

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

Efeito de milho transgênico sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879
(Hymenoptera: Trichogrammatidae)

Daniel Spagnol

Pelotas, 2013

Daniel Spagnol

**Efeito de milho transgênico sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879
(Hymenoptera: Trichogrammatidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área do conhecimento: Entomologia).

Orientador: Anderson Dionei Grützmacher

Pelotas, 2013

Catálogo na fonte

Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

S732e Spagnol, Daniel

Efeito de milho transgênico sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) / Daniel Spagnol; Anderson Dionei Grützmacher, orientador. - Pelotas, 2013.

103 f. : il

Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1. Parasitoide de ovos. 2. Manejo integrado de pragas. 3. Controle biológico. 4. *Zea mays*. 5. Eventos transgênicos. I. Grützmacher, Anderson Dionei, (orientador). II. Título

CDD 633.15

Daniel Spagnol

Efeito de milho transgênico sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879
(Hymenoptera: Trichogrammatidae)

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Fitossanidade (área do conhecimento: Entomologia) do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas.

Data de Defesa: 05/03/2013

Banca examinadora:

Dr. Anderson Dionei Grützmacher (Orientador)
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP.

Dr. Dori Edson Nava
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP.

Dr. Fernando Felisberto da Silva
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio grande do Sul – UFRGS.

Dr. José Francisco da Silva Martins
Doutor em Entomologia pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP.

A Deus, pela proteção e iluminação durante todos os momentos;
Aos meus pais Iraci e Danir, minha irmã Elaine pelo apoio incondicional, amor e
dedicação de suas vidas ao longo de minha formação pessoal e profissional.

Dedico.

Agradecimentos

Ao Dr. Anderson Dionei Grützmacher, Professor Associado do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas (DFs/FAEM/UFPel) pela orientação, paciência, confiança e amizade concedidos no decorrer de toda a Graduação e Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs) da FAEM/UFPel, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos para realização do curso de Mestrado.

A Embrapa Clima Temperado pela disponibilização de estrutura física para a realização de parte dos trabalhos.

Aos professores do PPGFs, da FAEM/UFPel, em especial a Alci Enimar Loeck, Marcos Botton, Mauro Silveira Garcia e Uemerson Silva da Cunha pelos ensinamentos e amizade transmitidos durante o curso.

Aos professores e pesquisadores colaboradores do PPGFs, em especial á Dra. Ana Paula Schneid Afonso da Rosa da Embrapa Clima Temperado, pela disponibilização de estrutura, atenção dispensada e ensinamentos.

Ao amigo e colega de pesquisa mestrando Rafael Antonio Pasini pelo inestimável auxílio na condução dos trabalhos, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Aos amigos, Dr. Getúlio Jorge Stefanello Jr, Dr. Moisés João Zotti, Dr. Sandro Nörnberg, doutorandos Henrique de Souza Luche, Luisa Siede Kuck, Rodolfo Vargas Castilhos e Thiago Della Nina Idalgo, mestrandos Carolina Custódio Pinto, Cindy Chaves, Germano Tessmer Bütow e Wanessa Scopel pela amizade, incentivo diário, companheirismo e auxílio na condução dos trabalhos.

Aos colegas e amigos, em especial a Dra. Mariane Rosenthal, Eng. Agr. MSc. Leandro Kruger, Eng. Agr. MSc. Márcio Bartz das Neves, Eng. Agr. MSc. Daniel Rutz e Eng. Agr. Jardel Casaril pelo auxílio na condução dos trabalhos, confiança depositada e incentivo na realização do Mestrado.

Aos dedicados bolsistas e estagiários do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas “LabMIP UFPel”, Andréia Normberg, Felipe Freire Friedrich, Franciele De Armas, Juliane Wille, Helbert Carvalho, Ronaldo Zantedeschi, Stefânia Pires pela dedicação e amizade. Agradeço ainda aos ex-bolsistas e estagiários Anderson Gauer, Cleiton Gauer, Isac Heres Lopes, Letícia Christoff, Luis Fernando Paulus, Marcelo Zimmer, Nassan Fagundes Guimarães, Rafael dos Anjos e Silvia Letícia Silva Paz Maich pelo auxílio e amizade.

Aos demais colegas do Departamento de Fitossanidade, bolsistas e funcionários, pela amigável convivência que sempre recordarei.

A banca examinadora composta pelo Dr. Dori Edson Nava, Dr. Fernando Felisberto da Silva e Dr. José Francisco da Silva Martins pela amizade e por se dispuserem sem medir esforços a participar como membros na banca examinadora desse trabalho de conclusão do curso de Mestrado.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu sincero abraço e muito obrigado.

Resumo

Spagnol, Daniel. **Efeito de milho transgênico sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2013. 103f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A utilização de plantas de milho transgênicas ou plantas geneticamente modificadas que expressam genes com atividade inseticida consiste em uma nova alternativa para o controle de insetos-praga, além de estar em adequação com os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Como as proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bacillaceae) são expressas em altas dosagens nos tecidos verdes das plantas geneticamente modificadas, podem ser expressas nas folhas, caule (seiva), pólen e em outras partes da planta, podendo afetar inimigos naturais de forma direta e indireta. A preservação dos inimigos naturais de insetos-praga é uma das práticas de maior importância no MIP, devendo ser incentivado o uso de agrotóxicos seletivos e ferramentas tecnológicas com o mínimo de impacto a estes organismos benéficos, a fim de viabilizar a associação dos métodos biotecnológicos e biológicos. Nesse contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de 10 híbridos de milho transgênico sobre a fase adulta do parasitoide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas), utilizando-se de adaptação da metodologia padronizada pela “International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants” (IOBC). Na primeira etapa os bioensaios consistiram na exposição de adultos (estágio mais sensível) do parasitoide a folhas, caule (seiva) e pólen, das plantas de milho transgênicas e seus respectivos materiais isogênicos (não transgênicos) colocados sobre placas de vidro. Estas foram utilizadas como fundo e cobertura na confecção de gaiolas de exposição, as quais foram introduzidos os insetos-teste. A redução na capacidade de parasitismo dos tratamentos foi comparada com a testemunha negativa (água destilada) e utilizada para classificar os híbridos em quatro classes: 1, inócuo ($<30\%$); 2, levemente nocivo ($30-79\%$); 3, moderadamente nocivo ($80-99\%$) e 4, nocivo ($>99\%$), conforme recomendação da IOBC. Os 10 híbridos de milho transgênico e seus isogênicos testados nos bioensaios expondo folha, caule e pólen a *T. pretiosum*; adaptando-se a metodologia da IOBC, foram assim classificados: AG 8011YG (Cry1Ab), BG 7060Y (Cry1Ab), AS 1551 YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry2Ab2), DKB330YG (Cry1Ab), DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 - EPSPS), 30F53H (Cry1F PAT), 32R48H (Cry1F PAT), Status TL (Cry1Ab PAT), Status Viptera (VIP3Aa20), são inócuos (classe 1) a adultos de *T. pretiosum*. Na segunda etapa efetuaram-se bioensaios para determinar o efeito do pólen de milho transgênico em fêmeas de *T. pretiosum*. Os experimentos foram conduzidos em laboratório (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Fêmeas recém-emergidas de *T. pretiosum* foram individualizadas em tubos de Duran, contendo como substrato alimentar mel acrescido de pólen dos respectivos híbridos de milho.

Analizaram-se os seguintes parâmetros biológicos: longevidade, parasitismo total, viabilidade de emergência e razão sexual. Dos sete tratamentos avaliados, nenhum foi prejudicial ao desenvolvimento de fêmeas de *T. pretiosum*. Os híbridos transgênicos: AG 8011YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry 2Ab2) e Status Viptera (VIP3Aa20); assim como seus respectivos isogênicos não possuem efeitos sobre a longevidade, parasitismo total, viabilidade de emergência e razão sexual de *T. pretiosum*.

Palavras-chave: Parasitoide de ovos. Controle Biológico. Eventos transgênicos. *Bacillus thuringiensis*. Manejo Integrado de Pragas. *Zea mays*.

Abstract

Spagnol, Daniel. **Effect of transgenic corn plants on *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2013. 103f. Dissertation (Master Degree) - Program of Post-Graduation in Crop Protection. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The transgenic varieties of corn containing insecticidal activity genes it's a new alternative for insect's control, and also are in agreement with Integrated Pest Management (IPM) philosophy. Once *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bacillaceae) proteins are expressed in high doses on green tissues of transgenic plants, it can be expressed on leaves, stalk (sap), pollen and other parts, which can directly and indirectly affect natural enemies of pests. Preservation of pests' natural enemies it's important on IPM, and the use selective pesticides and less impactful technologies should be encouraged in order to achieve a biotechnological and biological control association. In this sense, this work aimed to assess the effect of 10 transgenic corn hybrids on adults of the parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in laboratory conditions (temperature of $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity of $70\pm 10\%$ and 14 hours photophase) using an adaptation of "International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants" (IOBC) guideline. On first step of tests, adults (more sensitive stage) were exposed to leaves, stalk (sap) and pollen of transgenic corn plants and their respective isogenic (non transgenic) placed on glass plates. The glass plates were used as bottom and coverage of exposure cages, where the insects were introduced. The reduction on parasitism capacity caused by treatments was compared with the control (distilled water) and used to group the hybrids onto four categories 1, harmless ($<30\%$); slightly harmful ($30-79\%$); 3, moderately harmful ($80-99\%$) and 4, harmful ($>99\%$), according to recommendation from IOBC. The 10 transgenic corn hybrids and their respective isogenic tested on leaf, stalk and pollen exposure were: AG 8011YG (Cry1Ab), BG 7060Y (Cry1Ab), AS 1551 YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry2Ab2), DKB330YG (Cry1Ab), DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 - EPSPS), 30F53H (Cry1F PAT), 32R48H (Cry1F PAT), Status TL (Cry1Ab PAT), Status Viptera (VIP3Aa20), and all of them were harmless (category 1) to *T. pretiosum* adults. On the second step of the tests, the effect of three transgenic corn pollen on *T. pretiosum* females was assessed in laboratory bioassays (temperature of $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity of $70\pm 10\%$ and 14 hours photophase). Just emerged females were placed into Duran tubes containing honey + pollen of corn hybrids for feeding and biological parameters such as longevity, total parasitism, emergency rate and sexual ratio were evaluated. No treatment (diets) was detrimental to *T. pretiosum* females development. No effects on longevity, total parasitism, emergency rate and sexual ratio were observed for the transgenic hybrids AG 8011YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry 2Ab2) and Status Viptera (VIP3Aa20) and their respective isogenic hybrids.

Key-words: Egg parasitoid. Natural enemy. Transgenic events. Expressed proteins. Integrated Pest Management. *Zea mays*.

Lista de figuras

Capítulo 1

- Figura 1 Detalhes da criação do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* e de *Trichogramma pretiosum*. A) Criação da fase imatura de *A. kuehniella* em bandejas, com farinha de trigo e levedo de cerveja; B) Bandejas contendo adultos de *A. kuehniella*; C) Inserção de adultos de *A. kuehniella* em gaiolas de PVC com telas; D) Parasitismo de ovos de *A. kuehniella* por *T. pretiosum*; E) Cartão com ovos de *A. kuehniella* não parasitados (claros) e ovos parasitados (escuros) para condução de bioensaios; F) Armazenamento de recipientes de vidro contendo cartões com ovos parasitados em câmaras BOD. Pelotas-RS, 2011/2012 42
- Figura 2 Detalhe da montagem das placas para preparação das gaiolas de contato. A) Partes da folha mediana de milho; B) Caule com corte distal disposto paralelamente a placa; C) Pólen de milho formando película sobre a placa. Abaixo fotos das gaiolas de contato montadas com partes da planta de milho. Pelotas-RS, 2011/2012..... 45
- Figura 3 Detalhes da condução dos bioensaios (seletividade/efeito). A) Pulverizador manual utilizado para aplicação da calda (testemunha positiva); B) Componentes utilizados na montagem da gaiola de exposição de *T. pretiosum* aos resíduos do inseticida e partes das plantas transgênicas a parasitoides de ovos; C) Detalhes do sistema de sucção de vapores tóxicos do interior da gaiola; D) Tubo de emergência contendo ovos de *Anagasta kuehniella* parasitados, adultos de *Trichogramma pretiosum* recém-emergidos e filetes de mel. Pelotas-RS. 2011/2012..... 48

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 4 | Detalhes da condução dos bioensaios de efeito de híbridos de milho transgênico. A) Tubo de emergência com ovos do hospedeiro alternativo e tubo de emergência escurecido para conectar nas gaiolas de exposição; B) Detalhe da oferta dos cartões contendo ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> ; C) Tubo de emergência conectado à gaiola; D) Detalhe do círculo com ovos de <i>A. kuehniella</i> ; E) Placas de Petri contendo cartões com ovos parasitados para contagem; F) Detalhe de um círculo com ovos de <i>A. kuehniella</i> parasitados (escuros) para contagem em microscópio estereoscópico. Pelotas-RS, 2011/2012..... | 52 |
|----------|--|----|

Capítulo 2

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Detalhes da condução dos bioensaios com <i>Trichogramma pretiosum</i> . A) Preparo dos cartões com goma arábica, lâmina perfurada, cartolina e ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> ; B) Ovos de <i>A. kuehniella</i> aderidos aos cartões no interior dos recipientes de vidro; C) Peneiramento do pólen das plantas de milho; D) Inserção dos círculos com 40 ovos de <i>A. Kuehniella</i> em tubos de Duran; E) Tubos de Duran contendo fêmeas de <i>T. pretiosum</i> e cartelas com ovos para parasitismo; F) Contagem dos ovos parasitados e adultos emergidos em lupa estereoscópica. Pelotas-RS, 2011/2012 | 79 |
| Figura 2 | Parasitismo diário e acumulado (número de ovos/dia) de <i>Trichogramma pretiosum</i> alimentado com mel acrescido de pólen de diferentes híbridos de milho transgênico e seus isogênicos..... | 83 |

Lista de Tabelas

Capítulo 1

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Híbridos de milho transgênico avaliados nos testes de seletividade para as fases adultas de <i>Trichogramma pretiosum</i> inscritos no Registro Nacional de Cultivares (RNC). Pelotas-RS, 2011/2012. | 43 |
| Tabela 2 | Cronograma de atividades para bioensaios de efeito com híbridos de milho transgênico a adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> . Pelotas-RS, 2011/2012..... | 49 |
| Tabela 3 | Número médio de fêmeas por gaiola e efeito da folha de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios I a V) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS, 2011/2012..... | 58 |
| Tabela 4 | Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do caule de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios VI a X) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS, 2011/2012..... | 63 |
| Tabela 5 | Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do polén de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios XI a XV) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução | |

| | |
|--|----|
| (%) na capacidade de parasitismo de adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de 25±1°C; umidade relativa de 70±10%, fotofase de 14horas). Pelotas-RS, 2011/2012..... | 69 |
|--|----|

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Híbridos de milho transgênico inscritos no Registro Nacional de Cultivares (RNC); provedores de pólen para os testes de efeito sobre parâmetros biológicos <i>Trichogramma pretiosum</i> . Pelotas/RS, 2011-2012 | 76 |
| Tabela 2 Efeito do pólen de híbridos de milho transgênico em parâmetros biológicos de <i>Trichogramma pretiosum</i> parasitando ovos de <i>Anagasta kuehniella</i> . Pelotas-RS, 2011/2012 | 81 |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1 Introdução Geral..... | 16 |
| 2 Revisão de Literatura | 21 |
| 2.1 Lepidopteros-praga na cultura do milho..... | 21 |
| 2.2 Controle biológico com <i>Trichogramma</i> | 22 |
| 2.3 Plantas Transgênicas..... | 23 |
| 2.4 Modo de ação das plantas transgênicas..... | 25 |
| 2.5 Impacto potencial das plantas geneticamente modificadas sobre a comunidade de insetos | 26 |
| 2.6 Efeitos sobre organismos não-alvo..... | 27 |
| 2.7 Seletividade de agrotóxicos a <i>Trichogramma pretiosum</i> e adaptação da metodologia da IOBC a cultivares de milho transgênico | 28 |
| 2.8 Efeito sobre parasitoides..... | 30 |
| 3 Metodologia Geral | 35 |
| 3.1 Criação e manutenção do material biológico para os bioensaios | 35 |
| 3.1.1 Cultivo das plantas de milho híbrido..... | 35 |
| 3.1.2 Hospedeiro alternativo <i>Anagasta kuehniella</i> | 35 |
| 3.1.3 Parasitoide <i>Trichogramma pretiosum</i> | 36 |
| 3.1.4 Preparo de cartões com ovos do hospedeiro <i>Anagasta kuehniella</i> | 36 |
| 3.2 Condução dos bioensaios com <i>Trichogramma pretiosum</i> | 36 |
| 3.1 Bioensaios com adultos | 37 |
| 3.2 Bioensaio envolvendo efeito do pólen de milho transgênico em fêmeas de <i>Trichogramma pretiosum</i> | 37 |
| 3.3 Análises estatísticas | 37 |
| 4 Capítulo 1 – Efeito de plantas de milho transgênico sobre adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) | 39 |
| 4.1 Introdução..... | 39 |
| 4.2 Material e Métodos | 41 |
| 4.2.1 Criação e manutenção do material biológico para os bioensaios | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2 Hospedeiro alternativo <i>Anagasta kuehniella</i> e preparo de cartões..... | 41 |
| 4.2.3 Parasitoide <i>Trichogramma pretiosum</i> | 42 |
| 4.2.4 Condução dos bioensaios..... | 43 |
| 4.2.5 Híbridos de milho avaliados..... | 43 |
| 4.2.6 Montagens das placas com partes da planta de milho..... | 44 |
| 4.2.7 Aplicação do inseticida (Lannate BR- testemunha positiva)..... | 45 |
| 4.2.8 Preparo das gaiolas de contato | 46 |
| 4.2.9 Tubos de emergência..... | 47 |
| 4.2.10 Liberação dos insetos em teste | 49 |
| 4.2.11 Oferta de ovos do hospedeiro para parasitismo | 50 |
| 4.2.12 Desmontagem das gaiolas | 50 |
| 4.2.13 Cálculo da população inicial do parasitoide..... | 51 |
| 4.2.14 Cálculo do parasitismo | 51 |
| 4.2.15 Análises dos dados e determinação das classes de toxicidade..... | 52 |
| 4.3 Resultados e Discussão | 53 |
| 4.3.1 Folha..... | 55 |
| 4.3.2 Caule..... | 61 |
| 4.3.3 Pólen..... | 66 |
| 4.4 Conclusão | 72 |
| 5 Efeito do pólen de milho transgênico sobre parâmetros biológicos de adultos de <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) . | 73 |
| 5.1 Introdução..... | 73 |
| 5.2 Materiais e Métodos | 75 |
| 5.2.1 Híbridos de milho transgênico avaliados..... | 75 |
| 5.2.2 Parasitismo de ovos do hospedeiro alternativo <i>Anagasta kuehniella</i> | 77 |
| 5.2.3 Obtenção do pólen de milho | 77 |
| 5.2.4 Preparo dos tratamentos (dietas) | 77 |
| 5.2.5 Execução do experimento | 78 |
| 5.2.6 Análise dos resultados obtidos | 78 |
| 5.3 Resultados e Discussão | 80 |
| 5.4 Conclusão | 85 |
| 6 Discussão Geral | 86 |
| 7 Conclusões Gerais..... | 89 |
| Referências | 90 |

1 Introdução geral

O milho caracteriza-se por ser uma cultura de destaque no cenário agrícola brasileiro, seja para utilização direta na alimentação animal e/ou indiretamente em outros produtos via processamento. Em 2011/12, a cultura do milho ocupou área aproximada de 14,8 milhões de hectares e contou com produção total em torno de 71,45 milhões de toneladas. Quanto a utilização de plantas transgênicas, o Brasil é o segundo maior usuário dessa biotecnologia (36,6 milhões de hectares) (JAMES, 2012), sendo que 13,5 milhões de hectares são destinados ao cultivo de milho transgênico (IBGE, 2012).

Alguns fatores, entretanto, são responsáveis pelo fracasso na obtenção de maiores produtividades, destacando-se o complexo de pragas associadas à cultura do milho, tanto em sua fase vegetativa quanto reprodutiva. De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT, 2012), há registros de 43 insetos e 26 doenças que atacam a cultura do milho da semeadura à pós-colheita, sem considerar o complexo de plantas daninhas que ocorrem nas lavouras.

Destacam-se entre os insetos, a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) durante a fase vegetativa e reprodutiva, e a lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) durante a fase reprodutiva, as quais causam danos diretos e indiretos à cultura e perdas significativas na produção, tanto nos aspectos quantitativos como qualitativos (RODRIGUES; SILVA, 2011).

O manejo fitossanitário em lavouras é de grande importância, visando minimizar os danos causados por pragas que podem interferir na produtividade da cultura. Para isso, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) dispõe de métodos de controle, que de maneira individual ou associada podem ser utilizados em diferentes níveis, seja para o controle de uma espécie, ou como estratégia de controle múltiplo de pragas em um sistema de produção, sendo esse o nível mais elevado do programa (KOGAN, 1998).

Com o advento da biotecnologia, foi desenvolvida uma nova tática de controle de pragas, que consiste nas plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos. Através de apuradas técnicas de laboratório, um gene de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Berliner, 1911) (Bacillaceae) foi introduzido em plantas de milho, dando origem ao milho geneticamente modificado, conferindo alto padrão de resistência da planta a algumas espécies de lepidópteros-praga (ARMSTRONG et al., 1995). O gene introduzido codifica a expressão de proteínas *Bt*, com ação inseticida, efetivas no controle de lepidópteros como *S. frugiperda* (LYNCH et al., 1999; BARRY et al., 2000; BUNTIN et al., 2001; HUANG et al., 2002).

A safra de grãos de 2008 e 2009 pode ser considerada um marco na produção de milho no Brasil, uma vez que foi autorizada, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a comercialização de sementes de milho geneticamente modificado com o gene *B. thuringiensis*. Essa foi a primeira vez os agricultores brasileiros puderam usufruir dessa tecnologia, que visa auxiliar o Manejo Integrado de Pragas (MIP) na cultura do milho (FRIZZAS, 2003).

A adoção desses vegetais pela agricultura culminou em intensas discussões científicas, que esbarram também em questões éticas e ideológicas sobre sua segurança ambiental e alimentar. Embora os pareceres técnicos, que levam em consideração o plantio, a segurança ambiental e alimentar, emitidos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBio), se demonstrem conclusivos quanto a inocuidade de interações nocivas a essas questões, ainda paira muita dúvida e incerteza, mesmo no meio científico (TREVISAN, 2010). Diante desse cenário, a entomofauna benéfica pode ser afetada desde a implantação da cultura, pois de acordo com Figueiredo (2004), o controle biológico natural na cultura do milho é significativo desde as primeiras semanas.

Sobre essa conjectura, Nodari e Guerra (2000) relataram que a discussão mundial sobre os riscos e impactos dos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) na saúde humana e animal e ao meio ambiente, bem como seus impactos socioeconômicos, estão longe de terminar, sendo que a quantidade de informação científica é insuficiente. Os mesmos autores afirmam que pouco se conhece sobre os efeitos diretos dos produtos dos transgenes em organismos, no solo e na água, e não são conclusivos os estudos sobre pássaros ou outros animais que consomem insetos que se alimentam de plantas transgênicas.

Diante disso, fazem-se necessários estudos dos organismos presentes na fauna local e que estejam associados direta ou indiretamente às culturas transgênicas, tenham sua biologia e etologia estudada sendo a transgênia levada em consideração. Aliado a essa premissa, também é necessário uma discussão com abordagens ecológicas, no qual os dados da biologia dos organismos avaliados sirvam de base á discussões dos possíveis impactos que o uso da tecnologia possa ocasionar ao meio ambiente (TREVISAN, 2010).

Dentre as espécies de inimigos naturais observadas na cultura do milho (DEQUECH, 2002; FIGUEIREDO, 2004), ressalta-se que uma variedade delas pode ser afetada por métodos de controle, das quais se destacam os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que além de sua ocorrência natural em milho (SÁ; PARRA, 1993; CRUZ, 1995) também já foi relatado como agente biológico para controle de pragas em várias culturas em diversos países (SMITH, 1996; HASSAN, 1997).

