



**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**Michael Willian Rocha de Souza**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Podisus nigrispinus* (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE) COM A PRESA *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) ALIMENTADA EM GENÓTIPOS DE MILHO TRANSGÊNICOS**

**Diamantina**  
**2019**

**Michael Willian Rocha de Souza**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Podisus nigrispinus* (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE) COM A PRESA *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) ALIMENTADA EM GENÓTIPOS DE MILHO TRANSGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Regina da Costa

**Diamantina  
2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729a

Souza, Michael Willian Rocha de

Aspectos biológicos de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) com a presa *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada em genótipos de milho transgênicos / Michael Willian Rocha de Souza, 2019.

54 p. : il.

Orientadora: Márcia Regina da Costa

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Controle biológico. 3. Predador. I. Costa, Márcia Regina da. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 571.7**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468

MICHAEL WILLIAN ROCHA DE SOUZA

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Podisus nigrispinus* (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE) COM A PRESA *Spodoptera  
frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ALIMENTADA EM  
GENÓTIPOS DE MILHO TRANSGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM PRODUÇÃO  
VEGETAL, nível de MESTRADO como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia  
Regina Da Costa

Data da aprovação : 01/07/2019



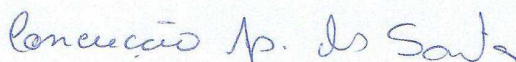
Prof.Dr.<sup>a</sup> MÁRCIA REGINA DA COSTA - UFVJM



Prof.Dr. MARCUS ALVARENGA SOARES - UFVJM



Dr. VERÍSSIMO GIBRAN MENDES DE SÁ - CORTEVA



Prof.Dr.<sup>a</sup> CONCEIÇÃO APARECIDA DOS SANTOS - UFVJM



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO  
JEQUITINHONHA E MUCURI  
DIAMANTINA – MINAS GERAIS



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

### ATESTADO DE DEFESA POR VIDEOCONFERÊNCIA

Atesto para os devidos fins que no dia 01 de julho de 2019, às 08h, nas dependências da UFVJM – em Diamantina, foi realizada a defesa da tese do discente Michael Willian Rocha de Souza com o trabalho intitulado “**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Podisus nigrispinus* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) COM A PRESA *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ALIMENTADA EM GENÓTIPOS DE MILHO TRANSGÊNICOS**” no Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal.

Na qualidade de presidente da banca, atesto que o Dr. Veríssimo Gibran Mendes de Sá, participou através de videoconferência.

Em virtude da participação remota do membro titular acima, eu, Márcia Regina da Costa, enquanto servidora pública, no gozo de fé pública, assino no lugar desse na Ata de Defesa e na Folha de Aprovação da referida defesa.

Por ser verdade, dou fé e assino o presente atestado.

Diamantina, 01 de julho de 2019.

Márcia Regina da Costa

Presidente da Banca

A Deus,  
Aos meus pais, Elizabeth Maria e Djalma Pontes,  
Ao meu irmão, Arthur Henrique,

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço sobretudo a DEUS, que traçou e iluminou minha jornada até este momento. E novamente a ELE, pela vida e exatamente por tudo, eu agradeço.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

Ao meu pequeno irmão, pela alegria e pureza, meu grande bem.

Aos meus amigos, em especial Amanda, Caique, Clarisse, Inaê, Kamila, Leticia, Levy, Mahany, Marina e Soryana pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

Ao Lucas por toda paciência e compreensão durante uma longa jornada, da graduação ao título de Mestre. Obrigado por não ter desistido.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Departamento de Agronomia, pela oportunidade de realização do curso. As pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos. Foi aqui onde aprendi a refletir, duvidar e nunca encarar a realidade como pronta. Aqui aprendi a ver a vida de um jeito diferente.

A minha orientadora Márcia Regina da Costa, pela confiança depositada, dedicação no enriquecimento de meus conhecimentos, palavras de carinho e afeto, abraços em dias de alegrias e também de tristezas e exemplo profissional.

Ao Professor Marcus Alvarenga Soares, pela amizade e ajuda imensurável. Pelos conselhos, palavras de carinho, incentivo e apoio nas minhas tomadas de decisões.

