quantidade de 3L.ha⁻¹ (Roundup Wg®), quinze dias antes da emergência e após a emergência (1,5L.ha⁻¹).

As áreas para cada tratamento (soja *Bt* e não *Bt*) foram compostas por quatro parcelas de 15/20 m, totalizando 1.200 m² para cada tratamento, instaladas respeitando 800 m de distância. As amostras foram obtidas por meio do método de amostragem pano-de-batida vertical, compostas por dez pontos em zigue-zague (GALLO et al., 2002), totalizando quatro repetições por tratamento, obtidos quinzenalmente entre janeiro e fevereiro.

Posteriormente, as amostras foram individualizadas e acondicionadas em frascos plásticos com tampa, em solução de etanol a 70% e, em seguida, enviadas ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), onde se efetuaram a quantificação e a identificação taxonômica dos insetos, por meio de um estereomicroscópio (80X), com o auxílio de chaves dicotômicas de identificação, segundo preconizam Stehr (1987) e Czapak et al. (2014). Os espécimes não identificados foram enviados a especialistas da ordem Lepidoptera.

A área cultivada com soja não *Bt* (controle) evidenciou maior abundância de lepidópteros nas quatro amostragens realizadas (n=543), quando comparada com a soja *Bt* (n=68), indicando alta efetividade da soja *Bt* no controle de insetos desta ordem. Os dados se apresentam na Tabela 1. Na área de soja não *Bt*, a espécie *Anticarsia gemmatalis* revelou maior abundância, representando 69% dos lepidópteros identificados (como exibe a Figura 1), seguida de *Chrysodeixis includes* (29%) e de *Spodoptera* sp. (3,3%). Na área de soja *Bt*, o gênero *Spodoptera* sp. teve predominância (98%) - resultado que pode indicar a possível resistência de lagartas do gênero *Spodoptera* às proteínas Cry presentes na soja geneticamente modificada (soja *Bt*).

Tabela 1. Abundância de lepidópteros em soja *Bt* e não *Bt* avaliada em quatro coletas no ano agrícola 2013/2014.

Abundância (n)				
Tratamentos	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Soja não <i>Bt</i>				
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	25	29	74	247
<i>Chrysodeixis includens</i>	0	16	56	78
<i>Spodoptera</i> sp.	3	1	6	8
Soja <i>Bt</i>				
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	0	0	0	0
<i>Chrysodeixis includens</i>	0	0	1	0
<i>Spodoptera</i> sp.	0	0	9	58

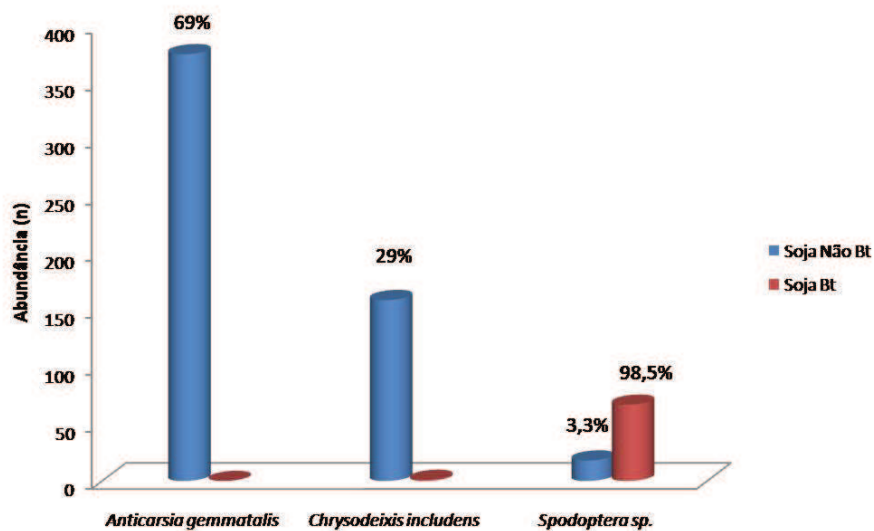


Figura 1. Abundância de lepidópteros em área de soja *Bt* e Não *Bt* em coletas no ano agrícola 2013/2014.

REFERÊNCIAS

- CONAB. Acompanhamento da safra Brasileira. Companhia Nacional de Abastecimento, Porto Alegre, 04 de Agosto, de 2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_07_09_09_36_57_10_levantamento_de_graos_julho_2014.pdf. Acesso em: 04 de agosto 2014.
- CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.; PALMA, J. Morfologia e Bioecologia de Noctuídeos (Lepidoptera: Noctuidae) de Importância agrícola. Universidade Federal de Goiás: Escola de Agronomia, p.22, 2014.
- EMBRAPA. 40ª Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul Seminário Técnico De Soja, Pelotas. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2014/julho/reuniao-soja/arquivos/.pdf>. Acesso em: 08 Agost. 2014, 2014.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002.
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.; OLIVEIRA, J.L.; SOSA-GÓMEZ, R.D.; PANIZZI, R.A.; CORSO, C.I.; GAZZONI, L.D.; OLIVEIRA, B.E. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja, 2000.p.70. (EMBRAPA. Circular Técnica, n. 30).
- ROMEIS, J.;SHELTON, A.M.; KENNEDY, G.G.; Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Dordrecht, Springer,p.441, 2008.
- Shelton, A.M.; Zhao, J.Z.; Roush, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bttransgenic plants. Annu.Rev. Entomol.v. 47, p. 845–881, 2002.
- SOMMER, V.; KEHL, K.; HENNIGEN, J. Desempenho De Cultivares De Soja Indiadas Para o Rio Grande Do Su.l. Passo Fundo, Julho, de 2013.http://www.farsul.org.br/arquivos/Indica%C3%A7%C3%A3o_cultivares.pdf. Acessoem: 06 Jun. 2014, 2013.
- STEHR, F.W.Order Lepidoptera. In:Stehr, F.W.(ed.) Immature insects, p.754, 187.