No Brasil, várias espécies de *Trichogramma* foram descritas (QUERINO; ZUCCHI, 2003) e vários foram os trabalhos realizados referentes a esse gênero (PARRA; ZUCCHI, 2004), entretanto a espécie *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é uma das mais utilizadas em liberações inundativas para o controle de lepidópteros-praga, cujo destaque se deu em 1990 com a introdução da espécie visando o controle biológico aplicado na cultura do tomateiro (PARRA et al., 2002), o qual tem sido incentivado não somente pela sua eficiência no controle de pragas ainda na fase de ovo, antes da eclosão de lagartas e ocorrência de danos à cultura, mas também pela sua fácil criação em laboratório sobre diferentes hospedeiros alternativos (PARRA, 1997).

Atualmente, a produção massal do parasitoide tem sido realizada por algumas empresas de controle biológico, as quais promovem o controle biológico aplicado em diversos sistemas de produção brasileiros. No entanto, ainda não existe uma padronização brasileira de procedimentos de pesquisa sobre técnicas experimentais para avaliar a seletividade ou efeito destas plantas transgênicas a inimigos naturais (parasitoides e predadores), principalmente em condições de laboratório, semi-campo e campo. Assim, necessita-se desenvolver para as condições do país metodologias padronizadas que sejam de baixo custo, relativamente rápidas e confiáveis. Problema similar também é enfrentado com os agrotóxicos (produtos fitossanitários ou pesticidas) utilizados no Brasil nas diferentes culturas. No entanto,

isso já é alvo de estudos, pois os agrotóxicos seletivos aos inimigos naturais são fundamentais às áreas de refúgio para retardar o problema de resistência das plantas transgênicas a insetos (STEFANELLO JÚNIOR, 2010).

Reconhecendo que nenhum teste isolado pode prover suficiente informação para classificar o efeito adverso de um agrotóxico (ou planta transgênica) em um organismo benéfico, o grupo de trabalho da “International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants” (IOBC), “West Palaearctic Regional Section” (WPRS) estabeleceu as metodologias de trabalho para avaliação da seletividade dos agrotóxicos a inimigos naturais, sendo *Trichogramma* escolhido como gênero-padrão dentre os parasitoides para a realização dos testes (HASSAN et al., 2000) devido à fácil criação e maior sensibilidade à agrotóxicos entre outras espécies de parasitoides da ordem Hymenoptera (HASSAN, 1998). De acordo com a metodologia para *Trichogramma*, os estudos quanto a seletividade dos agrotóxicos cumprem etapas para que possam ser indicados como inócuos ao parasitoide, compreendendo a fase de laboratório, onde são estudados sobre a fase adulta e imatura e laboratório/casa-de-vegetação para avaliação da persistência e campo.

No âmbito nacional, pesquisas sobre seletividade de agrotóxicos utilizando a metodologia da IOBC/WPRS na cultura do milho foram realizadas para a fase adulta e imatura; assim como a persistência de agrotóxicos sobre adultos de *T. pretiosum* (STEFANELLO JÚNIOR, 2007, 2010). Para as fases imatura e adulta de *Trichogramma atopovirilia* (Oatman & Platner, 1983) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) tem-se trabalhos de Maia (2009). Embora Goulart (2007) também tenha avaliado tais fases sobre *T. pretiosum* e *Trichogramma exiguum* (Pinto & Platner, 1978) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), situação que priorizou diferentes hospedeiros e não uma cultura em especial.

Baseado nos testes da IOBC, descritos acima, testando agrotóxicos sobre inimigos naturais, pode se adaptar estas metodologias para testar partes das plantas transgênicas de milho (folhas, caule (seiva) e pólen). Nesta sequência de avaliações, as metodologias devem ser testadas nas condições brasileiras, já que dispomos de uma diversidade de inimigos naturais e muitas cultivares de milho transgênicas em estudo, considerando a grande extensão territorial do Brasil. Dessa forma, o País poderá ter grandes benefícios ao proteger a sua biodiversidade utilizando plantas transgênicas seletivas a inimigos naturais.

Nessa perspectiva, este trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes partes de híbridos de milho transgênico: folha, caule e pólen; assim como as respectivas partes dos isogênicos (não transgênico) sobre a fase adulta de *T. pretiosum* em laboratório, utilizando-se de uma adaptação da metodologia preconizada pelo grupo de trabalho da IOBC/WPRS. Além disso, se avaliou o efeito da ingestão do pólen de três diferentes híbridos de milho transgênico, expressando diferentes proteínas tóxicas sobre os parâmetros biológicos do parasitoide.

2 Revisão de literatura

A cultura do milho está sujeita ao ataque de um grande número de espécies de insetos durante todo seu ciclo, sendo principalmente da Ordem Lepidoptera os agentes desfolhadores que provocam os danos mais consideráveis, durante todos os estádios fenológicos dessa cultura.

O controle dessas pragas vem se tornando cada vez mais difícil, e o controle biológico, nesse contexto, aliado a novas alternativas biotecnológicas, como a utilização de plantas geneticamente modificadas e controle químico, apresenta-se como uma alternativa viável. No entanto, é necessário conhecer o possível efeito dessas ferramentas biotecnológicas sobre esses inimigos naturais, através de protocolos padronizados, que em laboratório se aproxime das condições de campo.

2.1 Lepidópteros-praga na cultura do milho

Na cultura do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) popularmente denominada de lagarta-do-cartucho, tem se destacado em função dos altos níveis de perda que acarreta à cultura. Devido à diversidade e disponibilidade de hospedeiros o ano todo, e das condições de clima favoráveis ao inseto, sua distribuição é geral em todas as regiões do território brasileiro, tendo sido relatado reduções nos rendimentos da cultura de 15 a 34% (RODRIGUES; SILVA, 2011).

Inicialmente as lagartas raspam as folhas, e posteriormente apresentam preferência por alojar-se no cartucho das plantas, embora possam também se estabelecerem nas espigas (MELO; MARTINS, 2000) e permitirem a introdução de agentes patogênicos ao perfurá-las (PINTO, 2005).

Dentre outras pragas, destaca-se também *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente denominado de lagarta-da-espiga. As perdas de produção são inferiores a 5% e são consequências do dano direto ao consumir grãos da ponta da espiga (GASSEN, 1996; GRÜTZMACHER et al., 2000;), também reduzem a fertilização ao atacar os estilo-estigmas, e o peso dos grãos

(RODRIGUES; SILVA 2011), colaborando para o surgimento de falhas nas espigas. A produção de milho-verde e milho-doce destinado à indústria, também tem requerido atenção devido ao ataque de *H. zea*, pois a espiga pode ser rejeitada pelo consumidor que exige um produto livre de pragas e sem grãos danificados (GRÜTZMACHER; MARTINS; CUNHA, 2000).

Os danos diretos devidos ao ataque de *H. zea*, ainda que sejam baixos, favorecem perdas superiores aos números citados em função dos danos indiretos propiciados pela praga. A instalação e desenvolvimento de agentes patogênicos nas espigas de milho podem ser favorecidos, além de outros fatores, pelo dano direto ainda na pré-colheita. Os grãos ardidos, reflexos das podridões de espigas, podem conter espécies de fungos toxigênicos com potencial de produzir micotoxinas em função de sua capacidade de biossíntese e das condições ambientais predisponentes. Consequentemente, as perdas qualitativas por grãos ardidos são motivos de desvalorização do produto e uma ameaça à saúde humana e animal (PINTO, 2005).

2.2 Controle biológico com *Trichogramma*

A presença de parasitoides, predadores e patógenos que exercem o controle biológico dos insetos-praga de importância agrícola é indispensável como fator de equilíbrio dinâmico nos agroecossistemas. Esses agentes de controle minimizam a necessidade de intervenção do homem no controle de pragas, mediante outros métodos de redução populacional de insetos (DEGRANDE; GOMEZ, 1990). Segundo Gravena (1992) o controle biológico é a principal tática do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Para algumas pragas de milho, como a *S. frugiperda* e *H. zea*, existem alternativas ao controle químico, como é o caso do controle biológico com parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* e do entomopatógeno *Baculovirus spodoptera*. Portanto, quando a opção for pelo controle químico, devemos preferir produtos mais seletivos e de menor impacto sobre o ambiente e animais (RODRIGUES & SILVA 2011).

O gênero *Trichogramma* tem distribuição mundial e são importantes principalmente por parasitarem ovos de lepidópteros. São conhecidas aproximadamente 160 espécies de *Trichogramma* em todo o mundo, sendo que na

América do Sul há 24 espécies e o maior número de espécies conhecidas encontra-se no Brasil. As espécies de *Trichogramma* estão associadas a 41 espécies de hospedeiros, distribuídas em 25 espécies de plantas hospedeiras. *T. pretiosum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é a espécie de distribuição mais ampla na América do Sul, além de ser o mais polífago, sendo associado a 26 espécies de hospedeiros (PINTO, 1997).

O parasitismo natural de ovos de *H. zea* por *Trichogramma atopovirilia* (Oatman & Platner, 1983) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *T. pretiosum* em lavouras de milho foi verificado por Tironi e Ciociola (1992). Os autores contabilizaram parasitismos de até 63,30% de ovos de *H. zea* presentes nos 18 estilo-estigmas das espigas de milho. Já Paron, Cruz e Ciociola (1998) observaram parasitismos de ovos de *H. zea* por *Trichogramma* que variaram de 34,1 a 62,4% para diferentes genótipos de milho, onde concluíram que não houve efeito dos genótipos na infestação de ovos do inseto-praga e do parasitóide. O parasitismo natural de ovos de *H. zea* por *T. pretiosum* também foi observado por Sá e Parra (1993) na cultura do milho, onde observaram taxas de parasitismo acima de 50,0%. Para *S. frugiperda* os autores observaram resultados de parasitismo inferiores a 20,0%, entretanto superiores aos encontrados por Beserra, Dias e Parra (2002) para *T. pretiosum* e *T. atopovirilia*, de somente 2,21%. Em liberações de *T. pretiosum* Sá e Parra (1993) obtiveram reduções de até 26,0% nos danos causados por *H. zea*.

Na cultura do milho, vários inseticidas químicos e biológicos em aplicação foliar estão sendo utilizados para o eficaz controle de *S. frugiperda* (TOSCANO et al., 2012). De forma que o controle químico pode estar associado ao controle biológico, sendo possível com pesticidas seletivos aos inimigos naturais, pois a combinação da toxicidade dos pesticidas aos insetos-praga associada à agilidade dos inimigos naturais para encontrar os hospedeiros, são estratégias que devem ser preconizadas para o (MIP).

2.3 Plantas Transgênicas

O século XX foi caracterizado por grandes descobertas que tiveram profundo impacto no melhoramento genético de plantas. Há muitos anos, as plantas cultivadas têm sido manipuladas geneticamente pelo homem, por meio do melhoramento clássico. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às

técnicas da engenharia genética. Nos últimos vinte e cinco anos, descobertas científicas, principalmente nas áreas de biologia celular e molecular, combinadas com avanços nas áreas de química e microeletrônica produziram novas tecnologias que, já na década de oitenta, modificaram todos os setores tecnológicos e industriais relacionados com a biologia, entre eles a agricultura. Depois de uma década e meia de seu lançamento comercial, cultivares geneticamente modificados (GM) tornaram-se componentes centrais de estratégias de manejo de pragas (JAMES, 2010).

Pela tecnologia do DNA recombinante, genes de praticamente qualquer organismo, podem ser isolados, caracterizados, modificados e transferidos para qualquer outro organismo que sob o comando de promotores adequados, se expressam em quantidades desejadas em células e tecidos específicos, sob um preciso controle temporal. Assim, eliminou-se as barreiras biológicas que isolaram os genomas, como consequência de milhões de anos de evolução.

Entre as estratégias de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, encontram-se *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bacillaceae)-(Bt), mais utilizada; além de colesterol oxidase; lectinas; inibidores de α -amilase; inibidores de proteinases; proteínas inseticidas vegetativas; quitinases; peroxidase; entre outras (CAROZZI; KOZIEL, 1997; LACERDA, 2010).

A grande maioria das plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos expressa genes derivados da bactéria *B. thuringiensis*. Insetos e *Bt* têm coexistido por milhões de anos, já que *B. thuringiensis* é uma bactéria que habita naturalmente o solo, é gram-positiva esporulante e anaeróbica facultativa. Além disso, é empregada há muitos anos como um inseticida microbiano por agricultores, e mais recentemente, é utilizada como nova ferramenta para o controle de pragas, por meio da sua expressão nas plantas transgênicas.

A área mundial com plantas geneticamente modificadas é de 170 milhões de hectares. Os quatro principais países em termos de área cultivada são os Estados Unidos da América (69,0 milhões de hectares), o Brasil (36,6 milhões de hectares), a Argentina (10,6 milhões de hectares), e o Canadá (10,4 milhões de hectares), sendo que as principais culturas são soja, o milho e o algodão (JAMES, 2012). Deste modo, plantas geneticamente modificadas que expressam genes com atividade inseticida representam uma nova alternativa para o controle de insetos, além de serem consistentes com a filosofia do (MIP).

Atualmente diversas culturas, tais como batata, fumo e canola têm sido modificadas geneticamente para expressar as proteínas derivadas de *B. thuringiensis*. Apesar dos benefícios, existem possíveis riscos relativos às plantas geneticamente modificadas, tais como a seleção de populações de insetos resistentes às proteínas *Bt*, a ocorrência de fluxo gênico com parentes silvestres relacionados com possível alteração na agressividade do genótipo; o impacto das proteínas *Bt* sobre as espécies não-alvo (inimigos naturais, pragas secundárias, insetos de solo, polinizadores) e os efeitos adversos na biodiversidade, no ecossistema e nas comunidades bióticas (WANG et al., 2004; FERRY et al., 2006). Deste modo, o assunto necessita ser visto com atenção perante a comunidade científica mundial.

2.4 Modo de ação das plantas transgênicas

A atividade entomopatogênica desse microrganismo (*Bt*) deve-se à presença de uma inclusão cristalina produzida durante a esporulação (pró-toxinas). O cristal, composto por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas cristal (Cry), tem ação extremamente tóxica e específica para larvas de insetos de algumas ordens, como Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, dependendo da proteína (MONNERAT; BRAVO, 2000).

As pró-toxinas quando ingeridas, são solubilizadas pelo pH alcalino do trato intestinal do inseto-alvo e clivadas pelas proteases intestinais, tornando-se peptídeos de menor tamanho, colhidos por receptores específicos encontrados no epitélio, os quais iniciam um processo de destruição tecidual, que colabora para a paralisia muscular. Isso leva o inseto à morte, que também pode ocorrer pela função de uma segunda causa associada à primeira, a multiplicação bacteriana na hemolinfa, caracterizando um processo septicêmico (GILL, 1995).

Devido a sua especificidade, existem no mercado uma diversidade de híbridos de milho *Bt*, cada um contendo sua toxina específica. Essas toxinas podem ter ação tóxica sobre larvas de insetos pertencentes a diferentes ordens, como Coleoptera, Diptera e Lepidoptera (MENDES; WAQUIL, 2009).

Os eventos que expressam as toxinas *Cry1Ab* e *Cry1F*, juntamente com os eventos que combinam as toxinas *Cry1A.105* e *Cry 2Ab2* estão registrados para três espécies: a lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda*; a lagarta-da-espiga do

milho, *H. zea* e a broca-da-cana-de-acúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). Entretanto, existem dados na literatura indicando também a atividade dessas toxinas sobre a lagarta-elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae). Indicações oriundas de usuários de campo relatam a atividade das toxinas do *Bt* também sobre, *Mocis latipes* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae). Portanto, os eventos hoje disponíveis no Brasil oferecem proteção contra as principais espécies de lepidópteros-praga do milho. Além dessas, existem toxinas que expressam tolerância a herbicidas. A protoxina PAT confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio e a CP4-EPSPS confere tolerância ao herbicida glifosato (CARNEIRO et al., 2009; MENDES; WAQUIL, 2009).

2.5 Impacto potencial das plantas geneticamente modificadas sobre a comunidade de insetos

A avaliação de risco do uso de agentes microbianos de controle de pragas é um assunto novo para o Brasil, havendo carência de pesquisas, necessidade de capacitação de recursos humanos nesta área e regulamentação de critérios e testes necessários para a avaliação desses organismos.

Para que uma planta transgênica possa integrar-se aos sistemas produtivos, é necessário que não represente riscos à saúde e ao ambiente, condição essencial para que a comercialização seja realizada sem restrições (FONTES; MELO, 1999). Apesar das quantificações das concentrações de proteínas tóxicas nas diferentes partes da planta de milho transgênico já terem sido realizadas, essa expressão pode variar com o promotor utilizado. Além disso, variações podem ocorrer conforme temperatura, o cultivar, a disponibilidade de nutrientes e a interação com metabólitos secundários. Atualmente a piramidação de genes (no caso, o agrupamento de diferentes eventos transgênicos em uma única planta), também traz questionamentos sobre mudanças da expressão dessas proteínas, rotas, e manutenção da especificidade perante pragas-alvo (ARAGÃO; ANDRADE, 2010).

Portanto, há grande preocupação em relação ao resultado das interações entre os organismos geneticamente modificados e o meio ambiente, uma vez que o impacto das plantas transgênicas não pode ser sempre previsto (FRIZZAS; OLIVEIRA, 2006). Além disso, a conservação da biodiversidade, assim como dos agentes de controle biológico, é parte integrante do manejo integrado de pragas,

necessitando de especial importância à esse contexto e toda a biodiversidade existente.

2.6 Efeitos sobre organismos não-alvo

Ultimamente se discute como as plantas geneticamente modificadas contendo *B. thuringiensis* interagem com os organismos não-alvo dos diferentes níveis tróficos, pois no campo, as culturas abrigam não somente os insetos praga, mas também outros artrópodes (parasitoides e predadores), os quais desempenham importante papel na regulação das populações de herbívoros. Em termos ecológicos, essa hierarquia é chamada de interação tritrófica, em que a planta representa o primeiro nível trófico; o inseto praga, herbívoro ou presa, o segundo nível; e os inimigos naturais, o terceiro nível (FRIZZAS; OLIVEIRA, 2006).

Como muitos inseticidas convencionais, essa nova tecnologia tem o potencial de alterar o controle biológico natural por meio de efeitos diretos e indiretos das plantas geneticamente modificadas no custo adaptativo comportamental ou ecológico dos inimigos naturais (SCHULER, 1999). Os mecanismos por meio dos quais as plantas resistentes afetam os inimigos naturais são complexos. Os possíveis efeitos das plantas geneticamente modificadas na dinâmica populacional dos inimigos naturais dependem de ampla gama de fatores, como por exemplo, o nível de resistência da planta, a especificidade da proteína expressa, em quais tecidos será expressa e por quanto tempo, a presença de plantas suscetíveis próximas e o manejo da cultura, ou seja, aplicação de inseticidas, controle de plantas daninhas, entre outros (SCHULER, 2000). Além dos efeitos diretos da planta sobre a biologia e ou comportamento do inimigo natural em decorrência de substâncias químicas ou outras fontes de alimento, como pólen, flores e seiva, há os efeitos indiretos, ou seja, efeito da planta sobre a praga, que afeta o inimigo natural (HOY et al., 1998).

Como as proteínas de *B. thuringiensis* são expressas em altas dosagens nos tecidos verdes das plantas geneticamente modificadas, e dependendo do promotor utilizado, também podem ser expressas no pólen, nas sementes, nas raízes e em outras partes da planta, isso também poderia afetar os inimigos naturais de diferentes maneiras (SCHRIJVER et al., 2007).

Sugadores podem adquirir a proteína expressa na seiva das plantas transgênicas quando se alimentam afetando igualmente os inimigos naturais. No entanto, RAPS et al. (2001) não detectaram a proteína Cry1Ab no floema de milho geneticamente modificado nem no “honeydew” de *Rhopalosiphum padi* (Linneu, 1758.) (Hemiptera: Aphididae), contudo a proteína foi detectada em larvas e fezes de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae).

Estudos de laboratório e casa-de-vegetação têm revelado efeito em inimigos naturais quando a praga suscetível ao *Bt* é usada como presa ou hospedeiro, sem nenhuma indicação de efeito tóxico. Em campo, observou-se que a abundância e a atividade de predadores e parasitóides são similares em áreas com e sem transgênicos, entretanto, em áreas com aplicação de inseticidas, observou-se efeitos negativos sobre esses organismos (ROMEIS et al., 2006).

Pesquisas sobre os efeitos colaterais de eventos transgênicos, utilizados em culturas como milho e algodão sobre os inimigos naturais e outros organismos não alvo, estão cada vez mais atraindo a atenção da comunidade científica (O'CALLAGHAN et al., 2005; ROMEIS et al., 2006). Tais estudos são necessários para viabilizar a utilização dessas ferramentas tecnológicas junto (MIP) (SÉTAMU et al., 2002).

2.7 Seletividade de agrotóxicos a *Trichogramma pretiosum* e adaptação da metodologia da IOBC a cultivares de milho transgênico

Uma parcela significativa do desequilíbrio que ocorre em sistemas agrícolas deve-se ao uso inadequado de produtos químicos. A preservação de inimigos naturais das pragas agrícolas tem sido uma das práticas de maior importância no MIP. Aplicações de produtos fitossanitários de alta toxicidade e de largo espectro estão sendo reconhecidos como a principal causa de desequilíbrios biológicos nos agroecossistemas, provocando problemas como ressurgência de pragas, aumento de pragas primárias que normalmente e seleção de populações de insetos resistentes (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; CARVALHO et al., 2002; DEGRANDE et al., 2002).

A utilização de compostos seletivos (agrotóxicos, ou ferramentas biotecnológicas) como plantas resistentes a insetos é de grande importância para retardar ou mesmo evitar esses problemas, pois alguns inimigos naturais se

alimentam de forma indiscriminada de populações de pragas resistentes ou não ao(s) produto(s) químico(s), contribuindo, assim, para a diminuição do desenvolvimento da resistência.

Com o objetivo de aprimorar os estudos de seletividade de pesticidas a organismos benéficos por meio da cooperação científica internacional, foi formado em 1974 o “Working Group Pesticides and Beneficial Arthropods” da “International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS)”, permitindo o intercâmbio de resultados entre países e economizando recursos utilizados nas repetições de testes. Devido à inclusão de outros organismos que não somente artrópodes, mas também fungos entomopatogênicos e anelídeos, em 1984 o nome do Grupo passou a ser “Pesticides and Beneficial Organisms” (FRANZ, 1975; FRANZ et al., 1980; HASSAN, 1983).

Para *Trichogramma*, o Guia da IOBC (HASSAN, 1998b; HASSAN et al., 2000; HASSAN; ABDELGADER, 2001) combina dois métodos experimentais de laboratório e um em condições de laboratório-ampliado, que são aplicados em sequência: (a) exposição (contato) dos adultos de *Trichogramma* a um filme do pesticida aplicado em placas de vidro; (b) pulverização direta de pupas dentro do ovo do hospedeiro; (c) exposição (contato) de adultos de *Trichogramma* em folhas de videiras tratadas, a diferentes intervalos após a aplicação do pesticida, com sua degradação sob condições de campo. De acordo com o mesmo Guia, o primeiro teste de laboratório (a) prova se o produto é inócuo. Produtos considerados inócuos neste teste são inócuos a campo, com raríssimas exceções. Nesse caso a continuidade dos testes é preconizada. Testes utilizando os métodos (b) e (c) são necessários quando o pesticida foi classificado como nocivo, moderadamente nocivo e levemente nocivo no teste (a). Apesar da inocuidade de um produto ser facilmente demonstrada em experimentação de laboratório, a toxicidade somente pode ser confirmada sob condições de campo. Os testes sob condições práticas de semicampo ou campo são recomendados quando o pesticida foi classificado como nocivo ou moderadamente nocivo no teste (b), persistente ou moderadamente persistente no teste (c).

Baseado nestes testes da IOBC, descritos acima, para avaliar agrotóxicos sobre inimigos naturais, poderá ser feita adaptações da metodologia para testar partes de plantas transgênicas de milho, expondo *T. pretiosum* a pólen, folhas, caule e seiva da planta.

No momento, não se tem nada definido sobre este tema no Brasil e assim cada empresa elabora as suas próprias metodologias dificultando a compra de resultados ou duplicando muitos trabalhos.