E por fim, a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram no desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

Souza, M. W. R. **Aspectos biológicos de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) com a presa *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada em genótipos de milho transgênicos.** 2019. 54 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

Uma importante preocupação em relação ao uso de plantas geneticamente modificadas (GMs) que expressam toxinas inseticidas do *Bacillus thuringiensis* (Bt), é o possível efeito prejudicial em organismos não alvos. O percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) é utilizado como agente de controle biológico e pode ser exposto à toxinas Bt. Este estudo teve como objetivo analisar o movimento das diferentes proteínas Cry em *P. nigrispinus* predando lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), alimentadas em genótipos de milho Bt, bem como o desenvolvimento, a capacidade predatória, reprodutiva e possíveis alterações nas células do intestino médio desse inimigo natural. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos i) Isohíbrido (não Bt), ii) Herculex<sup>®</sup> (milho transgênico que codifica a proteína Cry1F) e iii) PowerCore<sup>®</sup> (milho transgênico piramidado que codifica as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2), com 14 repetições cada. Lagartas de *S. frugiperda* com dez dias foram individualizadas e alimentadas *ad libitum* com folhas de milho transgênico Herculex<sup>®</sup>, PowerCore<sup>®</sup> ou Isohíbrido durante 48 horas. Fêmeas de *P. nigrispinus* com 72 horas de vida foram alimentadas, diariamente, por três dias com uma *S. frugiperda* após alimentação em milho Bt ou Isohíbrido. Posteriormente, *P. nigrispinus* foram crioanestesiados e dissecados sob estereomicroscópio para remoção do sistema digestório. A presença de proteínas Cry, ganho de biomassa, biomassa consumida (predação), período de oviposição, número de posturas, número de ovos, número de ovos por postura, número de ninfas, viabilidade dos ovos, período embrionário, longevidade das fêmeas e desenvolvimento ninfal foram avaliados. Os resultados mostram que diferentes proteínas Cry se movem através da cadeia alimentar de *P. nigrispinus* e fornecem evidências de que a ingestão de três diferentes proteínas não leva a efeitos sinérgicos inesperados. No entanto, as toxinas Cry promoveram alterações histológicas nas células do intestino médio de *P. nigrispinus*.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, controle biológico, predador



## ABSTRACT

Souza, M. W. R. **Biological aspects of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) prey fed on transgenic maize genotypes.** 2019. 54 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

An important concern regarding the use of genetically modified plants (GMs) expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) insecticidal toxins, is the possible deleterious effect on non-target organisms. The predatory stink *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) is used as a biological control agent and can be exposed to Bt toxins. The objective of this study was to analyze the movement of different Cry proteins in *P. nigrispinus* by predated *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars fed on Bt maize genotypes, as well as the development, predatory and reproductive capacity and possible changes in the cells of the midgut of this natural enemy. The experiment was carried out in a completely randomized design with three treatments: i) Isohybrid (not Bt), ii) Herculex<sup>®</sup> (transgenic corn encoding Cry1F protein) and iii) PowerCore<sup>®</sup> (pyramid transgenic maize encoding the Cry1F, Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins), with 14 replicates each. Ten-day *S. frugiperda* caterpillars were individualized and fed *ad libitum* with Isohybrid, Herculex<sup>®</sup> or PowerCore<sup>®</sup> maize leaves for 48 hours. Twenty-two-hour-old *P. nigrispinus* females were fed daily for three days with a *S. frugiperda* after contact with Bt or Isohybrid maize. Subsequently, *P. nigrispinus* after predation were cryoanesthetized and dissected under stereomicroscope for removal of the digestory system. The presence of Cry proteins, consumed prey biomass (predation), oviposition period, number of postures, number of eggs, number of eggs per posture, number of nymphs, egg viability, embryonic period, female longevity and development and survival rates of immature were evaluated. The results show that different Cry proteins move through the food chain of *P. nigrispinus* and provide evidence that the ingestion of three different proteins does not lead to unexpected synergistic effects. However, Cry toxins promoted histological changes in the cells of the midgut of *P. nigrispinus*.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, biological control, predator