Com estes Protocolos prontos e com a metodologia definida para cada inimigo natural, o material poderá servir de base para realização de demais testes com plantas transgênicas e inimigos naturais, possibilitando futuras análises de resultados. Estes estudos poderão servir de base para elucidar questionamentos, ou mesmo auxiliar com dados para aprovação e liberação de novos materiais transgênicos no Brasil.

2.8 Efeito sobre parasitoides

Os adultos podem ser afetados: ao alimentarem-se de seiva (floema, xilema), pólen e néctar das plantas geneticamente modificadas contendo proteína *Bt*, por mudanças na emissão de compostos voláteis pela planta, o que pode interferir na localização hospedeira pelo parasitóide; por mudanças na composição e na emissão de compostos das fezes hospedeiras ou no “honeydew” excretado; essas mudanças no comportamento do hospedeiro induzido pelas plantas transgênicas, como aumento na movimentação, o que pode afetar o parasitismo (SCHULER, 2000; IRVIN et al., 2007).

Pólen, ao contrário de néctar, é um tecido de planta, por isso é capaz de síntese de proteínas, e seu teor de proteína pode ultrapassar 60% (WACKERS; VAN RIJN; BRUIN, 2005). O pólen de milho é uma importante fonte de recurso alimentar para os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* (WANG et al., 2007); a produção desse pólen é maior no período que antecede a antese.

Geng et al. (2006), constataram que *Trichogramma chilonis* (Ishii, 1941) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) alimentados com pólen proveniente de algodão *Bt* não reduz sua capacidade de parasitismo, longevidade e razão sexual, bem como a longevidade de seus descendentes.

Pesquisa desenvolvida por Peter et al., (2004), em fêmeas adultas de *Trichogramma minutum* (Riley, 1871) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), que se alimentaram de pólen extra floral, não tiveram sua longevidade afetada, observando média 11,5 dias de vida. Zhang et al., (2004) relataram que fêmeas de *Trichogramma brassicae* (Bezdenko, 1968), (Hymenoptera: Trichogrammatidae),

alimentada com pólen de milho e água, tiveram aumento significativo da longevidade do parasitoide.

Wang et al., (2007) estudaram o efeito do pólen de plantas de milho transgênico que expressam proteínas Cry1Ab de *B. thuringiensis* sobre fêmeas adultas de *Trichogramma ostrinae* (Pang e Chen, 1917) (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Os autores não verificaram quaisquer alterações na longevidade, número de ovos parasitados, viabilidade e razão sexual dos parasitoides alimentados com solução de pólen oriundos de milho transgênico. Foi observado ainda, que a solução de água e pólen aumentou o desempenho reprodutivo e a sobrevivência de fêmeas de *T. ostrinae* comparadas com as fêmeas alimentadas com água apenas.

Os presentes dados mostram que, sob condições de laboratório *Trichogramma* sp. consome pólen, embora não está claro se quaisquer benefícios dependem do acesso a uma fonte de hidratos de carbono. No entanto, caso a caso, análises de impacto de culturas geneticamente modificadas (GM) via pólen em parasitoides de ovos são necessárias por causa do potencial deste recurso alimentar para adultos, e presença conhecida de proteínas de culturas GM no pólen.

Fluidos vegetais, como, xilema e floema que emanam a partir de tecidos danificados, podem ser acessíveis a parasitoides de ovos. Os mesmos podem conter proteínas de culturas GM (SHI et al., 1994; BERNAL et al., 2002). A importância para parasitoides geralmente não é clara, muito poucas observações estão disponíveis.

Zimmermann et al. (2004), verificou que fêmeas do gênero *Trichogramma* que tiveram acesso a seiva de milho parasitaram menos ovos em comparação aqueles que tiveram acesso a honey-dew de pulgões presentes nas plantas do mesmo cultivar híbrido. Os autores relatam que geralmente a seiva da planta contém teor de açúcar baixo em relação ao néctar e honey-dew, prejudicando a nutrição e consequentemente a atuação do parasitoide.

Além dos efeitos diretos citados acima, as plantas geneticamente modificadas podem afetar os inimigos naturais pela diminuição severa no suprimento de presas. No entanto, este efeito tende a ser mais profundo para os inimigos naturais que se alimentam exclusivamente da praga, da qual a planta transgênica tem especificidade em controlar (SCHULER et al., 1999). Os parasitoides larvais podem ser afetados de diversas maneiras, cita-se a redução na qualidade do hospedeiro, o que reduziria a

sobrevivência larval e a fecundidade do parasitoide; ao consumir tecidos do hospedeiro; por não conseguir completar seu desenvolvimento em decorrência da morte prematura do mesmo.

A mortalidade do hospedeiro *H. zea* aumentou com o crescimento na densidade do seu inimigo natural (MASCARENHAS; LUTTRELL, 1997). O aumento do parasitismo pode estar relacionado com a maior movimentação das larvas nas plantas transgênicas, facilitando o encontro pelo parasitoide. Assim, a maior movimentação poderia acarretar em menor alimentação. Fator que implicaria menor emissão de compostos secundários e afetaria a localização do hospedeiro pelo parasitoide (FRIZZAS; OLIVEIRA, 2006).

Estudos com pragas resistentes a proteínas *Bt*, visando avaliar os efeitos da proteína na biologia do parasitoide, pode auxiliar a análise dos riscos ecotoxicológicos. Estudos mostraram que o parasitoide *Cotesia plutellae* (Kurdjumov, 1920 (Hymenoptera: Braconidae) se desenvolve normalmente em lagartas de *Plutella xylostella* (Linneu, 1758) (Hymenoptera: Braconidae) resistentes e que o parasitoide consegue localizar seu hospedeiro mesmo quando o dano nas folhas é feito artificialmente ou quando é causado por lagartas resistentes (SCHULER et al., 2000). Isso pode contribuir para os programas de manejo integrado de pragas e para o manejo da resistência, já que *C. plutellae* e *B. thuringiensis* utilizados conjuntamente são efetivos para o controle de *P. xylostella*, e os parasitoides poderiam ajudar a controlar a praga no refúgio (áreas com plantas suscetíveis à praga), reduzindo a necessidade de aplicação de inseticidas, o que poderia diminuir a evolução da resistência ao inseticida (CHILCUTT; TABASHNIK, 1999).

As plantas geneticamente modificadas apresentam elevado nível de controle das pragas-alvo. A redução severa no suprimento de presas pode afetar o parasitismo no campo, no entanto, Orr & Landis (1997) não verificaram diferenças no parasitismo de massas de ovos de *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1790) (Lepidoptera: Pyralidae) pelos parasitoides *Eriborus terebrans* (Gravenhorst, 1829) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Macrocentrus grandii* (Goidanich) (Hymenoptera: Braconidae) em áreas de milho transgênico. A porcentagem de parasitismo por *Diadegma insulare* (Cresson, 1875) (Hymenoptera: Ichneumonidae), parasitoide de larvas e pupas de *P. xylostella*, não diferiu em campos com mistura de plantas transgênicas e convencionais (RIGGIN-BUCCI; GOULD, 1997).

O milho transgênico (eventos 176 e Bt11) reduziu em 29-60% a abundância do parasitoide especialista *Macrocentrus cingulum* (Brischke) (Hymenoptera: Braconidae) (PILCHER et al., 2005). O parasitoide *Apanteles chilonis* (Munakata) (Hymenoptera: Braconidae) teve algumas características de seu desenvolvimento negativamente afetadas quando o parasitismo ocorreu em hospedeiro *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) que se alimentou em arroz transgênico (JIANG et al., 2005). Para o parasitoide *C. plutellae*, não foram observados efeitos negativos nos parâmetros biológicos de desenvolvimento quando o hospedeiro *P. xylostella*, resistente ao *Bt*, alimentou-se em folhas de repolho transgênico, entretanto, para a raça de *P. xylostella* suscetível, a morte prematura do hospedeiro impediu o desenvolvimento do parasitoide (SCHULER et al., 2004).

No Brasil, um estudo avaliou não apenas o efeito do milho YieldGard sobre *S. frugiperda*, mas também o impacto sobre o parasitoide de ovos *Trichogramma atopovirilia* (Oatman & Platner, 1983) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) um organismo não-alvo benéfico (FERNANDES, 2003). O consumo de área foliar foi menor no milho YieldGard, o que mostra um menor ataque por *S. frugiperda* e corrobora as conclusões sobre eficácia de controle dessa praga. A qualidade dos ovos da praga não foi afetada pelos tratamentos, nem o parasitismo desses ovos pelo parasitoide *T. atopovirilia*. O padrão de oviposição da *S. frugiperda* no milho YieldGard foi mantido quando comparado ao milho convencional, assim como as características das posturas. Os resultados confirmam a eficácia do milho YieldGard no controle da *S. frugiperda*, e a sua segurança para organismos não-alvo pertencentes à cadeia trófica em questão.

Segundo Frizzas e Oliveira (2006) a possibilidade da utilização conjunta do controle biológico e da resistência de plantas por meio das plantas geneticamente modificadas tem assumido importância nas últimas décadas, pois, além do potencial de maior eficiência do controle biológico nas variedades resistentes, os inimigos naturais podem retardar o processo de adaptação da praga às plantas transgênicas. No entanto, nem sempre esta associação resulta em interações positivas. A variação deve-se ao fato de que, além dos efeitos provocados por esses dois métodos de controle, existem as interações tritróficas envolvendo a planta, a praga e o inimigo natural.

Outro aspecto a ser considerado, é a diminuição do uso de inseticidas acarretado pelo uso de plantas transgênicas, principalmente, os de largo espectro, o que favorecerá a manutenção de populações de inimigos naturais e sua atuação no controle de pragas. Portanto, as plantas transgênicas não são substituição aos inseticidas, mas sim, nova abordagem ao Manejo Integrado de Pragas (MIP), por eliminar ou reduzir drasticamente o uso de inseticidas não seletivos, favorecendo a aliança com o controle biológico, e por reduzir o risco de resistência de insetos aos produtos químicos (FRIZZAS; OLIVEIRA, 2006).

É importante que se defina o que é um impacto ambiental ou um risco ecológico, e qual o ponto de comparação, ou seja, os possíveis impactos das plantas geneticamente modificadas e sua comparação com os métodos de controle. A utilização dessas plantas é uma importante tecnologia que poderá romper muitas barreiras e trazer importantes benefícios, no entanto, sua utilização deve ser considerada como mais uma tática dentro do contexto de MIP, e não como uma tática única de controle.

3 Metodologia Geral

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP/LABAGRO) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS.

3.1 Criação e manutenção do material biológico para os bioensaios

3.1.1 Cultivo das plantas de milho híbrido

Para realização dos bioensaios foram cultivados híbridos de milho, os quais foram mantidos em casa de vegetação com controle de condições ambientais. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos (20cm diâmetro inferior x 24cm diâmetro superior x 22cm altura) com oito orifícios na parte inferior, dispostos sobre pratos plásticos que serviram como reservatório de água. Cada vaso continha em média 12 Kg de solo do tipo planossolo (hidromórfico). Foi usado adubo químico (5-20-20), aplicado conforme as exigências da cultura do milho e utilizadas quatro sementes em cada balde, ocorrendo desbaste no estágio fenológico V2, permanecendo duas plantas por vaso.

3.1.2 Hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella*

O hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) foi criado conforme Parra (1997), utilizando-se dieta composta por farinha de trigo (97%) e levedo de cerveja (3%), e os ovos produzidos visaram à multiplicação dos parasitoides.

3.1.3 Parasitoide *Trichogramma pretiosum*

O material biológico utilizado nos bioensaios foi constituído por parasitoides de ovos da espécie *T. pretiosum*. Estes insetos deram origem a uma criação, a qual foi mantida em cilindros de vidro (25cm de comprimento x 10cm de diâmetro) em câmaras climatizadas sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. O alimento fornecido a adultos de *T. pretiosum* foi composto por 3g de gelatina, 100mL de água destilada e 200g de mel (HASSAN et al., 2000), o qual foi acondicionado em seringas de 5mL e conservado resfriado em temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.1.4 Preparo de cartões com ovos do hospedeiro *Anagasta kuehniella*

Ovos de *A. kuehniella*, com no máximo 24 horas de idade foram obtidos da criação e peneirados (peneira de malha com 0,5mm) para retirada de fragmentos de adultos e demais impurezas.

Os ovos foram colados em cartolina azul (20 x 11cm), por método de pincelamento de goma arábica (PARRA, 1997) sobre lâmina plástica perfurada, contendo 60 orifícios de 1cm. Posteriormente, as cartolinas contendo ovos foram acondicionadas em câmaras de inviabilização, onde permaneceram sob emissão de luz germicida (STEIN; PARRA, 1987) por uma hora a uma distância de 20cm. Logo, as cartelas foram acondicionadas em cilindros de vidro (25cm de comprimento x 10cm de diâmetro) para que os ovos fossem parasitados por adultos de *T. pretiosum* e servissem para a manutenção da criação ou condução dos bioensaios de imaturos ou adultos.

3.2 Condução dos bioensaios com *Trichogramma pretiosum*

Os bioensaios foram conduzidos em salas climatizadas (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas) e basearam-se nas metodologias estabelecidas pelo grupo de trabalho da IOBC para *Trichogramma cacoeciae* Marchal, 1927 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (HASSAN et al., 2000; HASSAN; ABDELGADER, 2001), as quais foram adaptadas por Giolo et al. (2005) para *T. pretiosum*, em função das características biológicas do parasitoide. As

referidas alterações de fotofase (16 horas para *T. cacoeciae*; 14 horas para *T. pretiosum*), temperatura (26°C para *T. cacoeciae*; 25°C para *T. pretiosum*) e espécie utilizada no presente trabalho (*T. pretiosum*), entretanto não alteraram a metodologia de trabalho propostas pela IOBC, adaptada parcialmente às condições climáticas brasileiras.

3.2.1 Bioensaios com adultos

Os bioensaios foram conduzidos em laboratório (temperatura de 25±1°C, umidade relativa de 70±10%, fotofase de 14 horas), expondo-se adultos (estágio mais sensível) dos parasitoides a folha, caule e pólen de plantas de milho transgênicas e seus respectivos materiais isogênicos (não transgênicos) utilizando-se de adaptação das metodologias da IOBC/WPRS.

3.2.2 Bioensaio envolvendo efeito do pólen de milho transgênico em fêmeas de *Trichogramma pretiosum*

Os bioensaios envolvendo o efeito do pólen de milho transgênico sobre fêmeas de *T. pretiosum* foi conduzido em laboratório (temperatura de 25±1°C, umidade relativa de 70±10%, fotofase de 14 horas). Para analisar o efeito do pólen de três diferentes híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos, fêmeas recém-emergidas de *T. pretiosum* foram individualizadas em tubos de Duran, contendo como substrato alimentar mel acrescido de pólen dos respectivos híbridos de milho. Foram analisados os seguintes parâmetros biológicos do parasitoide: longevidade, parasitismo total, viabilidade de emergência e razão sexual.

3.3 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS LEARNING EDITION, 2002). Os resultados obtidos, quanto ao número de ovos parasitados por fêmea, foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk através do procedimento Univariate. Em caso de normalidade dos dados, as médias foram comparadas pelo teste Tukey

(dados balanceados) utilizando-se o procedimento Gln em nível de 5% de probabilidade de erro.

4 Capítulo 1 - Efeito de plantas de milho transgênico sobre adultos de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

4.1 Introdução

O Brasil possui uma área de aproximadamente 15 milhões de hectares cultivados de milho (*Zea mays*) com uma produção em torno de 72 milhões de toneladas, apresentando um rendimento médio de 5 mil Kg/ha (IBGE, 2012). Porém, inúmeros fatores interferem na sua produção, como o clima, a fertilidade do solo, o tipo de solo, além dos insetos-praga que atacam a cultura praticamente em todas as fases de seu ciclo (RODRIGUES; SILVA, 2011).

A conservação e a utilização de agentes de controle biológico dentro de um sistema de produção é uma das principais estratégias adotadas no manejo integrado de pragas (MIP). Para isso, se faz necessário conhecer a ação dos produtos fitossanitários de origem química e bioecológicos sobre o inimigo natural e a partir disso determinar sua seletividade, efeito essencial para a proteção de cultivos, pois na verdade, o notável sucesso alcançado pelo uso de pesticidas tem dificultado o estudo dos inimigos naturais das pragas (VAN DEN BOSCH; STERN, 1962),

O século XX foi caracterizado por grandes descobertas que tiveram profundo impacto no melhoramento genético de plantas. Há muitos anos, as plantas cultivadas têm sido manipuladas geneticamente pelo homem, por meio do melhoramento clássico. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às técnicas da engenharia genética. Entre as estratégias de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, encontram-se: *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a mais utilizada; além de colesterol oxidase; lectinas; inibidores de α -amilase; inibidores de proteinases; proteínas inseticidas vegetativas; quitinases; peroxidase; entre outras (CAROZZI; KOZIEL, 1997).

A grande maioria das plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos expressa genes derivados da bactéria *B. thuringiensis*. Insetos e *Bt* têm coexistido por milhões de anos, já que *B. thuringiensis* é uma bactéria que habita naturalmente o solo, é gram-positiva esporulante e anaeróbica facultativa. Além

disso, é empregada há muitos anos como um inseticida microbiano por agricultores e, mais recentemente é utilizada como nova ferramenta para o controle de pragas, por meio da sua expressão nas plantas transgênicas.

A área mundial com plantas geneticamente modificadas é de 170 milhões de hectares. O principal país em termos de área cultivada é os Estados Unidos da América (69 milhões de hectares), e o Brasil ocupa a segunda posição (36,6 milhões de hectares), sendo as principais culturas a soja, o milho e o algodão (JAMES, 2012). Deste modo as plantas geneticamente modificadas que expressam genes com atividade inseticida representam uma nova alternativa para o controle de insetos. Atualmente diversas culturas, tais como milho, algodão, batata e fumo, têm sido modificadas geneticamente para expressar as proteínas derivadas de *B. thuringiensis*.

Apesar dos benefícios, existem possíveis riscos relativos às plantas geneticamente modificadas. Dentre as principais destacam-se a seleção de populações de insetos resistentes às proteínas *Bt*, ocorrência de fluxo gênico com parentes silvestres relacionados com possível alteração na agressividade do genótipo; impacto das proteínas *Bt* sobre as espécies não alvo (inimigos naturais, pragas secundárias, insetos de solo e polinizadores); efeitos adversos na biodiversidade, no ecossistema e nas comunidades bióticas (FERRY et al., 2006; ROMEIS et al., 2006; WANG et al., 2007).

Adultos de parasitoides de ovos tem possibilidade de exposição direta a proteínas de plantas geneticamente modificadas quando em contato com néctar extrafloral, pólen e outros fluidos de plantas, tais como seivas (xilema, floema) e fluidos provenientes de tecidos danificados (CÔNSOLI et al., 2010).

Deste modo o assunto necessita ser visto com atenção perante a comunidade científica mundial efetuando-se uma investigação do risco dessa exposição.

Além disso, é crescente o uso de agentes de controle biológico em culturas agrícolas do Brasil, tendo sido registrado a liberação de *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em culturas anuais em mais de 3.000 hectares de milho em 2008 na Região de Santa Maria/ RS (NAVA NACHTIGAL, 2010).

No Brasil, vários estudos foram conduzidos para avaliar a seletividade de agrotóxicos a *Trichogramma* em diversas culturas, porém poucos foram os trabalhos realizados sobre esse parasitoide para a cultura do milho (CRUZ, 1995;

PRATISSOLI et al., 2004; STEFANELLO et al., 2010). Além disso, a grande maioria dos trabalhos de seletividade ou efeito a inimigos naturais nessa cultura ainda não utilizam-se de técnicas padronizadas para a condução dos testes com plantas transgênicas dificultando assim a comparação de dados e a indicação de híbridos que sejam seletivos, inócuos e não causem impacto e com isso auxiliem na preservação de parasitoides e predadores nos sistemas de produção agrícola.

Envolvendo parasitoides de ovos não encontramos trabalhos a nível nacional tratando de seletividade especificamente, mas sim descrevendo influência de isolados de *B. thuringiensis* sobre *T. pretiosum* (POLANCZYK et al., 2006; PRATISSOLI et al., 2006a; SANTOS et al., 2011).

Visto a importância da integração biotecnologia, do controle biológico e do reduzido número de trabalhos plantas de milho transgênicas e parasitoide de ovos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da exposição de folha, caule e pólen sobre adultos de *T. pretiosum* em laboratório, através de metodologia adaptada pela IOBC/WPRS.

4.2 Material e Métodos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP/LABAGRO) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, no período de Novembro de 2011 a Dezembro de 2012, baseando-se nos critérios e parâmetros recomendados pela IOBC (HASSAN et al., 2000).

4.2.1 Criação e manutenção do material biológico para os bioensaios

4.2.2 Hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* e preparo de cartões

O hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) foi criado conforme Parra (1997) (Figura 1A e 1B) visando à produção de ovos para a multiplicação dos parasitoides. Após aspiração dos adultos do interior das bandejas (Figura 1B), os mesmos foram inseridos em gaiolas de PVC, para cópula e postura (Figura 1C). Ovos de *A. kuehniella* a cerca de 24 horas de idade foram obtidos da criação e colados em papel cartolina azul (20,0 x 11,0cm), através do pincelamento de goma arábica (PARRA, 1997) e utilização de molde plástico,

ovos estes que, após serem inviabilizados sob lâmpada germicida (STEIN; PARRA, 1987), foram ofertados a *T. pretiosum* para parasitismo (Figura 1D) e serviram para condução dos bioensaios (Figura 1E) ou manutenção da criação (Figura 1F).

4.2.3 Parasitoide *Trichogramma pretiosum*

Os cartões com ovos parasitados foram mantidos em cilindros de vidro (25,0cm de comprimento x 10,0cm de diâmetro) em câmaras climatizadas sob condições de temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas (Figura 1F), para o desenvolvimento de *T. pretiosum*. O alimento fornecido a adultos de *T. pretiosum* foi composto por 3,0g de gelatina, 100,0mL de água destilada e 200,0g de mel, o qual foi acondicionado em seringas de 5,0mL e conservado em temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Para a realização dos bioensaios foram utilizados somente parasitoides da mesma geração.

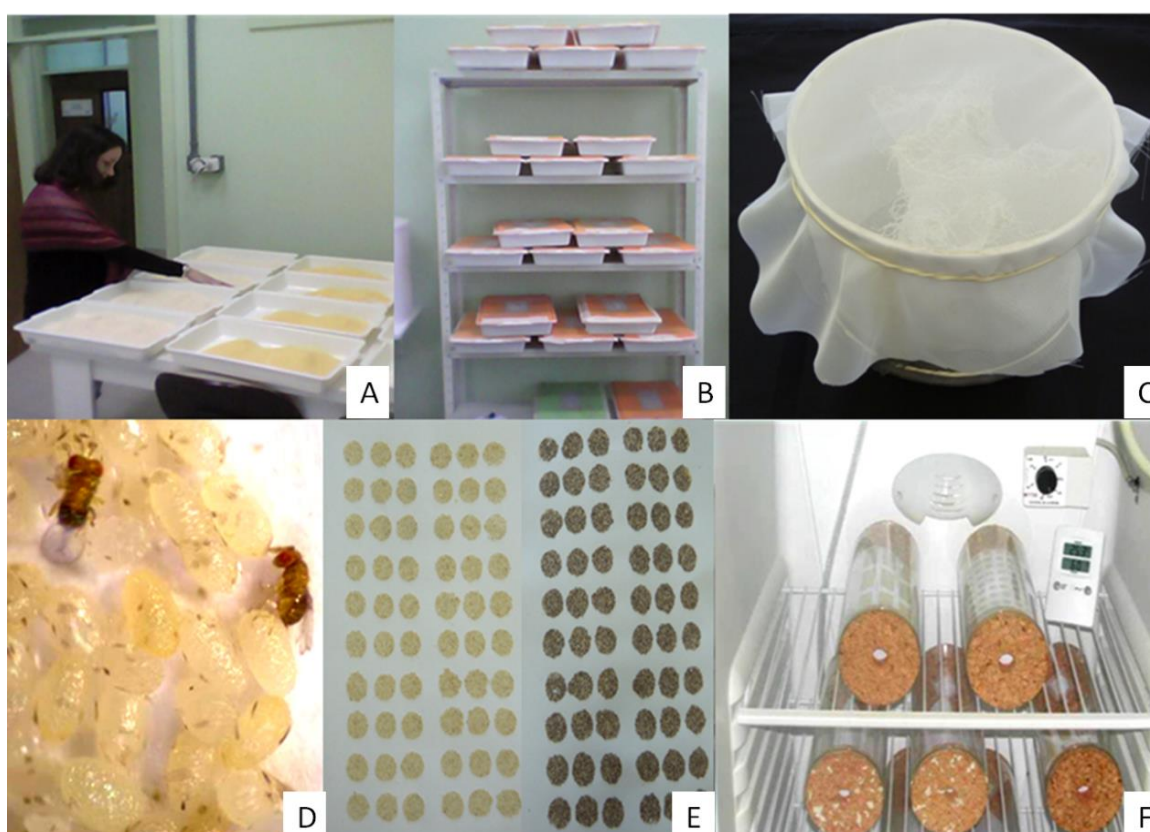


Figura 1- Detalhes da criação do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* e de *Trichogramma pretiosum*. A) Criação da fase imatura de *A. kuehniella* em bandejas, com farinha de trigo e levedo de cerveja; B) Bandejas contendo adultos de *A. kuehniella*; C) Inserção de adultos de *A. kuehniella* em gaiolas de PVC com telas; D) Parasitismo de ovos de *A. kuehniella* por *T. pretiosum*; E) Cartão com ovos de *A. kuehniella* não parasitados (claros) e ovos parasitados (escuros) para condução de bioensaios; F) Armazenamento de recipientes de vidro contendo cartões com ovos parasitados em câmaras BOD. Pelotas-RS. 2011/2012.

4.2.4 Condução dos bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos em laboratório (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas), expondo-se adultos (estágio mais sensível) dos parasitoides a folha, caule e pólen de plantas de milho transgênico e seus respectivos materiais isogênicos (Tabela 1), utilizando-se de adaptação das metodologias da IOBC/WPRS, adequadas por Giolo et al. (2005) e Manzoni (2006).

Foram realizados seis tratamentos por experimento, consistindo em híbridos de milho transgênico (dois tratamentos), respectivos isogênicos (não transgênico) (dois tratamentos), testemunha negativa (água destilada) e uma testemunha positiva (Lannate BR).

De acordo com as normas padronizadas pelo grupo de trabalho da IOBC, é necessária a inclusão de um padrão tóxico (testemunha positiva) nos testes de seletividade de agrotóxicos a *Trichogramma* (HASSAN et al., 2000), como forma de avaliar a sensibilidade relativa do sistema insetos/teste. Nesse sentido, o inseticida Lannate BR (metomil) foi utilizado como padrão de toxicidade em todos os bioensaios, por ser reconhecidamente nocivo aos parasitoides do gênero *Trichogramma* (STEFANELLO, 2010) e também apresentar registro para a cultura do milho no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

4.2.5 Híbridos de milho avaliados

Foram avaliados 10 híbridos de milho transgênico, inscritos no Registro Nacional de Cultivares (RNC), identificados, como: marca, híbrido, proteína expressa, nome comercial da tecnologia, evento e ciclo (Tabela 1). Deste modo, totalizaram 15 bioensaios entre (folha, caule e pólen).

Tabela 1 – Híbridos de milho transgênico avaliados quanto á seletividade/efeito sobre as fases adultas de *Trichogramma pretiosum* inscritos no Registro Nacional de Cultivares (RNC). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Marca | Híbrido | Proteína expressa | Nome Comercial | Evento | Ciclo ¹ |
|-----------|----------------|------------------------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| Agroceres | AG 8011YG | Cry1Ab | Yeld Gard | MON810 | P |
| Biogene | BG 7060Y | Cry1Ab | Yeld Gard | MON810 | P |
| Agroeste | AS 1551 YG | Cry1Ab | Yeld Gard | MON810 | SP |
| Agroeste | AS 1551 VT PRO | Cry1A. 105 + Cry 2Ab2 | PRO | MON89034 | SP |
| Dekalb | DKB330YG | Cry1Ab | Yeld Gard | MON810 | SP |
| Dekalb | DKB390PRO2 | Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 – EPSPS | PRO2 | MON89034+ NK603 | P |
| Pioneer | 30F53H | Cry1F PAT | Herculex | TC1507 | P |
| Pioneer | 32R48H | Cry1F PAT | Herculex | TC1507 | SP |
| Syngenta | Status TL | Cry1Ab PAT | TL | Bt 11 | P |
| Syngenta | Status Viptera | VIP3Aa20 | Viptera - MIR162 | MIR162 | P |

Ciclo¹ = P (precoce), SP (super precoce).

4.2.6 Montagens das placas com partes da planta de milho

Em adaptação da metodologia preconizada pela IOBC/WPRS os adultos de *T. pretiosum* foram colocados em contato com diferentes partes da planta de milho transgênico e de seus respectivos materiais isogênicos não transgênicos. Utilizaram-se primeiramente fragmentos de folhas da porção mediana da planta em estágio fenológico V5 a V8, fixadas em placa de vidro com fio de nylon (Figura 2A).

A segunda fase dos bioensaios consistiu na exposição ao caule da planta em estágio fenológico V8. Os mesmos foram cortados distalmente e alinhadas sobre placa de vidro. Desta forma, cobrindo totalmente a superfície da placa e expondo os indivíduos a fluídos (extravasamento celular da seiva) (Figura 2B).

A última fase dos bioensaios expos os pararasitoides ao pólen das plantas (Figura 2C). O mesmo foi coletado e disposto de modo a criar uma película uniforme sobre placa de vidro, quantificada em cerca de 160 grânulos de pólen/cm², quantidade aferida em microscópio estereoscópico com auxílio de um gabarito. A montagem das placas de vidro com as respectivas partes da planta de milho respeitou as zonas marginais das placas que foram protegidas por uma armação plástica (14,0 x 14,0cm), para que somente a área central (10,0 x 10,0cm) fosse utilizada, deste modo não ocorrendo a contaminação das molduras de alumínio e da espuma da gaiola.

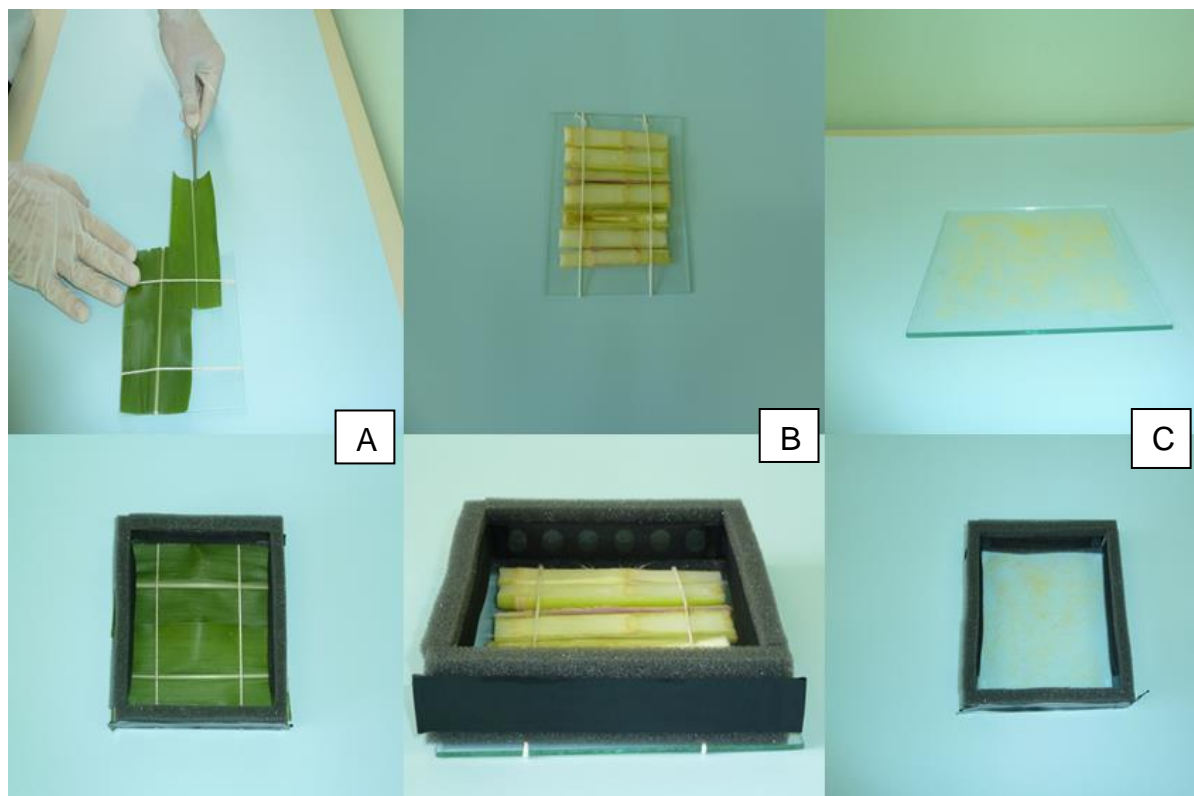


Figura 2 - Detalhe da montagem das placas para preparação das gaiolas de contato. A) Partes da folha mediana de milho; B) Caule com corte distal disposto paralelamente a placa, C) Pólen de milho formando película sobre a placa. Abaixo fotos das gaiolas de contato montadas com partes da planta de milho. Pelotas-RS. 2011/2012.

4.2.7 Aplicação do inseticida (Lannate BR- testemunha positiva)

A seletividade do agrotóxico Lannate BR a adultos de *T. pretiosum* foi avaliada utilizando-se a máxima dosagem de campo registrada para a cultura do milho (0,6 l/ha). O produto comercial foi diluído em água destilada, considerando um volume de calda de 200 L ha⁻¹ (HASSAN et al., 2000), e as aplicações foram realizadas através da utilização de pulverizadores manuais de 580 mL (Figura 3B) sobre placas de vidro (13,0cm x 13,0cm x 0,2cm de espessura) com deposição de calda de $1,75 \pm 0,25$ mg cm⁻², aferida por pesagem em balança eletrônica. Também durante as pulverizações as zonas marginais das placas de vidro foram protegidas por uma armação plástica (14,0 x 14,0cm), para que somente a área central (10,0 x 10,0cm) fosse impregnada com a calda e prevenindo a contaminação das molduras de alumínio e da espuma da gaiola.

A calda do inseticida foi aplicada sobre oito placas de vidro por tratamento, em apenas uma face, que depois de secas serviram de fundo e cobertura na montagem de quatro gaiolas de contato.

4.2.8 Preparo das gaiolas de contato

Cada gaiola de contato foi composta por duas placas de vidro que serviram de fundo e cobertura de uma moldura de alumínio (13,0cm de comprimento x 1,5cm de altura x 1,0cm de espessura), fixadas por presilhas (Figura 3B). A face contendo determinada parte da planta de milho transgênico ou pulverizada permaneceu voltada para o interior da gaiola, expondo assim os parasitoides à folha, caule, pólen e aos resíduos secos do agrotóxico (testemunha positiva). Fitas de espumas auto-adesivas (0,9 cm) foram colocadas na moldura de alumínio na face da gaiola voltada à placa de vidro, a fim de permitir melhor acomodação das mesmas e evitar a fuga dos parasitoides.

Cada gaiola possuía seis orifícios (diâmetro de 1,0cm) de ventilação para cada uma das três laterais, sendo cobertas internamente com tecido preto a fim de evitar a fuga dos parasitoides. Dessa forma, os vapores tóxicos puderam ser removidos por um sistema de sucção de ar, conectado às gaiolas por mangueiras e conectores, durante todo o período de condução do experimento (Figura 3C). Em uma das laterais havia dois orifícios: um orifício (3,5 x 1,0cm) utilizado para a introdução de ovos do hospedeiro *A. kuehniella*, para serem parasitados pelas fêmeas remanescentes de *T. pretiosum*, e para o fornecimento de alimento (item 2.4) aos insetos em teste; e outro orifício (diâmetro de 1,0cm) para inserção dos parasitoides a serem expostos aos resíduos dos agrotóxicos.

Na montagem das gaiolas, as superfícies externas das placas de vidro (superfície não tratada) foram cobertas com um cartão preto de mesmas dimensões da placa, porém com uma área central removida (7,0 x 7,0cm) (Figura 3B). Isso maximizou a concentração de adultos do parasitoide na superfície tratada, devido seu comportamento fototrópico positivo.

4.2.9 Tubos de emergência

Tubos de emergência (ampolas de vidro de 12,0cm de comprimento x 2,0cm de diâmetro na extremidade x 0,7cm na extremidade oposta) (Figura 3D) foram utilizados para a liberação de *T. pretiosum* recém emergidos (aproximadamente de 24 horas de idade) no interior das gaiolas de contato.

Para isso, cartões de cartolina azul (20,0 x 11,0cm) com 60 círculos (1,0cm de diâmetro) contendo 250 ± 50 ovos inviabilizados sob lâmpada germicida (STEIN; PARRA, 1987) de *A. kuehniella* foram ofertados a adultos de *T. pretiosum* para parasitismo (Tabela 2). Posteriormente, os ovos foram mantidos nas mesmas condições da criação (item 4.2.3) por 7 dias para permitir o desenvolvimento do parasitoide até a fase de pupa. Após esse período, os círculos contendo ovos homogeneamente parasitados por *T. pretiosum* foram utilizados para confecção dos tubos de emergência.





Utilizaram-se 24 círculos, um para cada tubo de emergência, mais 4 círculos individualizados em tubos de 10,0cm de comprimento por 2,5cm de diâmetro, para avaliação dos parâmetros “número de parasitoides por ovo” e “razão sexual”. Dessa forma, para cada experimento foram utilizados 28 círculos de ovos parasitados, de cada cartão de 60 círculos.

Assim, um tubo de emergência estava constituído por um círculo (1,0cm de diâmetro), contendo 250 ± 50 ovos previamente parasitados, aderido a uma cartolina azul (8,0 x 1,5cm) com três filetes de alimento (Figura 3A). Os tubos foram fechados com tecido de algodão branco, fixando-o com um elástico e um anel de borracha, nas extremidades de maior e menor diâmetro, respectivamente. Três dias após, adultos de *T. pretiosum* com 24 horas de idade estavam disponíveis para a liberação no interior das gaiolas de contato.



Figura 3 - Detalhes da condução dos bioensaios (seletividade/efeito). A) Pulverizador manual utilizado para aplicação da calda (testemunha positiva); B) Componentes utilizados na montagem da gaiola de exposição de *T. pretiosum* aos resíduos do inseticida e partes das plantas transgênicas a parasitoides de ovos; C) Detalhes do sistema de sucção de vapores tóxicos do interior da gaiola; D) Tubo de emergência contendo ovos de *Anagasta kuehniella* parasitados, adultos de *T. pretiosum* recém emergidos e filetes de mel. Pelotas-RS. 2011/2012.

Tabela 2 – Cronograma de atividades para bioensaios de efeito com híbridos de milho transgênico a adultos de *Trichogramma pretiosum*. Pelotas-RS. 2011/2012.

| Dias | Semanas | | | |
|----------------|---|---|---|---|
| | 1 ^a | 2 ^a | 3 ^a | 4 ^a |
| Segunda |  | | Montagem dos tratamentos (plantas/padrão inseticida), preparo das gaiolas e conexão dos tubos de emergência | Desmontagem das gaiolas e transferência de cartões parasitados para placas de Petri |
| Terça | | | Desconexão dos tubos de emergência e inserção de ovos hospedeiros 24 horas após preparo dos tratamentos | |
| Quarta | | | Inserção de ovos hospedeiros 48 horas após o preparo dos tratamentos | |
| Quinta | | | Avaliação da população inicial do parasitoide | Início das avaliações do parasitismo nos ovos de <i>A. kuheniella</i> |
| Sexta | Parasitismo dos ovos do hospedeiro | Preparo dos tubos de emergência | Inserção de ovos hospedeiros 96 horas após preparo dos tratamentos | |
| Sábado | | | | |
| Domingo | | Início da emergência de adultos de <i>T. pretiosum</i> | | |
| | |  |  |  |

4.2.10 Liberação dos insetos em teste

Os tubos de emergência contendo adultos ativos de *T. pretiosum* foram envoltos com capas feitas de cartolina preta e conectados às gaiolas de contato após a montagem das placas com folha, caule e polén ou seis horas após pulverização do agrotóxico (testemunha positiva) (Tabela 2) (Figura 4A, 4B e 4C). O escurecimento dos tubos, aliado ao aumento da intensidade luminosa da sala do bioensaio, passando de 1 lâmpada tubular fluorescente de 40 watts para uma de 150 watts acesas durante as três primeiras horas, permitiram a entrada dos

parasitoides no interior das gaiolas em função de seu comportamento fototrópico positivo.

Após 16 horas, os tubos de emergência foram desconectados e mantidos sob condições controladas (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas) por mais três dias, para total emergência de adultos, a fim de que fosse possível calcular o número de indivíduos que entraram na gaiola (Tabela. 2).

4.2.11 Oferta de ovos do hospedeiro para parasitismo

Para avaliar a capacidade de parasitismo de *T. pretiosum*, após seis horas da desconexão dos tubos de emergência, foram oferecidos ovos de *A. kuehniella* inviabilizados sob lâmpada germicida (STEIN; PARRA, 1987) e alimento. Assim, cartões contendo três círculos (1,0cm de diâmetro) com 400 ± 50 ovos por círculo foram oferecidos para parasitismo as 24 (três cartões), 48 (dois cartões) e 96 (um cartão) horas após preparo dos tratamentos (plantas/padrão tóxico), totalizando 18 círculos e 7.200 ovos por gaiola (Figura 4C e 4D).

A avaliação da capacidade de parasitismo foi mantida por um período de 144 horas (aproximadamente 6 dias), condição em que os ovos do hospedeiro alternativo ficaram disponíveis para o parasitismo. Todos os cartões foram confeccionados com ovos de *A. kuehniella* com aproximadamente 24 horas de oviposição (Item 2.1.1). Estes cartões foram colocados sempre na projeção da área iluminada das gaiolas, através do maior orifício de abertura (3,5 x 1,0cm), e os novos cartões colocados sobre aqueles dos dias anteriores.

4.2.12 Desmontagem das gaiolas

As gaiolas foram desmontadas após sete dias do preparo dos tratamentos, momento em que as placas de vidro foram descartadas e os cartões, contendo ovos do hospedeiro, transferidos para placas de Petri (9,0 x 1,5cm) e acondicionados nas mesmas condições da criação (item 2.1.2) para avaliação da porcentagem de parasitismo por meio da contagem do número de ovos escurecidos (ovos pretos) (Tab. 2). Os adultos remanescentes e o alimento foram previamente retirados dos

cartões, evitando assim o parasitismo e a adesão dos cartões durante o armazenamento nas placas de Petri e contagem.

4.2.13 Cálculo da população inicial do parasitoide

Os tubos de emergência, após serem desconectados, foram fechados e acondicionados em câmara climatizada nas mesmas condições da criação (item 2.1.2) por mais três dias, para que todos os parasitoides remanescentes emergissem (Tab. 2). Posteriormente, esses tubos foram transferidos para estufa a 70°C por 30 minutos para matar os adultos, facilitando, assim, na contagem.

Para determinar o número de fêmeas do parasitoide de *T. pretiosum* por gaiola de contato, inicialmente se obteve os parâmetros populacionais “número de parasitoides por ovo” e “razão sexual”. Estes foram obtidos mediante avaliação de quatro círculos (1,0cm de diâmetro) contendo ovos parasitados da mesma geração de insetos utilizados nos testes (mesmo cartão de círculos com ovos utilizado na confecção dos tubos de emergência). Posteriormente, foram contados o número de ovos parasitados e o número de adultos remanescentes de cada tubo de emergência. O número de ovos parasitados de cada tubo foi multiplicado pelo parâmetro “número de parasitoides por ovo” e o valor obtido foi subtraído do número de adultos do tubo e multiplicado pela “razão sexual” da população. As contagens foram realizadas em microscópio estereoscópico.

4.2.14 Cálculo do parasitismo

A contagem de ovos parasitados em cada tratamento foi realizada mediante contagem, em microscópio estereoscópico, dos seis cartões (18 círculos) ofertados durante o período de execução do bioensaio (Figura 4E e 4F).

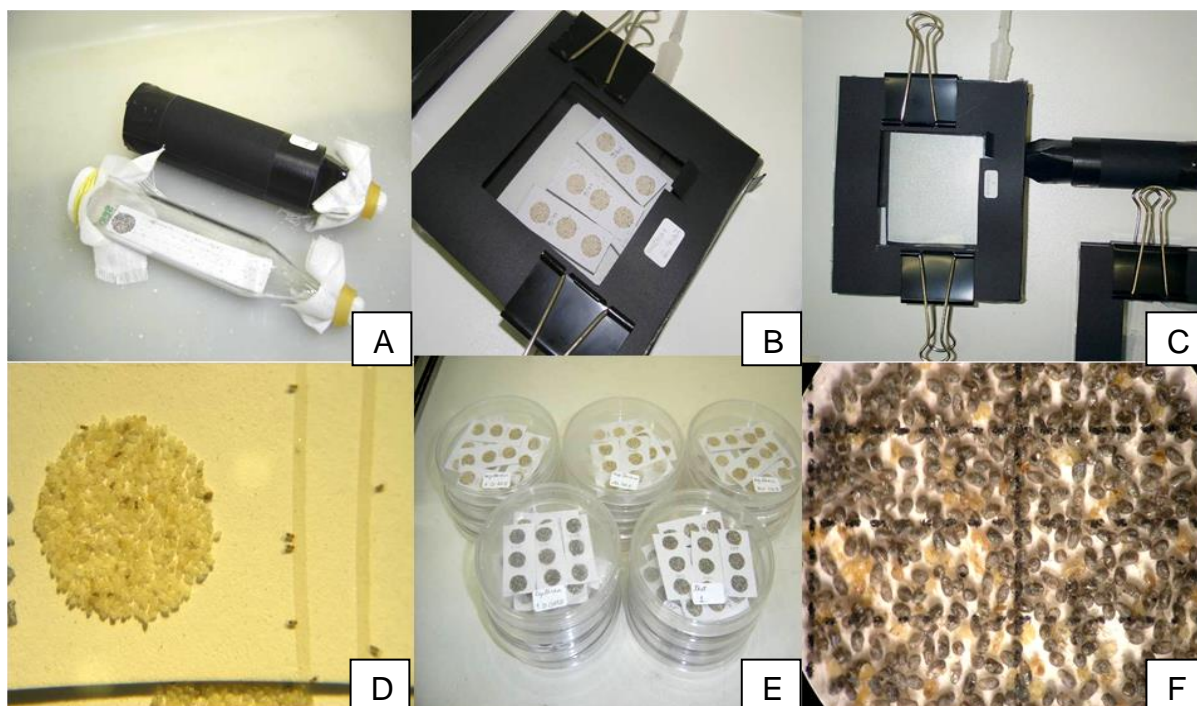


Figura 4 - Detalhes da condução dos bioensaios de efeito de híbridos de milho transgênico. A) Tubo de emergência com ovos do hospedeiro alternativo e tubo de emergência escurecido para conectar nas gaiolas de exposição; B) Detalhe da oferta dos cartões contendo ovos de *Anagasta kuehniella*; C) Tubo de emergência conectado à gaiola; D) Detalhe do círculo com ovos de *A. kuehniella*; E) Placas de Petri contendo cartões com ovos parasitados para contagem; F) Detalhe de um círculo com ovos de *A. kuehniella* parasitados (escuros) para contagem em microscópio estereoscópico. Pelotas-RS. 2011/2012.

4.2.15 Análises dos dados e determinação das classes de toxicidade

O número médio de ovos parasitados por *T. pretiosum* de cada tratamento foi utilizado para mensurar a capacidade de parasitismo, refletindo a sobrevivência de adultos dos parasitoides. Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento, sendo cada gaiola considerada uma unidade experimental no delineamento inteiramente casualizado.