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	9
REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO CIENTÍFICO I.....	15
1 RESUMO.....	16
2 ABSTRACT.....	17
3 INTRODUÇÃO.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Plantas de milho.....	19
4.2 Criação de insetos.....	19
4.3 Bioensaios.....	19
4.4 Detecção das proteínas.....	20
4.5 Análise estatística.....	21
6 RESULTADOS.....	21
7 DISCUSSÃO.....	25
8 REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO CIENTÍFICO II.....	36
1 RESUMO.....	37
2 ABSTRACT.....	38
3 INTRODUÇÃO.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Plantas de milho.....	39
4.2 Criação de insetos.....	40
4.3 Bioensaios.....	40
4.4 Análise histológica.....	41
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO.....	43
7 REFERÊNCIAS.....	45
CONCLUSÃO GERAL.....	52

## INTRODUÇÃO GERAL

O uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos está diretamente atrelado ao rápido crescimento populacional e, conseqüentemente, a indispensabilidade de uma maior produtividade agrícola. Entretanto, a busca por alternativas para tentar diminuir o uso de inseticidas químico-sintéticos tem sido realizada em todo mundo devido à necessidade de uma agricultura mais sustentável e desenvolvida com uma maior preocupação com a preservação do meio ambiente.

Devido a essas restrições, o interesse por agentes biológicos para controle de insetos praga e vetores de doenças tem aumentado. Dentre os bioinseticidas mais utilizados, o *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria Gram-positiva, destaca-se como um agente favorável para o controle biológico de insetos (SCHNEPF *et al.*, 1998; DE ALMEIDA *et al.*, 2014; MISHRA *et al.*, 2017).

As primeiras gerações de plantas geneticamente modificadas (GMs) resistentes a insetos foram desenvolvidas com genes codificadores de proteínas inseticidas do entomopatógeno *B. thuringiensis* (FISCHHOFF *et al.*, 1987). A bactéria Bt é o organismo mais utilizado como fonte de genes para a transformação de plantas visando à resistência ao ataque de pragas (PERLAK *et al.*, 2001). A atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* é devido à presença de inclusões cristalinas denominadas delta-endotoxinas ou proteínas Cry, que são produzidas na fase estacionária e acumuladas no compartimento da célula mãe durante a esporulação, correspondendo a 25% do peso seco da célula bacteriana (AGAISSSE & LERECLUS, 1995).

Em plantas GMs, o inseto é exposto diretamente à fração ativa das proteínas Cry enquanto que, a aplicação de bioinseticidas nas culturas, esporos e cristais de toxinas Bt são dispostos sobre a planta da qual o inseto se alimentará. Após a ingestão dos cristais, estes são solubilizados nas condições de pH alcalino no intestino dos insetos, liberando pro-toxinas que em presença de proteinases são quebradas, gerando fragmentos tóxicos. Esses fragmentos atravessam a membrana peritrófica ligando-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células do intestino médio. Essa ligação interfere no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana pela formação de poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água de forma descontrolada causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio, levando o inseto à morte (COPPING & MENN, 2000).

As plantas GMs resistentes a insetos podem ter ação inseticida sobre insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera, dependendo da proteína (FRIZZAS *et al.*,

2004; ABBAS, 2018). Assim, como mais uma ferramenta para o controle de pragas dentro do conceito de manejo integrado de pragas (MIP), as plantas geneticamente modificadas para resistência à insetos tem se mostrado eficientes em diversas culturas (YU *et al.*, 2011).

De acordo com ISAAA (2017), o Brasil é o segundo produtor mundial de plantas GMs, com uma área de produção de 50,2 milhões de hectares, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (75 milhões de hectares). O uso em larga escala desta tecnologia pode representar um risco para a biodiversidade, pelos possíveis efeitos negativos sobre os organismos não alvos. Dentre estes organismos estão espécies de inimigos naturais (predadores e parasitoides), polinizadores e decompositores, e as que contribuem para o equilíbrio e funcionamento dos agroecossistemas (ANDOW & HILBECK, 2004; SHERA *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2019). Esta questão assume uma maior magnitude no Brasil por ser um país com grandes áreas de cultivo com plantas transgênicas e detentor de uma mega-biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000).

As proteínas Bt são expressas nos tecidos verdes das plantas GMs (BALDIN *et al.*, 2017) continuamente durante o ciclo de desenvolvimento (PONS *et al.*, 2005). As proteínas ao serem expressas ficam expostas aos demais fitófagos não alvos e aos seus inimigos naturais (SVOBODOVÁ *et al.*, 2017).