Aos resultados foram atribuídos às classes propostas pela IOBC, baseados na redução do parasitismo dos adultos de *T. pretiosum* quando comparadas com a testemunha negativa (água destilada). As reduções na capacidade de parasitismo foram calculadas por meio da fórmula $RP = [1 - R_t/R_c] \times 100$ (HASSAN et al., 2000), onde “RP” é a porcentagem de redução no parasitismo em relação a testemunha negativa, “ R_t ” é o valor do parasitismo médio para cada tratamento e “ R_c ” representa o parasitismo médio observado para o tratamento testemunha negativa. Com base nas porcentagens de reduções de parasitismos obtidas, os tratamentos (híbridos de

milho) foram classificados em 1, inócuo (<30%); 2, levemente nocivo (30-79%); 3, moderadamente nocivo (80-99%) e 4, nocivo (>99%).

Análises estatísticas complementares foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS LEARNING EDITION, 2002). As médias emparelhadas foram comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

4.3 Resultados e Discussão

Os resultados da seletividade/efeito dos 10 híbridos de milho transgênico e seus isogênicos (não transgênicos) sobre os adultos de *T. pretiosum* encontram-se nas (Tabela 3) Folha, (Tabela 4) Caule e (Tabela 5) Pólen.

O número de fêmeas adultas de *T. pretiosum* no interior das gaiolas de exposição variou de 102,01 a 286,70 (Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5). De acordo com Zhang e Hassan (2000), valores entre 55 e 150 fêmeas de *T. cacoeciae* no interior das gaiolas de exposição não interferiram nos resultados obtidos pelos autores. Por outro lado, Hassan (1998) indica que o número de fêmeas no interior das gaiolas pode variar de 200 a 400 para a metodologia proposta pela IOBC para *T. cacoeciae*. Com base nessas informações e nos resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que o número de fêmeas de *T. pretiosum* nas gaiolas permitiu a realização dos bioensaios conforme recomendação da IOBC.

Na testemunha negativa (água destilada), os valores referentes ao número de ovos parasitados por fêmea de *T. pretiosum* variaram de 17,81 a 30,26 (Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5). De acordo com a metodologia padronizada pela IOBC, a validação dos testes de seletividade está baseada em alguns critérios, sendo um dos mais importantes o número de ovos parasitados por fêmea para o tratamento testemunha negativa. Para a espécie *T. cacoeciae* a metodologia proposta pela IOBC preconiza um mínimo de 15 ovos parasitados por fêmea (HASSAN et al., 2000). Para *T. pretiosum* ainda não há um número mínimo estabelecido para validação de testes de seletividade, entretanto Maceda, Hohmann e Santos (2003) estudaram os efeitos de temperatura sobre o desenvolvimento *T. pretiosum* em ovos de *A. kuehniella* e observaram que a 25°C as fêmeas parasitaram em média 5,74 ovos por dia. De acordo com os resultados de parasitismo de *T. pretiosum* observados na maioria dos experimentos deste trabalho (Tabela 3, Tabela 4 e

Tabela 5), em seis dias, verificam-se valores similares aos encontrados por esses autores.

Entre os 10 híbridos de milho transgênico testados na pesquisa se encontram 6 diferentes proteínas tóxicas expressas: AG 8011YG (Cry1Ab), BG7060Y (Cry1Ab), AS 1551 YG (Cry1Ab),DKB330YG (Cry1Ab), as quais conferem resistência a lepidópteros. AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry2Ab2), também são resistentes a insetos da Ordem Lepidoptera, porém expressando mais de um tipo de proteína tóxica. Desse modo, isto dificulta a resistência de lepidópteros praga e confere maior controle sobre estes insetos alvo. DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + 30F53H (Cry1F PAT), 32R48H (Cry1F PAT), Status TL (Cry1Ab PAT), possuem resistência a insetos (lepidópteros), conjuntamente com tolerância ao herbicida glufosinato. Já DKB390 PRO 2 (Cry1A.105 + Cry2Ab2 + CP4 - EPSPS), confere resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato. Status Viptera (VIP3Aa20) é resistente a insetos da Ordem Lepidoptera. É importante salientar que atividade inseticida dessas proteínas é semelhante, porém diferem pela sua forma de produção (CARNEIRO et al., 2009; MENDES; WAQUIL, 2009).

As plantas transgênicas ou plantas geneticamente modificadas que expressam genes com atividade inseticida representam nova alternativa para o controle de insetos, além de serem consistentes com a filosofia do manejo integrado de pragas (MIP). No entanto, algumas dúvidas em relação à entomofauna têm despertado o interesse dos pesquisadores e dos órgãos de regulamentação. Os principais questionamentos são: a possibilidade de as plantas transgênicas afetarem os organismos não alvo principalmente, parasitoides, predadores, lepidópteros não alvo (MARTINS et al., 2007).

Com a exploração do milho geneticamente modificado, o número de aplicações de inseticidas foi reduzido consideravelmente, porém ainda surgem dúvidas a respeito de seus efeitos sobre a entomofauna benéfica no agroecossistema em geral. As exposições do parasitoide a diferentes partes da planta onde a proteína é expressa levantam questionamentos da possibilidade das mesmas afetarem negativamente a população desse parasitoide na cultura do milho (FRIZZAS; OLIVEIRA, 2006).

4.3.1 Folha

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com folhas de todos os bioensaios realizados (I a V), (Tabela 3), com relação a variável número de ovos parasitados (Tabela 3), verificando-se um parasitismo de 17,01 a 29,13 ovos por fêmea. Tais tratamentos causaram reduções no parasitismo de *T. pretiosum* que variaram de 0,17 a 8,50%, sendo classificados como inócuos (classe 1). Somente o padrão tóxico Lannate BR (metomil) diferiu significativamente dos demais tratamentos, reduzindo em 100 % o parasitismo de *T. pretiosum* em todos os bioensaios com folhas.

Em média a concentração de proteínas expressas na folha de híbridos de milho transgênico é de 10,7 a 24 ng/mg de peso seco, ocorrendo variação conforme o híbrido (AAB, 2012).

Parasitoides de ovos e predadores de pragas do milho não foram afetados negativamente por milho *Bt* expressando a proteína Cry1Ab (PILCHER et al., 1997; ZWAHLEN et al., 2000; AL-DEEB et al., 2001). A toxina Cry1Ab do milho MON 810 na alimentação *Rhopalosiphum padi* (Linneu, 1758) (Hemiptera: Aphididae) não teve efeito na mortalidade e desenvolvimento da espécie. A longevidade e mortalidade de larvas de *Chrysoperla cárnea* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Chrysopidae), foram as mesmas quando em contato com plantas geneticamente modificadas (LI et al., 2008). Tais resultados corroboram com o presente trabalho, onde os híbridos testados contendo a mesma proteína, não foram nocivos a *T. pretiosum*.

Estudos de campo para avaliar os efeitos das proteínas Cry1Ab e VIP3A sobre organismos não alvo, principalmente focados em abundância e diversidade dos mesmos foram realizados por Dively (2005). A referida pesquisa atesta que a quantidade de organismos não alvos da tecnologia, incluindo inimigos naturais, que são agentes de controle biológico como parasitoides, não foi afetada significativamente, ficando dentro de parâmetros biológicos normais. Tais resultados corroboram com os obtidos na presente pesquisa, no qual o parasitismo e mortalidade dos indivíduos de *T. pretiosum* se enquadraram dentro de parâmetros biológicos normais quando expostos a folha de híbridos transgênicos (Tabela 3).

Segundo Dively (2005) em sua pesquisa, as poucas alterações observadas foram relacionadas com a menor quantidade de lagartas (pragas) em decorrência da utilização dos híbridos de milho transgênico e sua eficiência no controle das pragas.

Estudos com algodão *Bt* contendo a proteína Cry1Ac, efetuados por Naranjo (2005), em teste de campo por três anos, sugere que os efeitos negativos do algodão transgênico sobre artrópodes não alvo, particularmente inimigos naturais são mínimos. Mesmo pequenas quedas na densidade de alguns táxons não parecem estar associadas com quaisquer alterações significativas na função da comunidade de inimigos naturais pelo uso do algodão transgênico. Resultados parecidos foram obtidos por White House et al. (2005). As conclusões dos estudos com algodão expressando a mesma proteína foram semelhantes, uma vez que quantidade de organismos não alvos da tecnologia, incluindo inimigos naturais de pragas que são agentes de controle biológico, não foi afetada significativamente.

Conjuntamente, os estudos de campo citados acima demonstraram cientificamente que as plantas transgênicas avaliadas não afetaram os organismos que não são alvos de controle da tecnologia *Bt*. Deste modo tais resultados científicos indicam que estas plantas não causaram efeitos negativos diretos sobre organismos benéficos das lavouras.

A fim de fornecer uma avaliação mais crítica, num terceiro nível trófico Chen et al. (2008) utilizaram-se de uma linhagem de larvas de *Plutella xylostella* (Linneu, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) resistente a proteína Cry1AC e permitiu que se alimentassem de plantas *Bt* e em seguida foram parasitados por população de *Diadegma insulare* (Cresson, 1875) (Hymenoptera: Ichneumonidae), endoparasitoide importante de *P. xylostella*. Os resultados indicaram que o parasitoide foi exposto a uma forma biologicamente ativa da proteína Cry1C no hospedeiro, mas não foi prejudicada por tal exposição, ocorrendo parasitismo de 90% das larvas de *P. xylostella*. Porém, o número de *D. insulare* emergidos das lagartas, diferiu entre o controle e o grupo tratado com a formulação comercial, mas não diferiu entre o controle e as lagartas tratadas com a planta expressando a proteína Cry 1Ac ou somente com a proteína purificada.

Estudo semelhante foi realizado por Torres & Ruberson (2008) com a mesma proteína expressa em plantas de algodão. Os resultados desse estudo mostraram que a proteína foi detectada em três níveis tróficos avaliados, porém, os insetos predadores e parasitas das lagartas de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) não foram afetados quando as lagartas foram alimentadas com algodão transgênico.

Baseado nos dados acima e nos resultados da presente pesquisa todos os híbridos testados nos bioensaios envolvendo folhas, foram inócuos a *T. pretiosum*. Ficando caracterizada a especificidade das proteínas transgênicas testadas, garantindo a seletividade fisiológica a *T. pretiosum*.

Tabela 3 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito da folha de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios I a V) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/proteína expressa) | DC ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|---|-----------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio I | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 190,87 \pm 11,48 ab | 17,81 \pm 1,40 a | - | - |
| AS 1551 | - | - | 199,47 \pm 3,85 ab | 17,78 \pm 0,45 a | 0,17 | 1 |
| AS1551 VT PRO (Cry 1A.105 + Cry 2 Ab2) | - | - | 190,71 \pm 16,56 ab | 17,02 \pm 1,57 a | 4,44 | 1 |
| BG7060 | - | - | 203,02 \pm 13,25 a | 17,01 \pm 1,41 a | 4,49 | 1 |
| BG7060Y (Cry1Ab) | - | - | 189,62 \pm 11,89 b | 17,70 \pm 2,03 a | 0,62 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 186,48 \pm 11,48 ab | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |
| Bioensaio II | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 175,54 \pm 10,39a | 21,53 \pm 0,28 a | - | - |
| AG 8011 | - | - | 162,64 \pm 7,40 ab | 20,15 \pm 0,27 a | 6,41 | 1 |
| AG 8011YG (Cry1Ab) | - | - | 171,80 \pm 4,60a | 20,19 \pm 0,79 a | 6,22 | 1 |
| AS 1551 | - | - | 191,87 \pm 18,00 a | 19,95 \pm 0,41 a | 7,34 | 1 |
| AS 1551 YG (Cry1Ab) | - | - | 179,47 \pm 6,88 a | 20,86 \pm 0,72 a | 3,11 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 144,88 \pm 10,39 b | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

Tabela 3 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito da folha de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios I a V) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/proteína expressa) | DC ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|---|-----------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio III | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 169,80 \pm 5,92 a | 30,20 \pm 1,23 a | - | - |
| 30F53 | - | - | 172,15 \pm 8,71 a | 28,30 \pm 1,18a | 6,29 | 1 |
| 30F53H (Cry1F PAT) | - | - | 177,52 \pm 7,30 a | 27,90 \pm 2,32a | 7,62 | 1 |
| 32R48 | - | - | 157,78 \pm 13,95 a | 29,13 \pm 1,27a | 3,54 | 1 |
| 32R48H (Cry1F PAT) | - | - | 161,91 \pm 9,98 a | 28,55 \pm 2,05 a | 5,46 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 141,11 \pm 8,74 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |
| Bioensaio IV | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 166,26 \pm 18,34 a | 23,35 \pm 2,39a | - | - |
| Status | - | - | 163,19 \pm 10,62 a | 22,24 \pm 1,96 a | 4,75 | 1 |
| Status TL (Cry1Ab PAT) | - | - | 162,65 \pm 12,97 a | 22,53 \pm 2,48 a | 3,51 | 1 |
| Status | - | - | 150,33 \pm 10,46 a | 22,60 \pm 0,82 a | 3,21 | 1 |
| Status Viptera (VIP3Aa20) | - | - | 156,37 \pm 14,94 a | 21,94 \pm 1,63 a | 6,04 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 141,50 \pm 16,82 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

Tabela 3 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito da folha de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios I a V) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/proteína expressa) | DC ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|---|-----------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio V | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 215, 37 \pm 10,50 a | 24,98 \pm 1,58 a | - | - |
| DKB390 | - | - | 207,81 \pm 20,19 a | 24,26 \pm 2,23 a | 2,89 | 1 |
| DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 - EPSPS) | - | - | 217,29 \pm 15,27 a | 23,31 \pm 2,03 a | 6,70 | 1 |
| DKB330 | - | - | 237,88 \pm 20,31 a | 23,37 \pm 3,13 a | 6,47 | 1 |
| DKB330YG (Cry1Ab) | - | - | 221,25 \pm 11,14 a | 22,86 \pm 0,93 a | 8,50 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 198,60 \pm 12,46 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

¹Dosagem do produto comercial (kg ou L.ha⁻¹), registrado no MAPA, para a cultura do milho no Brasil. ²Concentração (%) de ingrediente ativo na calda utilizada para os bioensaios; ³Médias seguidas por letras idênticas não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Tukey, expressando a média de quatro repetições por tratamento; ⁴RP= Redução do parasitismo comparado com a testemunha negativa (água destilada) utilizada no bioensaio; ⁵Classes da IOBC: 1- Inócuo (<30%), 2= Levemente nocivo (30-79%) 3= Moderadamente nocivo (80-99%), 4 = Nocivo (>99%); ⁶Inseticida nocivo pela metodologia da IOBC.

4.3.2 Caule

Para a variável número de ovos parasitados (Tabela 4), bioensaios VI a X, verificou-se um parasitismo entre 18,03 a 28,17 ovos por fêmea para os tratamentos contendo caule de híbridos de milho. Os tratamentos causaram reduções no parasitismo de *T. pretiosum* que variaram de 1,27 a 8,72%, sendo classificados como inócuos (classe 1) e que representam 100 % dos híbridos testados. Somente o padrão positivo Lannate BR diferiu quanto aos tratamentos com caule, causando redução de 100 % no parasitismo de *T. pretiosum* (classe 4) em todos os bioensaios com caule.

Em média a concentração de proteínas expressas no caule de híbridos de milho transgênico é de 6,4 a 16,4 ng/mg de peso seco, ocorrendo variação conforme o híbrido (AAB, 2012).

Fluidos vegetais pertencentes ao floema, xilema e mesmo néctar extrafloral tem a possibilidade de extravasarem de plantas. Deste modo podem ser acessíveis a parasitoides de ovos, os mesmos podem conter proteínas de culturas geneticamente modificadas (GM) (SHI et al., 1994; BERNAL et al., 2002; KANRAR et al., 2002). Porém muito poucas observações estão disponíveis em relação aos parasitoides de ovos em geral alimentando-se de fluidos de tecidos danificados no campo (KELLER et al., 1985; WELLINGA et al., 1989).

Estudos experimentais utilizando fêmeas do gênero *Trichogramma* que tiveram acesso ao floema e seiva de milho, concluíram que a média geral de parasitismo foi menor do que fêmeas alimentadas diariamente com pólen ou honeydew (ZIMMERMANN et al., 2004). Tais dados conferem com os dados obtidos no presente estudo onde o máximo parasitismo obtido por fêmea nos bioensaios envolvendo caule foi de 28,17 ovos, já envolvendo pólen o maior parasitismo foi de 28,42 ovos por fêmea. A diferença não foi significativa, porém essa pequena variação de parasitismo pode ser explicada devido ao teor baixo de açúcares existentes na seiva e floema, em comparação com néctares e pólen. Porém essa tendência de maior parasitismo nos tratamentos envolvendo pólen não se confirmou em todos os tratamentos do presente estudo. Ainda ocorre a presença frequente de compostos secundários da planta, incluindo as lectinas de culturas GM, porém não abrangido na presente pesquisa (SHI et al., 1994; KANRAR et al., 2002).

Os dados atuais não indicam que a seiva da planta e fluidos de tecidos da mesma tem efeito sobre parasitoides de ovos, no caso de *T. pretiosum*. Além disso, as proteínas vegetais geneticamente modificadas são conhecidas por ocorrer no floema e seiva principalmente (SHI et al., 1994; BERNAL et al., 2002; KANRAR et al., 2002), sendo sua presença uma ferramenta necessária para a proteção contra pragas. Considerando também que a ação das mesmas é dependente de um promotor específico utilizado para expressar as diferentes proteínas existentes no mercado em vários híbridos de milho transgênico (BERNAL et al., 2002), tal tecnologia parece se caracterizar pela ausência de efeitos em organismos não alvo nas presentes condições.

Tabela 4 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do caule de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios VI a X) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/proteína expressa) | DC ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|---|-----------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio VI | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 188,66 \pm 13,69 a | 18,96 \pm 0,80 a | - | - |
| AS1551 | - | - | 194,44 \pm 24,29 a | 18,24 \pm 2,07 a | 3,80 | 1 |
| AS1551 VT PRO (Cry 1A. 105 + Cry2Ab2) | - | - | 179,76 \pm 24,36 a | 18,07 \pm 2,65 a | 4,69 | 1 |
| BG7060 | - | - | 197,59 \pm 18,47 a | 18,03 \pm 1,94 a | 4,91 | 1 |
| BG7060Y (Cry1Ab) | - | - | 170,71 \pm 9,77 a | 18,72 \pm 1,22 a | 1,27 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 165,71 \pm 38,62 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |
| Bioensaio VII | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 164,15 \pm 10,99 a | 21,44 \pm 0,83 a | - | 1 |
| AG8011 | - | - | 153,41 \pm 14,31 a | 20,84 \pm 0,55 a | 2,80 | 1 |
| AG8011YG (Cry1Ab) | - | - | 205,28 \pm 18,58 a | 20,81 \pm 1,18 a | 2,94 | 1 |
| AS1551 | - | - | 216,32 \pm 20,01 a | 20,61 \pm 1,60 a | 3,87 | 1 |
| AS1551 YG (Cry1Ab) | - | - | 209,12 \pm 14,60 a | 20,87 \pm 0,96 a | 2,66 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 213,44 \pm 26,50 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

Tabela 4 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do caule de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios VI a X) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/proteína expressa) | DC ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|--|-----------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio VIII | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 164,83 \pm 12,93 a | 30,26 \pm 1,37 a | - | - |
| 30F53 | - | - | 130,13 \pm 30,58 a | 27,77 \pm 2,37 a | 8,23 | 1 |
| 30F53H (Cry1F PAT) | - | - | 140,80 \pm 16,54 a | 27,62 \pm 2,36 a | 8,72 | 1 |
| 32R48 | - | - | 155,29 \pm 14,21 a | 28,17 \pm 1,43 a | 6,91 | 1 |
| 32R48H (Cry1F PAT) | - | - | 162,37 \pm 22,85 a | 27,75 \pm 3,81 a | 8,30 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 124,54 \pm 38,70 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |
| Bioensaio VIX | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 194,82 \pm 4,56 a | 21,82 \pm 0,35 a | - | - |
| Status | - | - | 177,75 \pm 8,51 a | 21,36 \pm 1,61 a | 2,11 | 1 |
| Status TL (Cry1Ab PAT) | - | - | 168,07 \pm 5,31 a | 20,50 \pm 1,24 a | 6,05 | 1 |
| Status | - | - | 192,71 \pm 15,95 a | 21,18 \pm 1,86 a | 2,93 | 1 |
| Status Viptera (VIP3Aa20) | - | - | 173,82 \pm 22,26 a | 20,74 \pm 2,15a | 4,95 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 169,68 \pm 10,33 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

Tabela 4 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do caule de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios VI a X) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012

| Produto comercial (ingrediente ativo/proteína expressa) | DC. ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|---|------------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio X | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 219,07 \pm 15,64 a | 25,41 \pm 1,86 a | - | - |
| DKB390 | - | - | 194,37 \pm 11,72 a | 24,12 \pm 2,43 a | 5,08 | 1 |
| DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 - EPSPS) | - | - | 207,92 \pm 10,52 a | 24,05 \pm 1,57 a | 5,33 | 1 |
| DKB330 | - | - | 217,14 \pm 7,42 a | 23,94 \pm 0,45 a | 5,79 | 1 |
| DKB330YG (Cry1Ab) | - | - | 201,52 \pm 19,78 a | 23,30 \pm 2,01 a | 8,30 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 186,07 \pm 20,82 a | 0,00 \pm 0,00 a | 100,0 | 4 |

¹Dosagem do produto comercial (kg ou L.ha⁻¹), registrado no MAPA, para a cultura do milho no Brasil. ²Concentração (%) de ingrediente ativo na calda utilizada para os bioensaios; ³Médias seguidas por letras idênticas não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Tukey, expressando a média de quatro repetições por tratamento; ⁴RP= Redução do parasitismo comparado com a testemunha negativa (água destilada) utilizada no bioensaio; ⁵Classes da IOBC: 1- Inócuo (<30%), 2= Levemente nocivo (30-79%) 3= Moderadamente nocivo (80-99%), 4 = Nocivo (>99%); ⁶Inseticida nocivo pela metodologia da IOBC.

4.3.3 Pólen

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com pólen de milho em todos os bioensaios realizados (Tabela 5) (bioensaios XI a XV), verificando-se um parasitismo que variou de 18,30 a 28,42 ovos por fêmea. O pólen causou reduções no parasitismo de *T. pretiosum* que variaram de 0,61 a 7,57% sendo classificados como inócuos (classe 1) e que representam 100 % dos híbridos testados. Unicamente o tratamento envolvendo o inseticida Lannate BR diferiu dos tratamentos com pólen em todos os cinco tratamentos. Em todos os cinco bioensaios o mesmo causou uma redução de 100 % no parasitismo de ovos, sendo classificado como nocivo (classe 4).

Em média a concentração de proteínas expressas no pólen de híbridos de milho transgênico é de 3,0 a 25,0 ng/mg de peso seco, ocorrendo variação conforme o cultivar (AAB, 2012). Ainda Trevisan (2010) confirmou a presença do gene que expressa a proteínas Cry1Ab, no pólen de cultivares transgênicas conforme a norma ISO 21569 de 2005.

A planta de milho produz grandes quantidades de pólen, isto é, cada pendão produz até 50 milhões de grãos de pólen durante um período de 5-8 dias. Durante a antese, o pólen do milho é um recurso alimentar abundante (ANDOW; RISCH, 1987; KNUTSON, 1998). Diversos autores confirmaram a alimentação de adultos de *Trichogramma* spp. com pólen (KNUTSON, 1998; SHEARER; ATANASSOV, 2004; ZHANG et al., 2004). Por conseguinte, ele também é utilizado como alimento por um número elevado de espécies predadoras.

No caso da proteína que está sendo expressa no pólen de variedades de milho *Bt*, deve ser tomado em consideração como uma importante via de exposição junto aos organismos não alvo necessitando investigação (ZHANG et al., 2004).

Estudos realizados por Li et al. (2008) em adultos de *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Chrysopidae), espécie que é prevalentemente polífaga em campos de milho, expôs os mesmos às proteínas inseticidas que são expressas no pólen da planta geneticamente modificada. As plantas possuíam diferentes toxinas Cry derivadas de *Bt*. Osexperimentos foram realizados para avaliar o impacto das proteínas Cry3Bb1 ou Cry1Ab, eventos (MON 88017, Bt176) do pólen. Os adultos foram alimentados com pólen de variedades de milho *Bt* ou seu correspondente em conjunto com a solução de sacarose durante 28 dias.