Embora Herrero *et al.* (2001), discutam que tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, por isso inócuas para a maioria dos outros organismos, as plantas GMs contendo gene Bt interagem com os organismos não alvos dos diferentes níveis tróficos, pois as culturas abrigam não somente os insetos pragas, mas também outros artrópodes, os quais desempenham papel importante na regulação das populações de pragas (SCHULER *et al.*, 1999), como é o caso de predador pentatomídeo *Podisus* spp (Hemiptera). Este inseto, normalmente, tem uma complementação alimentar direta, quando suga partes das plantas para obter água e sais minerais, ou, indiretamente, por se alimentar de presas que se desenvolvem nestas plantas (AVILA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2018).

Devido as características do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) como ocorrência natural, agressividade e voracidade, esses insetos têm sido amplamente estudados no Brasil para programas de MIP. Esses inimigos naturais contribuem para o equilíbrio populacional de insetos fitófagos, principalmente lagartas desfolhadoras, permitindo a redução do uso de agrotóxicos em sistemas agrícolas e florestas plantadas e, conseqüentemente, a conservação do meio ambiente (RODRIGUES *et al.*, 2008; DE BORTOLI *et al.*, 2011; ZANUNCIO *et al.*, 2014).

O impacto das proteínas Bt em artrópodes não visados é menos compreendido do que os seus efeitos nos organismos alvos, onde o mecanismo da ação tóxica é conhecido (YUAN *et al.*, 2014). Dessa forma, uma análise dos possíveis riscos advindos da adoção dos organismos geneticamente modificados é importante, sendo que os fundamentos dessa discussão dependem da disponibilidade de informações científicas consistentes.

Com isso, esse trabalho teve por objetivo analisar o movimento das diferentes proteínas Cry em *P. nigrispinus* predando *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada em genótipos de milho Bt simples e piramidados e seu Isohíbrido, bem como a capacidade predatória, reprodutiva, desenvolvimento e possíveis alterações nas células do intestino médio deste inimigo natural.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, M. S. T. (2018). Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 28(1), 52.

AVILA, C., SANTANA, A., & de OLIVEIRA, H. N. (2014). Influência de cultivos de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e milho (*Zea mays* L.) transgênicos (Bt) sobre a ocorrência natural e abundância de predadores e no desenvolvimento e reprodução do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Embrapa Agropecuária Oeste-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (INFOTECA-E).

AGAISSE, H., & LERECLUS, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of Bacteriology**, 177(21), 6027.

ANDOW, D. A., & HILBECK, A. (2004). Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, 54(7), 637-649.

BALDIN, E. L. L., KRONKA, A. Z., & da SILVA, I. F. (2017). **Inovações em manejo fitossanitário**, pg 63.

COPPING, L. G., & MENN, J. J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, 56(8), 651-676.

DE ALMEIDA, G. D., ZANUNCIO, J. C., SENTHIL-NATHAN, S., PRATISSOLI, D., POLANCZYK, R. A., AZEVEDO, D. O., & SERRÃO, J. E. (2014). Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. **Invertebrate Survival Journal**, 11(1), 79-86.

DE BORTOLI, S. A., OTUKA, A. K., VACARI, A. M., MARTINS, M. I., & VOLPE, H. X. (2011). Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. **Biological Control**, 58(2), 127-132.

FISCHHOFF, D. A., BOWDISH, K. S., PERLAK, F. J., MARRONE, P. G., MCCORMICK, S. M., NIEDERMEYER, J. G., ... & ROGERS, S. G. (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/technology**, 5(8), 807.

FRIZZAS, M., CUNHA, U. D., & MACEDO, L. (2004). Plantas transgênicas resistentes a insetos. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10, 13-18.

HERRERO, S., OPPERT, B., & FERRÉ, J. (2001). Different Mechanisms of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Indianmeal Moth. **Applied and Environmental Microbiology**, 67(3), 1085-1089.

ISAAA. 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. ISAAA Brief N°. 53. **ISAAA: Ithaca, NY**.

MISHRA, P. K., BISHT, S. C., RUWARI, P., SUBBANNA, A. R. N. S., BISHT, J. K., BHATT, J. C., & GUPTA, H. S. (2017). Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from the North Western Indian Himalayas. **Annals of Microbiology**, 67(2), 143-155.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A., & KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403(6772), 853.

PERLAK, F. J., OPPENHUIZEN, M., GUSTAFSON, K., VOTH, R., SIVASUPRAMANIAM, S., HEERING, D., ... & ROBERTS, J. K. (2001). Development and commercial use of

Bollgard<sup>®</sup> cotton in the USA—early promises versus today's reality. **The Plant Journal**, 27(6), 489-501.

PONS, X., LUMBIERRES, B. E. L. É. N., LOPEZ, C. A. R. M. E. N., & ALBAJES, R. A. M. O. N. (2005). Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: A farm scale study. **European Journal of Entomology**, 102(1), 73.

RODRIGUES, A. R., SERRAO, J. E., TEIXEIRA, V. W., TORRES, J. B., & TEIXEIRA, A. A. (2008). Spermatogenesis, changes in reproductive structures, and time constraint associated with insemination in *Podisus nigrispinus*. **Journal of Insect Physiology**, 54(12), 1543-1551.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N. V., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ... & DEAN, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62(3), 775-806.

SCHULER, T. H., POPPY, G. M., KERRY, B. R., & DENHOLM, I. (1999). Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. **Trends in Biotechnology**, 17(5), 210-216.

SVOBODOVÁ, Z., BURKNESS, E. C., SKOKOVÁ HABUŠTOVÁ, O., & HUTCHISON, W. D. (2017). Predator Preference for Bt-Fed *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Prey: Implications for Insect Resistance Management in Bt Maize Seed Blends. **Journal of Economic Entomology**, 110(3), 1317-1325.

SHERA, P. S., KARMAKAR, P., SHARMA, S., & SANGHA, K. S. (2018). Impact of Bt cotton expressing single (Cry1Ac) and dual toxins (Cry1Ac and Cry2Ab) on the fitness of the predator *Chrysoperla zastrowi sillemi* (Esben-Petersen): prey-mediated tri-trophic analysis. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 28(1), 98.

TANG, Q., YANG, Z., HAN, R., ZHANG, Y., SHEN, C., & WANG, J. (2019). No Effect of Bt-transgenic Rice on the Tritrophic Interaction of the Stored Rice, the Maize Weevil *Sitophilus Zeamais* and the Parasitoid Wasp *Theocolax elegans*. **Scientific Reports**, 9.

VIEIRA, E. R. D., DE BARROS SILVA, E., SOARES, M. A., JÚNIOR, S. L. A., BARROSO, G. A., & LEMES, P. G. (2018). Lack of macronutrients in *Eucalyptus urophylla* ST Blake (Myrtaceae) seedlings affects feed and development of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: pentatomidae). **Bioscience Journal**, 34(1).

XIE, X., CUI, Z., WANG, Y., WANG, Y., CAO, F., ROMEIS, J., ... & LI, Y. (2019). *Bacillus thuringiensis* Maize Expressing a Fusion Gene Cry1Ab/Cry1AcZM Does Not Harm Valued Pollen Feeders. **Toxins**, 11(1), 8.

YUAN, Y., KROGH, P. H., BAI, X., ROELOFS, D., CHEN, F., ZHU-SALZMAN, K., ... & GE, F. (2014). Microarray detection and qPCR screening of potential biomarkers of *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) exposed to Bt proteins (Cry1Ab and Cry1Ac). **Environmental Pollution**, 184, 170-178.

YU, H. L., LI, Y. H., & WU, K. M. (2011). Risk Assessment and Ecological Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Crops on Non-Target Organisms F. **Journal of Integrative Plant Biology**, 53(7), 520-538.

ZANUNCIO, J. C., TAVARES, W. D. S., FERNANDES, B. V., WILCKEN, C. F., & ZANUNCIO, T. V. (2014). Production and use of Heteroptera predators for the biological control of Eucalyptus pests in Brazil. **Ekoloji**, 98-104.