Parâmetros biológicos como: sobrevivência, período de pré-oviposição, fecundidade, fertilidade e peso seco não foram diferentes entre os tratamentos *Bt* e não-*Bt* de pólen de milho. Em ambos os ensaios de alimentação, a estabilidade e bioatividade de proteínas Cry nas fontes alimentares, bem como a captação por *C. carnea* foi confirmada. Estes resultados mostram que a sobrevivência e aptidão de adultos de *C. carnea* não são afetadas pelo pólen de milho *Bt* e sua isolinha não transgênica. Resultados que corroboram com os obtidos na presente pesquisa com *T. pretiosum*, onde a sobrevivência, o parasitismo e a razão sexual não foram afetados (Tab. 5).

Efeitos do pólen de algodão transgênico expressando a proteína Cry1Ac em adultos de *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) foram avaliados em laboratório, estudando sobrevivência, longevidade e razão sexual (GENG et al., 2006). Os parasitoides foram alimentados com suspensão de pólen da planta transgênica de algodão em água (20mg/ml de água) ou mel a 10% não diferindo significativamente daqueles alimentados com suspensão de pólen em água ou de mel a 10% de plantas de algodão convencional. Os autores observaram que não houve efeitos prejudiciais sobre os parâmetros biológicos da espécie. Quanto a sobrevivência e parasitismo, tal dado coincide com os da presente pesquisa, onde tais parâmetros não foram afetados pelos tratamentos contendo pólen (Tabela 5).

Um estudo de Kaatz (2005) revelou que as abelhas alimentadas com pólen de milho *Bt* mostraram-se mais susceptíveis à infecção ao filo de fungo microsporídeo. O autor concluiu que as diferenças significativas (entre as colônias alimentadas com pólen de milho *Bt* e aquelas alimentadas com pólen da cultivar isogênica) indicam uma interação da toxina e do patógeno nas células epiteliais do canal alimentar das abelhas”, cujo mecanismo de ação é desconhecido.

Trabalho de Ramirez-Romero et al. (2008) revelaram que abelhas alimentadas com pólen de milho *Bt* podem ser afetadas no comportamento de busca das fontes de néctar com moléculas odoríferas. A abundância e riqueza de espécies de abelhas silvestres existente no país (SILVEIRA; CAMPOS, 1995; SILVEIRA et al., 2002), torna esse grupo de abelhas importante para as avaliações de risco das plantas *Bt*. Notadamente desta forma, além de *Apis mellifera* (Linneu, 1758)(Hymenoptera: Apidae) outras espécies de abelhas silvestres devem ser incluídas na avaliação de risco das proteínas *Bt*.

Especial atenção tem sido dada à borboleta monarca, *Danaus plexippus* (Linneu) (Lepidoptera: Papilionidae) depois que estudos mostraram alta mortalidade

desta espécie quando as lagartas se alimentaram de folhas de *Asclepias* spp. contendo pólen de milho *Bt* (LOSEY et al., 1999). Entretanto, alguns fatores podem reduzir esta exposição, ou seja, a ocorrência de chuva pode remover 54-86% do pólen das folhas. Folhas da porção superior, principal local de alimentação dos primeiros ínstaes da monarca, têm 30-50% da densidade de pólen das folhas da porção intermediária, e os primeiros ínstaes não se alimentam das nervuras das folhas, cuja densidade de pólen é 1,5-1,9 vezes maior (PLEASANTS et al., 2001). No entanto, o pólen de milho *Bt* não afetou a espécie *Papilio polyxenes* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Papilionidae) em condições de laboratório e de campo (WRAIGHT et al., 2000).

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

Devido às altas produções de pólen por plantas de milho, disseminação a grandes distâncias do mesmo por vento, existir consideráveis concentrações de proteínas Cry expressas no pólen de milho transgênico (ALVARES-ALFAGEME, 2008) e *T. pretiosum* utilizar-se do polén como fonte de nutrientes (ZHANG et al., 2004); é imprescindível investigar o efeito do mesmo sobre parâmetros biológicos mais específicos de *T. pretiosum*.

Tabela 5 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do pólen de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios XI a XV) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/ proteína expressa) | DC ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|--|-----------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio XI | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 185,14 \pm 22,84 a | 19,26 \pm 1,42 a | - | - |
| AS 1551 | - | - | 193,15 \pm 16,43 a | 18,73 \pm 1,23 a | 2,75 | 1 |
| AS1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry 2Ab2) | - | - | 181,87 \pm 11,06 a | 18,55 \pm 0,48 a | 3,69 | 1 |
| BG 7060 | - | - | 193,51 \pm 13,45 a | 19,13 \pm 0,67 a | 0,67 | 1 |
| BG 7060Y (Cry1Ab) | - | - | 150,92 \pm 14,42 a | 19,10 \pm 2,95 a | 0,83 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 182,67 \pm 5,09 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |
| Bioensaio XII | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 120,84 \pm 7,10 a | 28,63 \pm 0,70 a | - | - |
| AG 8011 | - | - | 132,41 \pm 20,33 a | 28,42 \pm 1,02 a | 0,73 | 1 |
| AG 8011YG (Cry1Ab) | - | - | 102,01 \pm 1,95 a | 26,94 \pm 1,66 a | 5,90 | 1 |
| AS 1551 | - | - | 121,35 \pm 3,97 a | 28,15 \pm 0,69 a | 4,48 | 1 |
| AS 1551 YG (Cry1Ab) | - | - | 119,39 \pm 6,35 a | 27,20 \pm 1,14 a | 4,99 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 103,27 \pm 4,85 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

Tabela 5 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do pólen de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios XI a XV) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/ proteína expressa) | DC ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|--|-----------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio XIII | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 174,07 \pm 13,49 a | 26,14 \pm 1,67 a | - | - |
| 30F53 | - | - | 171,73 \pm 6,20 a | 25,98 \pm 0,46 a | 0,61 | 1 |
| 30F53H (Cry1F PAT) | - | - | 172,51 \pm 13,69 a | 25,71 \pm 1,31 a | 1,64 | 1 |
| 32R48 | - | - | 168,02 \pm 16,71 a | 24,99 \pm 1,45 a | 4,39 | 1 |
| 32R48H (Cry1F PAT) | - | - | 150,14 \pm 6,31 a | 25,42 \pm 1,09 a | 2,75 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 154,74 \pm 26,63 a | 0,02 \pm 0,01 b | 100,0 | 4 |
| Bioensaio XIV | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 155,29 \pm 5,50 a | 23,28 \pm 0,43 a | - | - |
| Status | - | - | 154,80 \pm 8,05 a | 22,69 \pm 0,64 a | 2,53 | 1 |
| Status TL (Cry1Ab PAT) | - | - | 181,04 \pm 6,04 a | 22,11 \pm 0,34 a | 5,04 | 1 |
| Status | - | - | 158,68 \pm 14,00 a | 22,76 \pm 2,47 a | 2,47 | 1 |
| Status Viptera (VIP3Aa20) | - | - | 156,63 \pm 15,23 a | 22,46 \pm 0,86 a | 3,51 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 152,58 \pm 10,34 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

Tabela 5 – Número médio de fêmeas por gaiola e efeito do pólen de híbridos de milho transgênico e seus respectivos isogênicos (bioensaios XI a XV) sobre o número (\pm EP) de ovos parasitados por fêmeas, redução (%) na capacidade de parasitismo de adultos de *Trichogramma pretiosum* e classificação de toxicidade segundo IOBC em condições de laboratório (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$; umidade relativa de $70\pm 10\%$, fotofase de 14 horas). Pelotas-RS. 2011/2012.

| Produto comercial (ingrediente ativo/proteína expressa) | DC. ¹ | C.i.a. ² | Fêmeas por gaiolas ³ | Ovos parasitados por fêmea ³ | RP ⁴ | Classe IOBC ⁵ |
|---|------------------|---------------------|---------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| Bioensaio XV | | | | | | |
| Água destilada (testemunha negativa) | - | - | 246,71 \pm 25,49 a | 19,80 \pm 2,08 a | - | - |
| DKB390 | - | - | 271,80 \pm 13,42 a | 18,75 \pm 0,77 a | 5,30 | 1 |
| DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 – EPSPS) | - | - | 252,32 \pm 10,57 a | 18,30 \pm 0,90 a | 7,57 | 1 |
| DKB330 | - | - | 286,70 \pm 28,77 a | 19,55 \pm 2,77 a | 3,18 | 1 |
| DKB330YG (Cry1Ab) | - | - | 264,68 \pm 26,41 a | 19,77 \pm 1,83 a | 2,08 | 1 |
| Lannate BR (metomil) ⁶ | 0,600 | 0,0129 | 208,86 \pm 19,91 a | 0,00 \pm 0,00 b | 100,0 | 4 |

¹Dosagem do produto comercial (kg ou L.ha⁻¹), registrado no MAPA, para a cultura do milho no Brasil. ²Concentração (%) de ingrediente ativo na calda utilizada para os bioensaios; ³Médias seguidas por letras idênticas não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Tukey, expressando a média de quatro repetições por tratamento; ⁴RP= Redução do parasitismo comparado com a testemunha negativa (água destilada) utilizada no bioensaio; ⁵Classes da IOBC: 1- Inócuo (<30%), 2= Levemente nocivo (30-79%) 3= Moderadamente nocivo (80-99%), 4 = Nocivo (>99%); ⁶Inseticida nocivo pela metodologia da IOBC.

4.4 Conclusão

Os 10 híbridos transgênicos de milho (proteína expressa) e seus isogênicos (não transgênicos) testados nos bioensaios expondo folha, caule e pólen ao parasitoide *T. pretiosum*; adaptando-se a metodologia da IOBC, classificados: AG 8011YG (Cry1Ab), BG7060Y (Cry1Ab), AS 1551 YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry2Ab2), DKB330YG (Cry1Ab), DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 - EPSPS), 30F53H (Cry1F PAT), 32R48H (Cry1F PAT), Status TL (Cry1Ab PAT), Status Viptera (VIP3Aa20) são inócuos (classe 1) a adultos de *T. pretiosum*.

5 Capítulo 2 - Efeito do pólen de milho transgênico sobre parâmetros biológicos de adultos de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

5.1 Introdução

A utilização de milho geneticamente milho transgênico no Brasil ocupa uma área aproximada de 13,5 milhões de hectares, sendo 6,9 e 5,2 milhões de hectares destinados a primeira e segunda safra, respectivamente com rendimento médio de 5.259 Kg ha⁻¹ e produção de mais de 71 milhões de toneladas (IBGE, 2012).

Dentre os principais insetos-praga na cultura do milho na fase vegetativa e reprodutiva, destacam-se a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae), os quais causam danos diretos e indiretos à cultura (RODRIGUES; SILVA, 2011).

Com o advento da biotecnologia, uma das estratégias de supressão populacional e controle de insetos praga na cultura do milho é baseada na utilização de plantas geneticamente modificadas. Nessas plantas foram introduzidos genes específicos de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bacillaceae) que levam à produção de proteínas tóxicas aos insetos, representando uma nova abordagem no controle de pragas. Logo, os materiais geneticamente modificados tem cada vez mais presença e relevância na agricultura brasileira (FRIZZAS, 2003).

No grupo dos inimigos naturais dessas pragas da cultura do milho, destaca-se o parasitoide de ovos do gênero *Trichogramma* (SÁ; PARRA, 1993; CRUZ, 1995). Os quais podem atacar inúmeras espécies de pragas agrícolas e florestais, principalmente da ordem Lepidoptera, sendo utilizados em programas de controle biológico de pragas em várias culturas e em diversos países (SMITH, 1996; HASSAN, 1997; PARRA; ZUCCHI, 2004; NAVA; NACHTIGAL, 2010). Estes parasitoides apresentam como vantagens a eficiência no controle e a facilidade de criação em laboratório, utilizando-se diferentes hospedeiros alternativos (CRUZ, 1995). O fato de parasitoides do gênero *Trichogramma* controlarem as pragas ainda

na fase de ovo, antes de causarem qualquer dano à cultura, é uma das principais vantagens do seu emprego.

Adultos de *Trichogramma* spp. podem obter nutrientes a partir do néctar e pólen de plantas (KNUTSON, 1998; ZHANG et al., 2004), o que aumenta a sua longevidade, fecundidade (HOHMANN et al., 1988; SHEARER; ATANASSOV, 2004), propensão de voo (FORSSE et al., 1992) e capacidade de parasitar (SAAVEDRA et al., 1997). A importância de néctar para os parasitoides é reconhecida, pois melhora sua nutrição e a sua capacidade de parasitismo em campo de lepidópteros-praga (NAGARKATTI et al., 2003; BEGUM et al., 2006).

A liberação de pólen de plantas de milho transgênico expõe organismos não alvo a toxina de *B. thuringiensis* (*Bt*) de forma direta ou indireta. A preocupação com o possível efeito de plantas transgênicas a indivíduos não alvo expressando transgenes de *Bt* surgiu após a publicação de Losey et al. (1999) sobre o risco potencial de pólen de milho expressando a proteína Cry para a borboleta Monarca, *Danaus plexippus* (Linneu, 1758) (Lepidoptera: Nymphalidae). Pesquisa colaborativa a partir de cientistas nos Estados Unidos e no Canadá sugere que o impacto do pólen de milho *Bt* a partir de híbridos de milho comerciais em populações de borboletas Monarca é insignificante (HELLMICH et al., 2001; PLEASANTS et al., 2001; SHELTON; SEARS, 2001).

Muitos autores estudaram o potencial de efeitos do pólen de milho transgênico sobre predadores (PILCHER et al., 1997; DUAN et al., 2002), e também para insetos benéficos, tais como abelhas, *Apis mellifera* (Linneu, 1758) (Hymenoptera: Apidae) (HANLEY et al., 2003; BABENDREIER et al., 2005). Pesquisas envolvendo estudos com *Trichogramma* spp. e possíveis efeitos em relação ao milho transgênico foram efetuadas por vários autores em diversos países (ZHANG et al. 2004; GENG ET al. 2006; WANG et al. 2007).

Devido a ampliação dos cultivos com plantas transgênicas, opiniões surgem do possível impacto negativo sobre espécies não alvo, biodiversidade e equilíbrio ecológico (DABROWSKI, 2007). Nesse sentido, a entomofauna benéfica, sobretudo a guilda dos parasitoides de ovos e larvais, pode ser afetada negativamente e necessita ser preservada, pois são importantes agentes de controle biológico de pragas.

A integração do controle biológico e de novos métodos de controle biotecnológicos necessita, portanto, ser validada a partir de testes permitindo assim

a preservação da comunidade de insetos benéficos no sistema de produção. Dessa forma, *Trichogramma pretiosum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é um importante indicador em testes de possível efeito de milho transgênico, pois está associado à cultura do milho como importante inimigo natural (MOLINA-OCHOA et al., 2003) de lepidópteros-praga.

Os efeitos secundários de pólen de milho *Bt* expressando diferentes toxinas não são conhecidos em *T. pretiosum*, desta forma o objetivo deste estudo foi determinar se o pólen de híbridos de milho transgênico produz um risco potencial para este parasitoide analisando parâmetros biológicos de *T. pretiosum*.

5.2 Materiais e Métodos

Para execução dos bioensaios os parasitoides foram obtidos de criação mantida em laboratório utilizando ovos do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) para multiplicação de *T. pretiosum* (PARRA; ZUCCHI, 1997). Os bioensaios foram conduzidos em salas com ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotofase (14 horas).

5.2.1 Híbridos de milho transgênico avaliados

Foram avaliados três híbridos de milho transgênico, inscritos no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), cujas identificações, como: marca, híbrido, proteína expressa, nome comercial da tecnologia, evento e ciclo estão expressas na Tab. 1.

Tabela 1 – Híbridos de milho transgênico inscritos no Registro Nacional de Cultivares (RNC); provedores de pólen para os testes de efeito sobre parâmetros biológicos de *Trichogramma pretiosum*. Pelotas-RS. 2011/2012.

| Marca | Híbrido | Proteína expressa | Nome Comercial | Evento | Ciclo ¹ |
|----------|----------------|-----------------------|------------------|----------|--------------------|
| Agrocere | AG 8011YG | Cry1Ab | Yeld Gard | MON810 | P |
| Agroeste | AS 1551 VT PRO | Cry1A. 105 + Cry 2Ab2 | PRO | MON89034 | SP |
| Syngenta | Status Viptera | VIP3Aa20 | Viptera - MIR162 | MIR162 | P |

Ciclo¹ = P (precoces), SP (super precoces).

5.2.2 Parasitismo de ovos do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella*

Para obtenção do parasitoide, foi colocado cartão de papel cartolina contendo ovos de *A. kuehniella* em cilindros de vidro (25 cm de comprimento x 10 cm de diâmetro) que continham adultos de *T. pretiosum*. Cada cartão possuía 60 círculos de 1 cm de diâmetro, (Figura 1A) confeccionado com 400 ± 50 ovos de *A. kuehniella* cada um (Figura 1B). Após o parasitismo, os adultos foram descartados e os cartões foram acondicionados em câmaras climatizadas adequadas para o desenvolvimento de *T. pretiosum*.

5.2.3 Obtenção do pólen de milho

O pólen de milho utilizado nesse estudo foi originário de três diferentes híbridos de milho transgênico, cada qual expressando uma respectiva proteína (Tabela 1). O pólen dos híbridos transgênicos e seus isogênicos foram coletados diretamente de plantas de milho cultivadas em casa de vegetação. Sacos de papel vegetal foram amarrados sobre o pendão da planta por 6 a 7 dias, sendo posteriormente removidos e o pólen seco ao ar por 24 horas e peneirado (malha de 200µm, retirando anteras e outros contaminantes) (Figura 1C). Posteriormente foi colocado em frascos plásticos e armazenado a -20°C até sua utilização (JESSE; OBRYCKI, 2000).

5.2.4 Preparo dos tratamentos (dietas)

Os tratamentos consistiram em (dietas). A testemunha foi composta por mel, três tratamentos contendo 20 mg de pólen dos diferentes híbridos de milho transgênico (Tabela 1), expressando diferentes proteínas + 1ml de mel. Três tratamentos contendo 20 mg de pólen das respectivas isolinhas + 1ml de mel. Todas as fontes de alimento foram renovadas diariamente.

5.2.5 Execução do experimento

Para a execução do experimento, foram individualizadas, em cada tratamento 20 fêmeas do parasitoide, recém-emergidas e sem deformação, totalizando (20 repetições). As mesmas foram acondicionadas em tubos de Duran, contendo os diferentes tratamentos. Para a testemunha foi oferecido apenas mel puro. A cada 24 horas foi oferecido para cada fêmea, cartelas de papel cartolina azul celeste (2,5 x 0,5 cm), contendo 40 ovos do hospedeiro alternativo *A. kuehniella* colados com goma arábica a 10% e inviabilizados em lâmpada germicida por 1 hora (Figura 1D). Os tubos foram posteriormente lacrados com filme plástico de PVC para evitar a fuga dos parasitoides e furados com alfinete entomológico número zero para possibilitar a aeração (Figura 1E). As cartelas contendo os ovos parasitados de cada dia foram armazenadas em tubos de vidro em sala climatizada.

5.2.6 Análise dos resultados obtidos

Após a morte dos descendentes, avaliou-se sob microscópio estereoscópico o número de ovos parasitados (Figura 1F); ovos com orifício; parasitoides emergidos e número de machos e fêmeas dos descendentes. Posteriormente, o número de ovos parasitados e a viabilidade foram expressos em porcentagem. A razão sexual foi determinada através da proporção de fêmeas na população. Os parâmetros analisados foram: longevidade, parasitismo total, viabilidade de emergência e razão sexual.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (quando F significativo) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

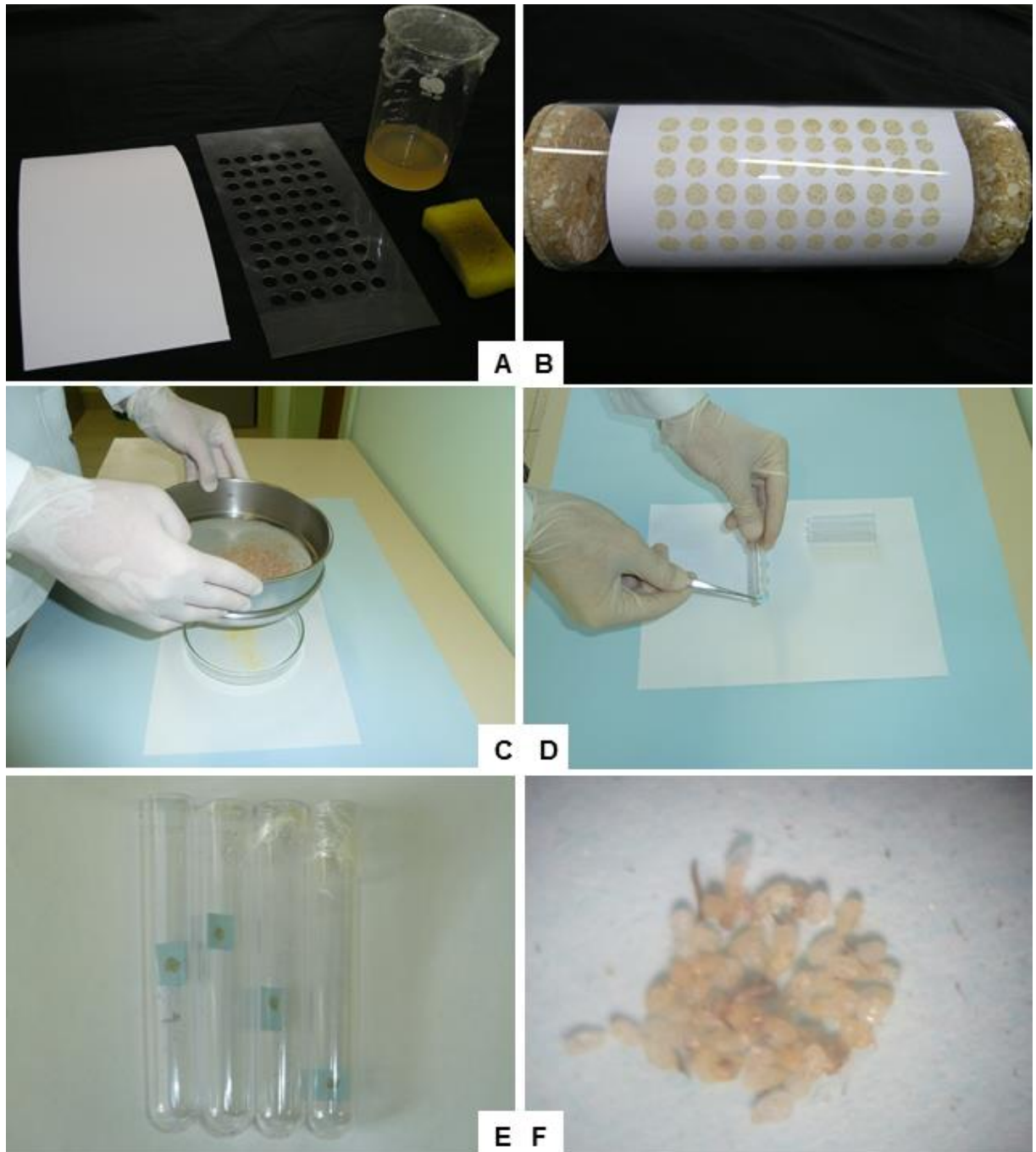


Figura 1 - Detalhes da condução dos bioensaios com *Trichogramma pretiosum*. A) Preparo dos cartões com goma arábica, lâmina perfurada, cartolina e ovos de *Anagasta kuehniella*; B) Ovos de *A. kuehniella* aderidos aos cartões no interior dos recipientes de vidro; C) Peneiramento do pólen das plantas de milho; D) Inserção dos círculos com 40 ovos de *A. kuehniella* em tubos de Duran; E) Tubos de Duran contendo fêmeas de *T. pretiosum* cartelas com ovos para parasitismo; F) Contagem dos ovos parasitados e adultos emergidos em lupa estereoscópica. Pelotas-RS. 2011/2012.