## **CAPÍTULO CIENTÍFICO I**

**SEQUESTRO DE PROTEÍNAS CRY POR LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda*  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM MILHO BT E TRANSFERÊNCIA NA CADEIA  
ALIMENTAR PARA O PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE)**

## 1 RESUMO

Em interações tritróficas entre insetos e plantas Bt surgem questões sobre como os inimigos naturais podem ser afetados através de suas presas herbívoras. Este estudo teve como objetivo analisar o movimento das diferentes proteínas Cry em *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) predando lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), alimentadas em genótipos de milho Bt, bem como a capacidade predatória, reprodutiva e desenvolvimento desse inimigo natural. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos i) Isohíbrido (não Bt), ii) Herculex<sup>®</sup> (milho transgênico que codifica a proteína Cry1F) e iii) PowerCore<sup>®</sup> (milho transgênico piramidado que codifica as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2), com 14 repetições cada. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* com dez dias foram individualizadas e alimentadas *ad libitum* com folhas de milho transgênico Herculex<sup>®</sup>, PowerCore<sup>®</sup> ou Isohíbrido durante 48 horas. Fêmeas de *P. nigrispinus* com 72 horas de vida foram alimentadas, diariamente, por três dias com uma lagarta de *S. frugiperda* após alimentação em milho Bt ou Isohíbrido e posteriormente individualizadas junto a um macho e alimentados com larvas e pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). A presença de proteínas Cry, ganho de biomassa, biomassa consumida (predação), período de oviposição, número de posturas, número de ovos, número de ovos por postura, número de ninfas, viabilidade dos ovos, período embrionário, longevidade das fêmeas e desenvolvimento ninfal foram avaliados. O teste imunocromatográfico em tiras para Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 foram negativos para amostras de folha de milho, *S. frugiperda* e *P. nigrispinus* no tratamento Isohíbrido e positivo para Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>®</sup>. O ganho de biomassa (mg) de *S. frugiperda* e a biomassa consumida (mg) por *P. nigrispinus* sem exposição à proteína Cry (Isohíbrido) foram maiores, enquanto entre os tratamentos Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>®</sup> apresentaram menores medias e não diferiram entre si. As variáveis de reprodução não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, a duração média em dias do V estágio ninfal do tratamento Isohíbrido foi maior. Os resultados mostram que diferentes proteínas Cry se movem através da cadeia alimentar de *P. nigrispinus* e fornecem evidências de que a ingestão de três diferentes proteínas não leva a efeitos sinérgicos inesperados que poderiam causar impactos adversos sobre a espécie não-alvo investigada.

**Palavras-chave:** Manejo integrado de pragas, organismos não alvos, transgênicos

## 2 ABSTRACT

In tritrophic interactions between insects and Bt plants questions arise about how natural enemies can be affected through their herbivorous prey. The objective of this study was to analyze the movement of different Cry proteins in *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) preying *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars fed on Bt maize genotypes, as well as predatory capacity, reproductive capacity and development of this natural enemy. The experiment was carried out in a completely randomized design with three treatments: i) Isohybrid (not Bt), ii) Herculex<sup>®</sup> (transgenic corn encoding Cry1F protein) and iii) PowerCore<sup>®</sup> (pyramid transgenic maize encoding the Cry1F, Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins), with 14 replicates each. Ten-day *S. frugiperda* caterpillars were individualized and fed *ad libitum* with Isohybrid, Herculex<sup>®</sup> or PowerCore<sup>®</sup> maize leaves for 48 hours. Twenty-two-hour-old *P. nigrispinus* females were fed daily for three days with a *S. frugiperda* after contact with Bt or Isohybrid maize and then individualized with a male and fed with larvae and pupae of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). The presence of Cry proteins, consumed prey biomass (predation), oviposition period, number of postures, number of eggs, number of eggs per posture, number of nymphs, egg viability, embryonic period, female longevity and development and survival rates of immature were evaluated. The immunochromatographic strips test for Cry1F, Cry1A.105 and Cry2Ab2 were negative for leaf samples of maize, *S. frugiperda* and *P. nigrispinus* in the Isohybrid and positive for Herculex<sup>®</sup> and PowerCore<sup>®</sup> treatment. The biomass gain (mg) of *S. frugiperda* and the biomass consumed (mg) by *P. nigrispinus* without exposure to the Cry protein (Isohybrid) were higher, whereas between the treatments Herculex<sup>®</sup> and PowerCore<sup>®</sup> presented smaller means and did not differ among themselves. The reproductive variables did not show significant differences between the treatments. However, the mean duration in days of the V nymphal stage of the Isohybrid treatment was higher. The results show that different Cry proteins move through the *P. nigrispinus* food chain and provides evidence that the ingestion of three different proteins does not lead to unexpected synergistic effects that could cause adverse impacts on the non-target specie investigated.