5.3 Resultados e Discussão

Os tratamentos não afetaram significativamente a longevidade das fêmeas de *T. pretiosum*, ($F=1,96$; $gl=6$; $p=0,07$) quando alimentadas com sete diferentes dietas (tratamentos) (Tabela 2). Sendo observados valores que variaram de 14,80 a 15,33 dias. Estes resultados sugerem que o pólen de milho *Bt* não afetou a longevidade de fêmeas adultas de *T. pretiosum*.

De modo semelhante, a pesquisa realizada por Peter e Atanas (2004), em fêmeas adultas de *Trichogramma minutum* (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae), que se alimentaram de pólen extra floral não tiveram sua longevidade reduzida, observando média de 11,5 dias de vida. Zhang et al. (2004) relataram que fêmeas de *Trichogramma brassicae* (Westwood, 1883), (Hymenoptera: Trichogrammatidae), alimentada com pólen de milho e água, tiveram aumentada significativamente a longevidade e fecundidade em comparação com os de alimentação em água somente. Contudo, as vespas alimentadas com uma mistura de pólen e mel tiveram longevidade e fecundidade semelhante àqueles alimentando-se de mel somente. Tais resultados corroboram com os dados obtidos em nossa pesquisa (Tabela 2).

Hanley et al. (2003) examinaram os efeitos da dieta de pólen de milho transgênico *Bt* em larvas de abelha com quatro a cinco dias de idade, e não observaram diferenças significativas na mortalidade de larvas e pupas bem como no peso das mesmas.

Abelhas adultas que foram alimentadas com pólen de milho *Bt* ou uma solução de açúcar contendo a proteína purificada Cry1Ab na concentração de (0,0014% w/v) e nas concentrações de (0,1% e 1% w/v) não apresentaram qualquer efeito sobre a sobrevivência dos indivíduos após serem alimentadas durante 10 dias. A concentração de proteínas na hemolinfa foi verificada depois que os adultos foram alimentados com pólen de milho expressando as proteínas Cry1Ab ou Cry1F (MON 8010) (BABENDREIER et al., 2005).

Pilcher et al. (1997) relataram que o pólen de milho *Bt* não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos inimigos naturais predadores: *Coleomegilla maculata* (De Geer, 1775) (Coleoptera: Coccinelidae), *Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Chrysopidae) e *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Antocoridae) em agroecossistemas.

Tabela 2 - Efeito do pólen de híbridos de milho transgênico sobre parâmetros biológicos de *Trichogramma pretiosum* parasitando ovos de *Anagasta kuehniella*. Pelotas-RS. 2011/2012.

| Tratamento | Proteína expressa | Longevidade (Dias) ¹ | Parasitismo Total ^{1,2} | Viabilidade de emergência (%) ¹ | Razão sexual ¹ |
|------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------|
| Testemunha (Mel) | - | 14,80 ± 0,20 a ¹ | 79,90 ± 2,75 a | 97,30 ± 0,10 a | 0,72 ± 0,02 a |
| AG 8011YG | Cry1Ab | 15,13 ± 0,20 a | 79,21 ± 1,29 a | 97,12 ± 0,30 a | 0,70 ± 0,02 a |
| AG 8011 | - | 14,80 ± 0,24 a | 76,72 ± 1,83 a | 96,97 ± 0,44 a | 0,73 ± 0,02 a |
| AS 1551 VT PRO | Cry1A. 105 + Cry 2Ab2 | 15,13 ± 0,09 a | 76,60 ± 1,30 a | 98,20 ± 0,11 a | 0,70 ± 0,01 a |
| AS 1551 | - | 15,33 ± 0,12 a | 74,90 ± 2,12 a | 96,65 ± 0,40 a | 0,73 ± 0,02 a |
| Status Viptera | VIP3Aa20 | 14,93 ± 0,06 a | 74,82 ± 1,25 a | 96,00 ± 0,43 a | 0,71 ± 0,02 a |
| Status | - | 15,14 ± 0,09 a | 76,41 ± 1,94 a | 97,15 ± 0,40 a | 0,70 ± 0,02 a |

¹ Médias (±) seguidas de letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade;

² Média do parasitismo acumulado por fêmea.

A capacidade de parasitismo diário de *T. pretiosum* em ovos de *A. kuehniella* não foi prejudicado na presente pesquisa mediante o fornecimento de dieta com mel mais pólen (expressando diferentes proteínas) e mel mais pólen dos híbridos convencionais (Figura 2). O parasitismo em todos os tratamentos no primeiro dia se situou entre 20 a 23 ovos (45 a 50%). Ocorreu um decréscimo variando de 10 a 13 ovos já no segundo dia (25 a 35 %), diminuindo nos dias subsequentes (Figura 2). A queda do parasitismo verificada para *T. pretiosum* é uma característica dessa espécie, pois esse parasitoide concentra as posturas nos primeiros três dias de vida (PRATISSOLI et al. (2006). A média do parasitismo acumulado em cada tratamento por fêmea se situou entre 74,82 a 79,9 ovos.

A ausência de diferença significativa no parasitismo entre os tratamentos demonstra que as proteínas expressas no pólen de milho transgênico não afetam a taxa de parasitismo de ovos pelo parasitoide, seguindo parâmetros biológicos normais. Esse fato concorda com os resultados obtidos por Wang et al. (2007), os quais verificaram que o parasitismo de ovos de *Ostrinia furnacalis* (Guenée, 1854) não foi prejudicado pela interação de *B. thuringiensis* com o parasitoide *Trichogramma ostriniae* (Pang e Chen, 1974) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de fornecimento de suspensão com mel e pólen oriundo de milho *Bt*. Geng et al. (2006), também constataram que *Trichogramma chilonis* (Ishii) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) alimentados com pólen proveniente de algodão *Bt* não reduz sua capacidade de parasitismo, longevidade e razão sexual, bem como a longevidade de seus descendentes.

Polanczyk et al. (2006) estudando o efeito da ingestão de *B. thuringiensis* em *Trichogramma* spp., observaram a não interferência de todos os isolados testados na longevidade para *Trichogramma pratissolii* (Querino e Zuchi, 2002) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *T. pretiosum* e que, alguns isolados diminuíram o tempo necessário para os parasitoides atingirem 80% da capacidade de parasitismo. *B. thuringiensis* acelerou o parasitismo, porém não influenciou o total de ovos parasitados, mostrando que pode ser utilizado em conjunto com *Trichogramma* spp. em futuros programas de MIP.

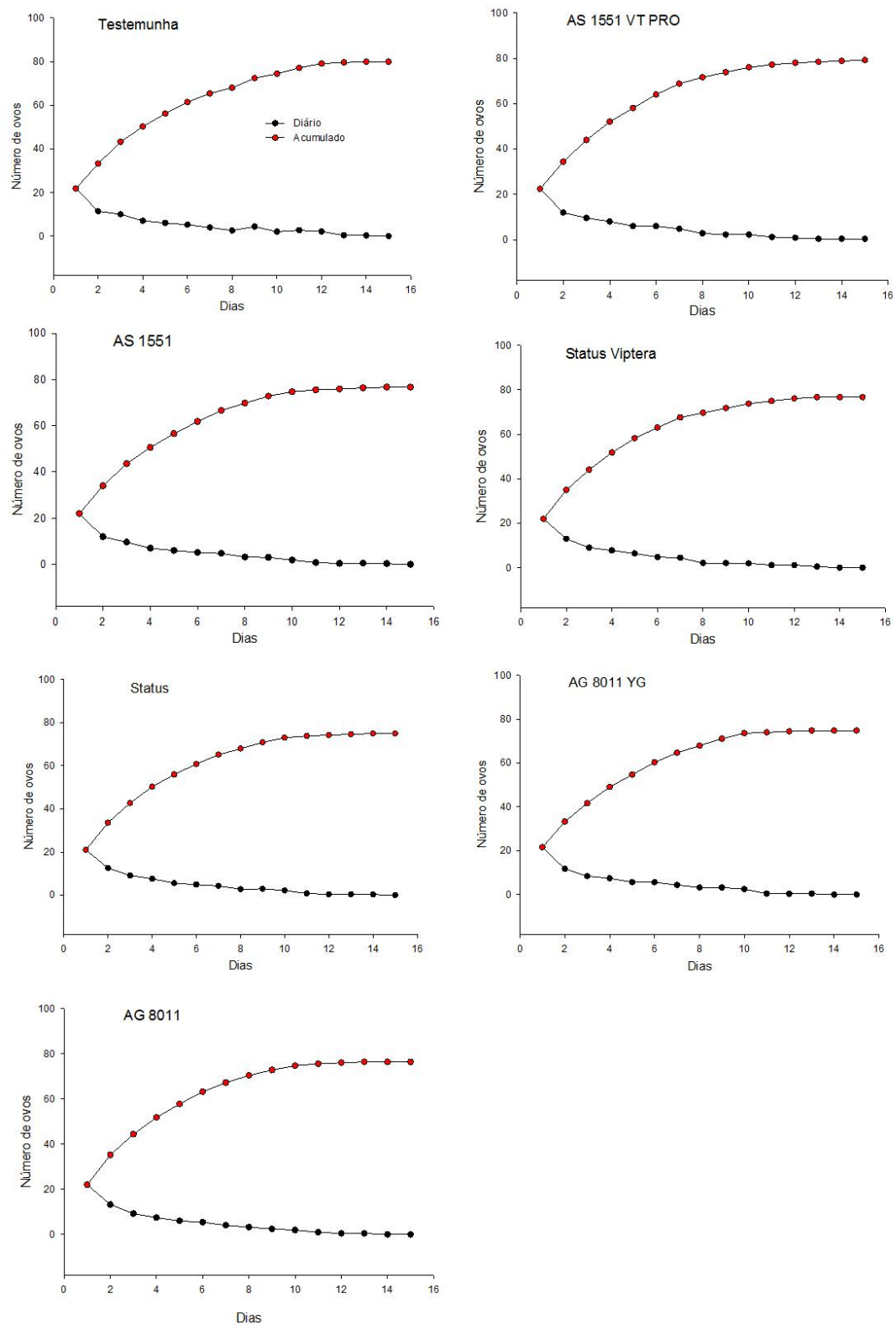


Figura 2 - Parasitismo diário e acumulado (número de ovos/dia) de *Trichogramma pretiosum* alimentado com mel acrescido de pólen de diferentes híbridos transgênicos e seus isogênicos. Pelotas-RS. 2011/2012.

Estudos realizados por Pratissoli et al., (2006a), utilizando *T. pratissolii* e aplicando *B. thuringiensis* no mel para alimentação dos parasitoides mostraram que alguns isolados causaram efeito sobre a emergência da progênie, havendo a necessidade de mais liberações massais do parasitoide para alcançar os resultados esperados em programas de controle biológico. Porém os mesmos autores não observaram efeito negativo de *Bt* no parasitismo, inclusive ressaltam que *B. thuringiensis* acelera o parasitismo inicial, resultados que se assemelharam aos da presente pesquisa onde no primeiro dia o parasitismo superou os 20 ovos (45%) (Figura 2). O efeito sinérgico pode ser justificado pelos diversos carboidratos presentes no mel e pólen, contribuindo nutricionalmente com o parasitoide e tendo resposta positiva no parasitismo (WANG et al., 2007).

Hassan e Krieg (1975) alimentando fêmeas de *Trichogramma cacoeciae* (Marcha, 1927) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) com mel contaminado com as preparações comerciais de *B. thuringiensis* verificou ausência de efeito significativo sobre a capacidade de parasitar ovos de *Sitotroga cerealella* (Olivier, 1819) (Lepidoptera: Gelechiidae).

Adultos de *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) que foram alimentados com uma solução de mel contendo 500 µg de *B. thuringiensis* var. *galleriae* HD-129 por 5 dias e não apresentaram qualquer efeito sobre longevidade, ou capacidade de parasitar ovos de *Spodoptera littoralis* (Boisduva, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) ou *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) (Salama & Zak, 1985). Tais dados conferem com os obtidos no presente estudo.

A pesquisa de campo indicou que não houve diferenças significativas na porcentagem de parasitismo, longevidade e mortalidade de adultos de *T. brassicae* emergentes de ovos de *O. Nubilalis* ovipositados em folhas de milho *Bt* ou isogênicos (MANACHINI; LOZZIA, 2004). Caracterizando neste caso a não influência do milho transgênico ao parasitoide ao abrangermos a pesquisa a um nível tritrófico.

A viabilidade de emergência dos adultos do parasitoide na presente pesquisa alcançou valores superiores a 95% em todos os tratamentos, não havendo diferença entre eles ($F=1,04$; $gl=6$; $p=0,42$) (Tabela 2). Esses resultados também demonstram efeitos não adversos dos tratamentos contendo pólen de milho transgênico sob *T. pretiosum* evidenciando o potencial de uso integrado dessas ferramentas. Esses

valores estão de acordo com os resultados obtidos por Sá e Parra (1993) e Pratissoli e Oliveira (1999), que obtiveram viabilidade média de 95 e 97% respectivamente, o que evidencia a adequação desse hospedeiro para o desenvolvimento de *Trichogramma*. Wang et al. (2007) comprovaram que a emergência de fêmeas de *T. ostrinae* não foi prejudicada pelo fornecimento de substrato alimentar contendo pólen oriundo de milho *Bt*, com valores similares ao encontrado no presente trabalho. Ao contrário dos resultados obtidos por Pratissoli et al. (2006a), que registraram diminuição do parasitismo na interação entre alguns isolados de *B. thuringiensis* e *T. pratissolii*.

Os valores obtidos para razão sexual na presente pesquisa com *T. pretiosum* também não diferiram entre os tratamentos analisados ($F=0,44$; $gl=6$; $p=0,84$), com índices variando de 0,70 a 0,73 (Tabela 2). Logo os tratamentos não influenciaram para reduzir os valores para baixo de 0,5, valor mínimo satisfatório para a razão sexual (NAVARRO, 1998).

O maior número de descendentes do sexo feminino foi obtido a partir dos ovos hospedeiros parasitados nos primeiros dias, independentemente dos tratamentos. Tais dados concordam com os resultados obtidos por Wang et al. (2007), em *T. ostrinae* alimentados com pólen de milho transgênico em dieta, onde a porcentagem do número de descendentes do sexo feminino se situou entre (75 e 85 %), decrescendo nos dias subsequentes. Tais valores obtidos para a razão sexual podem ser considerados satisfatórios para o uso em programas de controle biológico (NAVARRO, 1998).

5.4 Conclusão

Os tratamentos avaliados (dietas) não são prejudiciais ao desenvolvimento de fêmeas de *Trichogramma pretiosum*. Os híbridos transgênicos expressando diferentes proteínas: AG 8011YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry 2Ab2) e Status Viptera (VIP3Aa20), assim como seus respectivos híbridos isogênicos não tem efeitos negativos sobre a longevidade, parasitismo total, viabilidade de emergência e razão sexual de *T. pretiosum* em bioensaio de ingestão com pólen em condições de laboratório.

6 Discussão Geral

A adaptação da metodologia de trabalho proposta pela IOBC efetuada na primeira fase (capítulo 1) da pesquisa pôde ser utilizada de maneira eficiente para o parasitoidem *Trichogramma pretiosum*, Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). A mesma poderá ser utilizada futuramente por demais pesquisadores em âmbito nacional e internacional para padronização e comparação de dados, validando ainda mais tais protocolos.

De acordo com as classificações da IOBC e resultados das análises estatísticas utilizadas para os dados, foi concluído que a exposição de ovos a folha, a caule e ao pólen dos 10 híbridos de milho transgênico é inócua (classe 1) a *T. pretiosum* em condições de laboratório.

As plantas transgênicas ou plantas geneticamente modificadas que expressam genes com atividade inseticida estão cada vez mais sendo incluídas no manejo de pragas agrícolas nas culturas, principalmente o milho. Além disso, como essas tecnologias de transgenese utilizam piramidização de genes (retransformação genética de um OGM) é de suma importância elucidar o efeito sobre organismos benéficos não alvo (MARTINS et al., 2007).

Neste sentido, a realização desse trabalho é justificada pelas condições brasileiras, já que temos uma diversidade muito grande de inimigos naturais e muitas cultivares de milho transgênico, devido a grande extensão territorial do Brasil. Cerca de 70 % da semente de milho cultivada no País é transgênica. Logo o Brasil poderá ter grande benefícios se proteger a sua biodiversidade, principalmente dos inimigos naturais com a utilização de plantas de milho transgênicas inócuas aos inimigos naturais. Logo a metodologia deve continuar a ser testada e aperfeiçoada para as condições brasileiras.

Os 10 cultivares transgênicos de milho testados todos são adequados para programas de manejo integrado de pragas na cultura do milho pelos resultados da pesquisa realizada até o momento.

Vale ressaltar que no caso da utilização de plantas transgênicas sem incremento de áreas de refúgio com cultivares convencionais de milho, logo se terá

problemas de resistência dos insetos pragas as plantas transgênicas de milho. A utilização de cultivares transgênicas de milho inócuas aos inimigos naturais é de grande importância para retardar ou mesmo evitar esses fenômenos. Parasitoides e predadores tem ligação estreita com populações de pragas (respectivamente parasitando e predando) tais com resistência ou não ao(s) produto(s) químico(s) (ou outro método de controle, como biotecnológico), contribuindo assim, para a diminuição do desenvolvimento da resistência.

No capítulo 2, foi avaliado o efeito do pólen de três diferentes cultivares transgênicas de milho, que expressam diferentes proteínas, assim como o pólen seus respectivos híbridos isogênicos. O parasitoide de ovos *T. pretiosum* foi alimentado com mel mais pólen dos híbridos citados e não foram verificados efeitos negativos sobre a longevidade, parasitismo total, viabilidade de emergência e razão sexual de *T. pretiosum*. Desse modo, o uso das cultivares foi possibilitado sem prejudicar a interação inimigo natural e planta transgênica.

Quanto a toxicidade de produtos transgênicos à entomofauna benéfica, Siqueira et al. (2004) relatam que vários casos de efeitos negativos de plantas geneticamente modificadas a insetos resultaram de estudos em laboratório que, muitas vezes, não podem ser extrapolados para condições de campo. Desse modo, mesmo os resultados obtidos com *T. pretiosum* não terem demonstrado efeitos nocivos em laboratório, devem também ser conferidas em condições de campo. Para isso, investigar em ambiente natural os níveis de exposição à toxina, bem como as condições destas estarem ativas quando em contato com o inseto, é algo profícuo na elucidação desta questão. Avaliar ainda os possíveis efeitos ecológicos, resultantes deste tipo de interação, segundo Siqueira et al. (2004), também é algo que se deve considerar neste tipo de estudo.

Com a grande utilização da piramidação de genes nas plantas transgênicas pela biotecnologia, onde uma única planta pode expressar mais de uma proteína tóxica (controle de Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros) é essencial continuar estudando o possível efeito sobre inimigos naturais. Cabe também destacar a necessidade de continuidade da investigação para verificar possíveis efeitos destas tecnologias transgênicas sobre a fisiologia do parasitoide. Deste modo, deve-se adaptar a metodologia para demais parasitoides e predadores, levando em conta as fases mais sensíveis dos inimigos naturais.

Desta forma ao se estabelecer programas de manejo integrado na cultura do milho, deve-se levar em consideração a compatibilização ou integração entre métodos biológicos, químicos, de biotecnologia e outros. Para tal objetivo, o uso de substâncias seletivas que controlem as pragas sem causar efeitos negativos sobre organismos benéficos deve ser incentivado em todo o Brasil nas áreas de refúgio e se buscar ao máximo de inocuidade de plantas transgênicas sobre os inimigos naturais, preservando os agentes de controle biológico já presentes e/ou aqueles liberados em uma estratégia de controle biológico aplicado.

7 Conclusões Gerais

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

Os 10 híbridos transgênicos de milho e seus isogênicos testados nos bioensaios sobre o parasitoide *T. pretiosum*; adaptando-se a metodologia da IOBC, foram assim classificados: AG 8011YG (Cry1Ab), BG 7060Y (Cry1Ab), AS 1551 YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry2Ab2), DKB330YG (Cry1Ab), DKB390PRO2 (Cry1A. 105 + Cry2Ab2 + CP4 - EPSPS), 30F53H (Cry1F PAT), 32R48H (Cry1F PAT), Status TL (Cry1Ab PAT), Status Viptera (VIP3Aa20), são inócuos (classe 1) a adultos de *T. pretiosum*.

No bioensaio envolvendo efeito do pólen de milho transgênico em fêmeas de *T. pretiosum*, dos 7 tratamentos avaliados nenhum foi prejudicial ao desenvolvimento de fêmeas de *T. pretiosum*. Os híbridos transgênicos expressando diferentes proteínas: AG 8011YG (Cry1Ab), AS 1551 VT PRO (Cry1A. 105 + Cry 2Ab2) e Status Viptera (VIP3Aa20), assim como seus respectivos híbridos isogênicos não tem efeitos negativos sobre a longevidade, o parasitismo total, a viabilidade de emergência e razão sexual de *T. pretiosum* em bioensaio de ingestão com pólen em condições de laboratório.

Referências

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

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 18 de dez. 2012.

AL-DEEB, M.A.; WILDE, G.E.; HIGGINS, R.A. No effect of *Bacillus thuringiensis* corn and *Bacillus thuringiensis* on the predator *Orius insidiosus*. **Environmental Entomology**, v.30, p.624-629, 2001.

ÁLVAREZ-ALFAGEME, F.; FERR, Y.N.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F.; GATEHOUSE, AMR. Prey mediated effects of *Bt* maize on fitness and digestive physiology of the red spider mite predator *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). **Transgenic Research**, v.17, p. 943–954, 2008.

ANDOW, D.A.; RISCH, S.J. Parasitism in diversified agroecosystems: Phenology of *Trichogramma minutum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Entomophaga**, v.32, p.255-260, 1987.

ARAGÃO, F.J.L., ANDRADE, P.P. 2010. Variedades com Eventos Piramidados. In: Borém, A. (Ed.). **Plantas geneticamente modificadas nos trópicos: desafios e oportunidades**. Editora Suprema. 532p.

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

ARPAIA, S. Ecological impact of *Bt*-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Genetics & Breeding**, v.50, p. 315-319, 1997.

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

BARRY, B.D.; DARRAH, L.L.; HUCKLA, D.L.; ANTONIO, A.Q.; SMITH, G.S.; O'DAY, M.H. Performance of transgenic corn hybrids in Missouri for insect control and yield. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.3, p.991-999, 2000.

BEGUM, M.; GURR, G.M., WRATTEN, S.D.; HEDBERG, P.; NICOL, H.I. Using selective food plants to maximize biological control of vineyard pests. **Journal of Applied Ecology**, v.43, n.3 p. 547-554, 2006.

BERNAL, C.C.; AGUDA, R.M.; COHEN, M.B. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipennis*. **Entomology Applicata**, v.32, n.102, p. 21-28, 2002.

BESERRA, E.B.; DIAS, C.T. dos S.; PARRA, J.R.P. Distribution and natural parasitism of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs at different phenological stages of corn. **Florida Entomologist**, v.85, n.4, p.588-593, 2002.

BORBA, R. da S.; BUSATO, G.R.; FORESTI, J.; GIOLO, F.P.; GARCIA, M.S.; GRÜTZMACHER, A.D. Avaliação de espécies ou linhagens de *Trichogramma* para o parasitismo de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, SORGO E FEIJÃO (47, 30 e 35), 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: EMATER/RS, FEPAGRO, 2003. 1 Cd-rom

BRIGGS, M.A.; REBER, B.; SCHMUCK, R.; VOGT, H. (eds.): **Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods**. Reinheim: IOBC/WPRS. 2000. p.107-119.

BUNTIN, G.D.; LEE, D.; WILSON, D.M.; McPHERSON, R.M. Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. **Florida Entomologist**, v.84, n.1, p. 37-42, 2001.

CARNEIRO, A.A.; GUIMARÃES, C.T.; VALICENTE, F.H.; WAQUIL, J.M.; VASCONCELOS, M.J.V.; CARNEIRO, N.P.; MENDES, S.M. **Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga**. Sete Lagoas: Embrapa milho e Sorgo, 2009. 26 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 135).

CAROZZI, N.; KOZIEL, M. Advances in insect control: the role of transgenics plants. **Euphytica**, v.98, n.3, p. 206-206, 1997.

CARVALHO, G.A.; REIS, P.R.; MORAES, J.C.; FUINI, L.C.; ROCHA, L.C.D.; GOUSSAIN, M.M.; Efeitos de alguns inseticidas utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1160-1166, 2002.

CARVALHO, G.A.; REIS, P.R.; ROCHA, L.C.D.; MORAES, J.C.; FUINI, L.C.; ECOLE, C.C. Side-effects of insecticides used in tomato fields on *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.25, n.2, p.275-279, 2003.

CHEN, M.; ZHAO, J.Z.; COLLINS, H.L.; EARLE, E.D.; CAO, J.; ANTHONY, M.S. A critical assessment of the effects of *Bt* transgenic plants on parasitoids. **PLoS ONE**, v.3, n.5, p.1-7, 2008.

CHILCUTT, C.F.; TABASHNIK, B.E. Simulation of integration of *Bacillus thuringiensis* and the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) for control of susceptible and resistant diamond back moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Environmental Entomology**, v.28, n. 3, p. 505-512, 1999.

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

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa/Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1995. 45p. (Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Circular Técnica, 21).

DĄBROWSKI, Z.T. Evaluation of opinions on ecological consequences of growing genetically modified (GM) crops: case studies on the effects of *Bt* maize cultivars on non-target organisms. **Postepy Nauk Rolniczych**, v.59, n.2, p.57-70, 2007.

DEGRANDE, P.E.; GOMEZ, D.R.S. Seletividade de produtos químicos no controle de pragas. **Agrotécnica Ciba-Geigy**, v.7, p.8-13, 1990.

DEGRANDE, P.E.; REIS, P.R.; CARVALHO, G.A.; BELARMINO, L.C. Metodologia para avaliar o impacto de pesticidas sobre inimigos naturais. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.71-93.

DEQUECH, S.T.B. ***Campoletis flavicincta* (Hymen., chneumonidae): ocorrência, criação e interação com *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) e *Bacillus thuringiensis aizawai***. 2002. 79f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

DIEZ-RODRÍGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p.311-316, 2001.

DIVELY, G.P. Impact of transgenic VIP3A x Cry1Ab lepidopteran-resistant field Corn on the nontarget arthropod community. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p. 1267-1291, 2005.

DUAN, J.J.; HEAD, G.; MCKEE, M.J.; NICKSON, T.E.; MARTIN, J.W.; SAYEGH, F. S. Evaluation of dietary effects of transgenic corn pollen expressing Cry3Bb1 protein on a non-target ladybird beetle, *Coleomegilla maculata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.104, n.3, p.271-280, 2002.

FERNANDES, O.D. **Efeito do milho geneticamente modificado (MON 810) em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e no parasitoide de ovos *Trichogramma* spp.** 164 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

FERRY, N.; MULLIGAN, E.A.; STEWART, C.N.; TABASHNIK, B.E.; PORT, G.R.; GATEHOUSE, A.M. Prey-mediated effects of transgenic canola on a beneficial, non-target, carabid beetle. **Transgenic Research**, v.15, n.4, p.501-514, 2006.

FIGUEIREDO, M.L.C. **Interação de inseticidas e controle biológico natural na redução dos danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho (*Zea mays*)**. 2004. 205f. Tese (Doutorado em

Ciências) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

FONTES, E.M.G.; MELO, P.E. Avaliação de riscos na introdução no ambiente de plantas transgênicas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1999. v.2, p.815-843.

FORSSE, E.; SMITH, S.M.; BOURCHIER, R.S. Flight initiation in the egg parasitoid *Trichogramma minutum*: Effects of ambient temperature, mates, food and host eggs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.62, n.2, p.47-154, 1992.

FRANZ, J.M. Pesticides and beneficial arthropods. **IOBC/WPRS Bulletin**, n.1, p.147-152, 1975.

FRANZ, J.M.; BOGENSCHÜTZ, H.; HASSAN, S.A.; HUANG, P.; NATON, E.; SUTER, H.; VIGGIANI, G. Results of a joint pesticide test programme by the working group: "pesticides and beneficial arthropods". **Entomophaga**, v.25, n.3, p.231-236, 1980.

FRIZZAS, M.R. **Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a comunidade de insetos**. 192f. 2003. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FRIZZAS, M.; OLIVEIRA, C.M.; Plantas transgênicas resistentes a insetos e organismos não-alvo: predadores, parasitoides e polinizadores. **Universitas: Ciências da Saúde**, v.4, n.1 / 2, p. 63-82, 2006.

GASSEN, D.N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 134p.

GENG J.H.; SHEN Z.R.; SONG K.; ZHENG, L. Effect of pollen of regular cotton and transgenic *Bt*-CpTI cotton on the survival and reproduction of the parasitoid wasp *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in the laboratory. **Environmental Entomology**, vol. 35, n.6, p.1661-1668, 2006.

GILL, S.S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.90, n.1, p. 69-74, 1995.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000. 350p.

GRAVENA, S. Controle biológico no manejo integrado de pragas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n. 4, p.281-299, 1992.

GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; MANZONI, C.G.; FACHINELLO, J.C.; NÖRNBERG, S.D.; STEFANELLO JÚNIOR, G.J. Seletividade de agrotóxicos indicados na produção integrada de pêssego a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879

(Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.2, p.222-225, 2005.

GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; MANZONI, C.G.; HARTER, W.R.; MULLER, C.; CASTILHOS, R.V. Toxicidade de pesticidas utilizados na cultura do pessegueiro para estágios imaturos de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Bioassay**, v.1, n.4, p.1-7, 2006.

GOULART, R.M. **Seletividade de agrotóxicos a duas espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em diferentes hospedeiros**. 2007. 87f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. da S.; CUNHA, U. da S. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J.M.B. **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. P. 87-101. (Embrapa Clima Temperado: Documentos, 74) a.

GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. da S.; AZEVEDO, R. de.; GIOLO, F.P. Efeito de inseticidas e de tecnologias de aplicação no controle da lagarta-do-cartucho na cultura do milho no agroecossistema de várzea. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO E SORGO (45 e 28). 2000, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p.567-573. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 70) b.

HANLEY, A.V.; HUANG, Z.Y.; PETT, W.L. Effects of dietary transgenic *Bt* corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. **Journal of Apicultural Research**, v.42, n.4, p.77-81, 2003.

HASSAN, S.A.; KRIEG, A. *Bacillus thuringiensis* preparations harmless to the parasite *Trichogramma cacoeciae* (Hym: Trichogrammatidae). **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.82, p. 515-521, 1975.

HASSAN, S.A. Procedure for testing side effects of pesticides on beneficial arthropods as being considered by the International Working Group "Pesticides and Beneficial Arthropods". **Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie**, v.4, p.86-88, 1983.

HASSAN, S.A. Seleção de espécies de *Trichogramma* para o uso em programas de controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. ***Trichogramma* e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p.183-206.

HASSAN, S.A. Guideline for the evaluation of side effects of plant protection products on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **IOBC/WPRS Bulletin**, v.21, n.6, p.119-128, 1998a.

HASSAN, S.A. The suitability of *Trichogramma cacoeciae* as an indicator species for testing the side effect of pesticides on beneficial arthropods, compared to other parasitoids. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.21, n.6, p.89-92, 1998b.

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

HASSAN, S.A.; ABDELGADER, H.A sequential testing program to assess the effects of pesticides on *Trichogramma cacoeciae* Marchal(Hymenoptera:Trichogrammatidae). **IOBC/WPRS Bulletin**, v.24, n.4, p.71-81, 2001.

HELLMICH, R.L.; SIEGFRIED, B.D.; SEARS, M.K.; STANLEYHORN, D.E.; DANIELS, M. J.; MATTILA, H. R.; SPENCER, T.; BIDNE, K. G.; LEWIS, L. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis* purified proteins and pollen.- **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.98, n.21, p.11925-11936, 2001.

HOHMANN, C.L.; LUCK, R. F.; OATMAN, E.R. A comparison of longevity and fecundity of adult *Trichogramma platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared from eggs of the cabbage looper and the angoumois grain moth, with and without access to honey. **Journal of Economic Entomology**, v.81, p.1307-1312, 1988.

HOY, C.W.; FELDMAN, J.; GOULD, F.; KENNEDY, G.G.; REED, G.; WYMAN, J.A. Naturally occurring biological controls in genetically engineered crops. In: BARBOSA, P. (Ed.). **Conservation biological control**. San Diego: Academic Press, 1998. cap. 10, p.185-205.

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

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.sh> tm>. Acesso em: 15 de dez. 2012.

IRVIN, N.A.; HODDLE, M.S.; CASTLE, S.J. The effect of resource provisioning and sugar composition of foods on longevity of three *Gonatocerus* spp., egg parasitoids of *Homalodisca vitripennis*. **Biological Control**, v.40, p.69-79, 2007.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/ transgenic crops**: 2010. ISAAA Brief, No. 35. ISAAA: Ithaca, NY

JAMES, C. **Global review of commercialized transgenic crops**: 2012. ISAAA (Briefs, 43: Preview). Ithaca: ISAAA, 2012. 26p.

JESSE, L.C.H.; OBRYCKI, J.J. Field deposition of *Bt* transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. **Oecologia**, v.125, p.241-248, 2000.

- KAAZT, H.H. **Auswirkungen von *Bt*-maispollen auf die honigbiene**. BMBF-Verbundprojekt: Sicherheitsforschung und monitoring zum anabu von *Bt*-mais. 2005
- KANRAR, S.; VENKATESWARI, J.; KIRTI, P.B.; CHOPRA V.L. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.). **Plant Cell**, v.20, n.10, p.976-981, 2002.
- KELLER, M.A.; LEWIS, W.J.; STINNER, R.E. Biological and practical significance of movement by *Trichogramma* species: a review. **Southwest Entomology**, v.8, p.138-155, 1985.
- KNUTSON, A. ***Trichogramma* manual**. Texas Agriculture Extension Service, Texas A & M University System, College Station, TX.1998, 39p.
- KOGAN, M. Integrated Pest Management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.243-270, 1998.
- LACERDA, A.L.S. **Plantas Transgênicas**. 2011. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_3/transgenicos/index.htm>. Acesso em: 17/2/2013
- LI, Y.; MEISSE, M.; ROMEIS, J. Consumption of *Bt* maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 does not harm adult Green Lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **PLoS ONE**, v.3, n.8 p.1-8, 2008
- LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S.; CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, v.399, p.214-227, 1999.
- LYNCH, R.E.; WISEMAN, B.R.; SUMNER, H.R. PLAISTED, D.; WARNICK, D. Management of corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) injury on a sweet corn hybrid expressing a Cry1A(b) gene. **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.5, p.1217-1222, 1999.
- MACEDA, A.; HOHMANN, C.L.; SANTOS, H.R.; Temperature effects on *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogrammatoidea annulata* De Santis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.1, p.27-32, 2003.
- MAIA, J.B. **Seletividade de inseticidas, utilizados na cultura do milho (*Zea mays* L.), para *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia) - Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MANACHINI, B.; LOZZIA, G.C. Studies on the effects of *Bt* corn expressing Cry1Ab on two parasitoids of *Ostrinia nubilalis* Hb. (Lepidoptera: Crambidae). **Bulletin-OILB/SROP**, v.27, n.4, p.109-116, 2004.
- MANZONI, C. G. **Seletividade de agroquímicos utilizados na produção integrada de maçã a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 e *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em**

condições de laboratório. 2006. 127f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MANZONI, C.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; LIMA, C.A.B.; NÖRNBERG, S.D.; HÄRTER, W.R.; MÜLLER, C. Seletividade de agrotóxicos recomendados na produção integrada da maçã a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.54-57, 2006.

MARTINS, F.; VIEIRA, M.M.; LAVADINHO, A.M.P.; MENDONÇA, T.R. Efeito de milho *Bt* sobre a entomofauna não alvo. **Revista de Ciências Agrárias**, v.31, n.2, p. 29-33, 2008.

MASCARENHAS, V.J.; LUTTRELL, R.G. Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Environmental Entomology**, v.26, n.4, p. 939-945, 1997.

MELO, M.; MARTINS, J.F.S. Inimigos naturais da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em milho. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO E SORGO (45 e 28)., 2000, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 70). p.561-565.

MENDES, S.M.; WAQUIL, J.M. **Uso do milho *Bt* no manejo integrado de lepidópteros-praga: recomendações de uso.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 170).

MOLINA-OCHOA, J.; CARPENTER, J.E.; HEINRICHS, E.A.; FOSTER, J.E. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean basin: an inventory. **Florida Entomologist**, v.86, n.3, p.254-289, 2003.

MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, cap.7, p.163-200.

MORANDI FILHO, W.J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; MANZONI, C.G. Ação de produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1072-1078, 2006.

MOURA, A.P.; CARVALHO, G.A.; PEREIRA, E.; ROCHA, L.C.D. Selectivity evaluation of insecticides used to control tomato pests to *Trichogramma pretiosum*. **BioControl**, v.51, n.6, p.769-778, 2006.

NAGARKATTI, S.; TOBIN, P.C.; SAUNDERS, M.C.; MUZA, A.J. Release of native *Trichogramma minutum* to control grape berry moth. **Canadian Entomologist**. v.135, n.4, p.589-598, 2003.

- NARANJO, S.E.; Long-term assessment of the effects of transgenic *Bt* cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. **Environmental Entomology**, v. 34, n.5, p.1193-1210, 2005.
- NAVA, D.E.; NACHTIGAL, G.F. Controle biológico no Sul do Brasil. **Revista de Controle Biológico**, v.1, n.1, p.15-18, 2010.
- NAVARRO, M.A. ***Trichogramma* spp. Producción, uso y manejo em Colômbia**. Guadalajara de Buga: Impretec, 1998.176p.
- NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. **História Ciencia Saúde-Manguinhos**, v.7 n.2, p.481-491, 2000.
- O'CALLAGHAN, M.; GLARE, T.R.; BURGESS, E.P.J.; MALONE, L. A. Effects of plants genetically modified for insect resistance on non-target organisms. **Annual Review of Entomology**, v.50, p.271-292, 2005.
- ORR, D.B.; BOETHEL, D.J.; LAYTON, M.B. Effect of insecticide applications in soybeans on *Trissolcus basal* (Hymenoptera: Scelionidae). **Journal of Economic Entomology**, v.82, n.4, p.1078-1084, 1989.
- ORR, D.B.; LANDIS, D.A. Oviposition of european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n.4, p. 905-909, 1997
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. p.121-150.
- PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, 1997. 324p.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico: terminologia. In: **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole. 2002. p.1-16.
- PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of user after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, v.33, n.3, p.271-281, 2004.
- PARON, M.J.F.O.; CRUZ, I.; CIOCIOLA, A.I. Efeito de genótipos de milho no parasitismo por *Trichogramma* spp. em ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie). **Anais da Sociedade do Brasil**, v.27, n.3, p.435-441, 1998.
- PETER, W.; ATANAS, A. Impact of peach extra floral nectar on key biological characteristics of *Trichogramma minutum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Entomological Society of America**, v.97, n.3, p.789-792, 2004.

PILCHER, C.D.; OBRYCKI, J.J.; RICE, M.E.; LEWIS, L.C. Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. **Environmental Entomology**, v.26, n.4, p.446-454, 1997.

PILCHER, C.; MARLIN, D.; RICE, E.; OBRYCKI, J.J. Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five nontarget arthropods. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, 1302-1316, 2005.

PINTO, J.D. Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p.13-39.

PINTO, N.F.J.A. Qualidade sanitária de grãos. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/dsanitaria.htm>> Acesso em: 26 mai. 2005.

POLANCZYK, R.A.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U.R.; OLIVEIRA, DOS SANTOS, R.G.; ANDRADE, G.S. Interação entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.28, n.2, p. 233- 239, 2006.

PLEASANTS, J.M.; RICHARD, L.H.; GALEN, P.D.; MARK, K.S.; DIANE, E.; STANLEY, H.; HEATHER, R.M.; JOHN E.F.; PETER, C.; GRETCHEN, D.J. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, v.98, n.21, p.11919-11924, 2001.

PRATISSOLI, D.; OLIVEIRA, H.N. Influência da idade dos ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie) no parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.5, p.891-896, 1999.

PRATISSOLI, D. **Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, nas traças *Scrobipalpus absolutus* (Meyrick, 1917) e *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) em tomateiro**. 142f 1995. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PRATISSOLI, D.; THULER, R.T.; PEREIRA, F.F.; REIS, E.F. dos; FERREIRA, A.T. Ação transovariana de lufenuron (50 G/L) sobre adultos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu efeito sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.1, p.9-14, 2004.

PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R.A.; VIANNA, U.R.; ANDRADE, G.S.; OLIVEIRA, R. G.S. Desempenho de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) sob efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p. 369-377, 2006a.

PRATISSOLI, D.; REIS, E.F.; ZAGO, H.B.; PASTORI, P.L.; TAMANHONI, T. Biologia e exigências térmicas de cinco linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) criadas em ovos de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1671–1677, 2006.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. Caracterização morfológica de dez espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) registradas na América do Sul. **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.597-613, 2003.

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DELÈGUE, M.H. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Ecotoxicology Environment**, v.70, n.2, p. 327-33, 2008.

RAPS, A.; KEHR, J.; GUGERLI, P.; MOAR, W.J.; BIGLER, F.; HILBECK, A. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. **Molecular Ecology**, v.10, n.2, p.525-533, 2001.

RIGGIN-BUCCI, T.M.; GOULD, F. Impact of intraplot mixtures of toxic and nontoxic plants on population dynamics of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its natural enemies. **Journal of Economic Entomology**, v.90, n.2, p. 241-251, 1997.

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

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Natural Biotechnology**, v.24, p.63-71, 2006.

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

SAAVEDRA, J.L.D.; TORRES, J.B.; RUIZ, M.G. Dispersal and parasitism of *Heliothis virescens* eggs by *Trichogramma pretiosum* (Riley) in cotton. **International Journal of Pest Management**, v.43, p.169-171, 1997.

SALAMA, H. S.; ZAK, I.F.N. Biological effects of *Bacillus thuringiensis* on the egg parasitoid, *Trichogramma evanescens*. **Insect Science and its Application**, v.6, p.145-148, 1985.

SANTOS, H.J.G.; MARQUES, E.J.; PRATISSOLI, D.; KLOSS, T.G.; MACHADO, L.C.; ANDRADE, G.S. Efeito de *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) sobre parâmetros biológicos do parasitoide *Trichogramma pretiosum* (Trichogrammatidae). **Natureza on line**, v.1, n.9, p.1-6, 2011.

SAS LEARNING EDITION. **Getting Started with the SAS Learning Edition**. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 2002. 2 Cd-rom. Statistical Analysis System.

SÉTAMOU, M.; BERNAL, J.S.; LEGASPI, J.C.; MIRKOV, T.E. Parasitism and location of sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae) by *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) on transgenic and conventional sugarcane. **Environmental Entomology**, n.31, n.6, p.1219-1225, 2002.

SILVEIRA, F.A.; CAMPOS, M.J.A. A melissofauna de Corumbataí (SP) e Paraopeba (MG) e uma análise da biogeografia das abelhas do cerrado brasileiro (Hymenoptera, Apoidea). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.39, n. 2, p.371-401, 1995.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: Ed. do autor, 2002. 253 p.

SHEARER, P.W.; ATANASSOV, A. Impact of peach extrafloral nectar on key biological characteristics of *Trichogramma minutum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Journal of Economic Entomology**. v.97, n.3, p.789-792, 2004.

SHI, Y.; WANG, M.B.; POWELL, K.S.; VAN, D.E.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; GATEHOUSE, J.A. Use of the rice sucrose synthase-1 promotor to direct phloem-specific expression of β -glucuronidase and snow drop lectin genes in transgenic tobacco plants. **Journal of Botany**, v.45, n.5, p.623-631, 1994.

SHELTON, A.M.; SEARS, M.K. The monarch butterfly controversy: scientific interpretations of a phenomenon. **Plant Journal**, v.2, n.5, p.483-488, 2001.

SCHRIJVER, A.D.; DEVOS, Y.; VAN DEN BILCKE, M.; CADOT, P.; LOOSE, DE LOOSE, M.; REHEUL, D. SNEYERS, M. Risk assessment of GM stacked events obtained from crosses between GM events. **Trends in Food Science and Technology**, v.18, n.2, p.101-109, 2007

SCHULER, T.H. et al. Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. **Trends in Biotechnology**, v.17, n.5, p.210-216, 1999.

SCHULER, T.H. The impact of insect resistant GM crops on populations of natural enemies. **Antenna-London**, v.24, n.2, p.59-65, 2000.

SCHULER, T.H. DENHOLM, I.; CLARK, S.J.; STEWART, C.N.; POPPY, G.M. Effects of *Bt* plants on the development and survival of the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) in susceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Insect Physiology**, v.50 n. 5, p.435-443, 2004.

SMITH, S.M. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.375-406, 1996.

STEFANELLO JÚNIOR, G.J. **Seletividade de agrotóxicos registrados para a cultura do milho a adultos de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em laboratório.** 75f. 2007. - Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

STEFANELLO JÚNIOR, G.J. **Efeitos de agrotóxicos registrados para a cultura do milho sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae).** 121f. 2010. - Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TIRONI, P.; CIOCIOLA, A.I. Parasitismo natural de ovos de *Helicoverpa zea* por *Trichogramma* spp. em lavouras de milho em Lavras, MG. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, 1992. p.223.

TOSCANO, L.C.; CALADO FILHO, G.C.; CARDOSO, A.M.; MARUYAMA, W.I.; TOMQUELSKI, G.V. Impacto de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho safrinha. Cultivado em Cassilândia e Chapadão do Sul, MS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.2, p.223-23, 2012.

TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R. 2008. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heretopterans. **Transgenic Research**, v.17, n.38, p.345-354, 2008.

TREVISAN, H. **Análise da influência de plantas transgênicas em *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) e em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae)** 96f. 2010. - Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

STEIN, C.P.; PARRA, J.R.P. Uso da radiação ultravioleta para inviabilizar ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) visando estudos com *Trichogramma* spp. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.16, n.1, p.229-233, 1987.

VAN DEN BOSCH, R.; STERN, V.M. The integration of chemical and biological control in arthropod pests. **Annual Review Entomology**, v.7, p.367-388, 1962.

WACKERS, F.L.; VAN RIJN, PCJ; BRUIN J. 2005. **Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications.** New York: Cambridge University Press. 356 p.

WANG, C.L.; LIN, F.C.; LIN, C.Y. Insect-resistant transgenic plants and the environmental impact assessment - special concern for insects. **Plant Protection Bulletin**, v.46, n.3, p.181-209, 2004.

WANG, Z.Y.; WU, Y.; HE, K.L.; BAI, B.X. Effects of transgenic *Bt* maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostrinae* in laboratory conditions. **Bulletin of Insectology**, v.60, n.1, p.49-55, 2007.

WELLINGA, S.; WYSOKI, M. Preliminary investigation of food source preferences of the parasitoid *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hymenoptera, Trichogrammatidae). **Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v.62, n.7, p.133-135, 1989.

WHITEHOUSE, M.E.A.; WILSON, L.J.; FITT, G.P. A Comparison of Arthropod Communities in Transgenic *Bt* and Conventional Cotton in Australia. **Environmental Entomology**, v.34, n.5, p.1224-1241, 2005.

WRAIGHT, C.L.; RICHARD, L.H.; JOHN, E.F.; PETER, C. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, v.97, n.14, p. 7700-7703, 2000.

ZACHRISSON, B.; PARRA, J.R.P. Capacidade de dispersão de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para o controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em soja. **Scientia Agricola**, v.55, n.1, p.133-137, 1998.

ZHANG, W.; HASSAN, S.A. Rationalising the standard method to test the side-effects of pesticides on *Trichogramma cacoeciae*, reducing the number of parasitoids tested. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.23, n.9, p.49-53, 2000.

ZHANG, G. R.; O. ZIMMERMANN.; HASSAN, S.A. Pollen as a source of food for egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Biocontrol Science Technology**, v.14, n.2, p. 201- 209, 2004.

ZIMMERMANN, O.; REN, Z.; HASSAN, S.A. Risk assessment of culturing transgenic crops: testing side effects of *Bt* corn on Microhymenoptera of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie**, v.14, p.431–434, 2004.

ZWAHLEN, C.; NENTWIG, W.; BIGLER, F.; HILBECK, A. Tritrophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). **Environmental Entomology**, v.29, n.4, p.846-850, 2000.