Keywords: Integrated pest management, non-target organisms, transgenic

### 3 INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas transgênicas aumentou nos últimos anos no Brasil e no mundo e ainda tem potencial de expansão devido aos benefícios dessa tecnologia (SANTANA *et al.*, 2017). O Brasil ocupa o segundo lugar mundial com 50,2 milhões de hectares plantados com culturas transgênicas (ISAAA, 2017).

Plantas geneticamente modificadas (GMs), que contêm genes introduzidos pela engenharia genética para controlar insetos, codificam proteínas Bt do *Bacillus thuringiensis* que podem ter ação inseticida sobre insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera (ABBAS *et al.*, 2018).

As proteínas Bt podem ser transferidas direta ou indiretamente para outros artrópodes não alvos insensíveis às toxinas Bt ou para inimigos naturais, sobretudo predadores e parasitoides (DUTRA *et al.*, 2012). O conhecimento sobre possíveis efeitos das toxinas Bt sobre os organismos não alvos, especialmente na medida em que essas toxinas se movem através dos diferentes níveis tróficos, suporta a avaliação de risco que precede o cultivo comercial de qualquer planta GM (MEISSLE & ROMEIS, 2018).

Estudos anteriores trabalharam com proteínas ou plantas Bt simples, produzindo uma única proteína Cry. Nos cultivos modernos, várias proteínas Cry e outras foram empilhadas ou piramidadas, seja por transferência simultânea de múltiplos genes ou pelo cruzamento convencional de plantas contendo transgenes individuais (SVOBODOVÁ *et al.*, 2017 b). Diferentes proteínas Cry, em plantas Bt empilhadas ou piramidadas, podem interagir de uma maneira sinérgica e levar a efeitos inesperados em espécies não-alvo (HILBECK & OTTO, 2015).

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga agrícola em regiões tropicais e subtropicais e causa perdas significativas em várias culturas (TIAN *et al.*, 2014). No Brasil, a intensidade do dano causado pela lagarta do cartucho é alta quando os inimigos naturais não estão presentes no campo (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

Predadores do gênero *Podisus* (Hemiptera: Pentatomidae) são frequentemente encontrados em vários sistemas agrícolas. O *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) é usado para o controle biológico em sistemas agrícolas e florestais (ZANUNCIO *et al.*, 2016). Esse predador pode ser diretamente afetado por plantas que expressam proteínas Bt, pois possuem o hábito de sugar partes das plantas para obter água e minerais (TORRES *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2018), ou mesmo indiretamente, alimentando-se de presas previamente desenvolvidas em plantas transgênicas. É provável que a proteína

possa ser transferida da *S. frugiperda* para o terceiro nível trófico, ou seja, para os predadores.

Em interações insetos-plantas Bt surgem questões sobre como os inimigos naturais podem ser afetados por essa relação através de suas presas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar o movimento das diferentes proteínas Cry em *P. nigrispinus* predando *S. frugiperda* alimentada em genótipos de milho Bt simples e piramidados e seu Isohíbrido, bem como a capacidade predatória, reprodutiva e de desenvolvimento deste inimigo natural.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Plantas de milho

Os híbridos Isohíbrido não Bt (controle), Herculex<sup>®</sup> - TC1507 (milho transgênico que codifica a proteína Cry1F) e PowerCore<sup>®</sup> - MON 89034 x TC1507 x NK603 (milho transgênico piramidado que codifica as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2), foram utilizados neste experimento. O milho foi plantado em casa de vegetação em vasos de 8 L. O cultivo foi realizado de acordo com as recomendações para o Brasil (CRUZ, 2010), sem aplicação de inseticidas, fungicidas e herbicidas.

### 4.2 Criação de insetos

Ovos de *S. frugiperda* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, em Diamantina, estado de Minas Gerais, Brasil, mantidos à  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $75 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12:12 horas. Após eclosão, larvas foram alimentadas com dieta artificial (GREENE *et al.*, 1976).

Adultos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal, mantidos à  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $75 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12:12 horas. Esses insetos foram alimentados *ad libitum* com pupas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Eucalyptus grandis* (Myrtaceae) (NEVES *et al.*, 2010).

### 4.3 Bioensaios

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: i) Isohíbrido, ii) Herculex<sup>®</sup> e iii) PowerCore<sup>®</sup>, com 14 repetições cada. Lagartas ativas de *S. frugiperda* com dez dias após a eclosão foram individualizadas, em potes plásticos transparentes (capacidade de 500 g) e alimentadas *ad libitum* com folhas de milho transgênico

Herculex<sup>®</sup>, PowerCore<sup>®</sup> ou Isohíbrido no estágio vegetativo V3 por 48 horas. O material foliar foi renovado a cada 24 horas. As lagartas foram pesadas em balança de precisão (Mettler AE260 DeltaRange<sup>®</sup>) antes e depois da alimentação em cada genótipo de milho avaliado.

Fêmeas de *P. nigrispinus* com 72 horas de vida foram individualizadas e alimentadas, diariamente, por três dias com uma *S. frugiperda* após alimentação com milho Bt ou Isohíbrido. A biomassa consumida (predação) por *P. nigrispinus* foi determinada, diariamente. Para isso, *S. frugiperda* foi pesada em balança de precisão (Mettler AE260 DeltaRange<sup>®</sup>) antes e após 24 horas de contato com o predador. Lagartas com lesões no tegumento, falta de mobilidade, ou com conteúdo corporal parcial ou totalmente sugados foram consideradas predadas.

Fêmeas de *P. nigrispinus* após predação de *S. frugiperda* foram individualizadas junto a um macho em potes plásticos transparentes (capacidade de 500 g) e alimentados com larvas e pupas de *Tenebrio molitor* L. Desses adultos, obtiveram-se os seguintes dados de reprodução: período de oviposição, número de posturas, número de ovos, número de ovos por postura, número de ninfas, viabilidade dos ovos, período embrionário e longevidade das fêmeas. Os ovos foram coletados diariamente e colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) para determinar o período de incubação e viabilidade. Cada placa continha algodão úmido preso à tampa para evitar a desidratação dos ovos.

Ovos de *P. nigrispinus* de diferentes posturas foram separados de cada tratamento e colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) com algodão umedecido na tampa e selados com plástico PVC até a eclosão. Dez ninfas, ao atingir o segundo instar, foram coletadas e individualizadas em recipientes plásticos transparentes. O desenvolvimento das ninfas foi observado até idade adulta para avaliar a duração dos diferentes instares.

#### 4.4 Detecção das proteínas

Para avaliar a presença da proteína Cry1F e das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 nas plantas de milho, na presa *S. frugiperda* e no predador *P. nigrispinus* foi utilizado o kit Envirologix QuickStix<sup>™</sup> para Cry1F e Cry2A. Três amostras com tecido foliar, *S. frugiperda* ou do *P. nigrispinus* foram utilizados para detecção ou ausência de proteínas Cry nos genótipos Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>®</sup> e quatro para o Isohíbrido, sendo duas tiras Envirologix QuickStix<sup>™</sup> para a proteína Cry1F e duas para Cry1A.105 e Cry2Ab2.

Em cada tubo Eppendorf<sup>®</sup>, contendo as amostras, foi adicionado 0,5 ml do tampão de extração, em seguida com pistilo descartável as amostras foram maceradas. Os insetos foram macerados por inteiro. Os eppendorfs<sup>®</sup> foram fechados e agitados cuidadosamente por,

aproximadamente, 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram colocados em um suporte e uma tira Enviroligix QuickStix™ Cry1F para amostras do milho Herculex® e uma tira Enviroligix QuickStix™ Cry2A para o milho PowerCore® foram adicionadas. As tiras foram mantidas no interior de cada amostra por cinco minutos para interpretação dos resultados. Em amostras com a presença da proteína Cry1F ou Cry1A.105 e Cry2Ab2, uma segunda linha (linha de teste) foi detectada na região entre a linha de controle e a extremidade inferior da tira. Para amostras negativas, a tira somente desenvolveu a linha de controle.

#### 4.5 Análise estatística

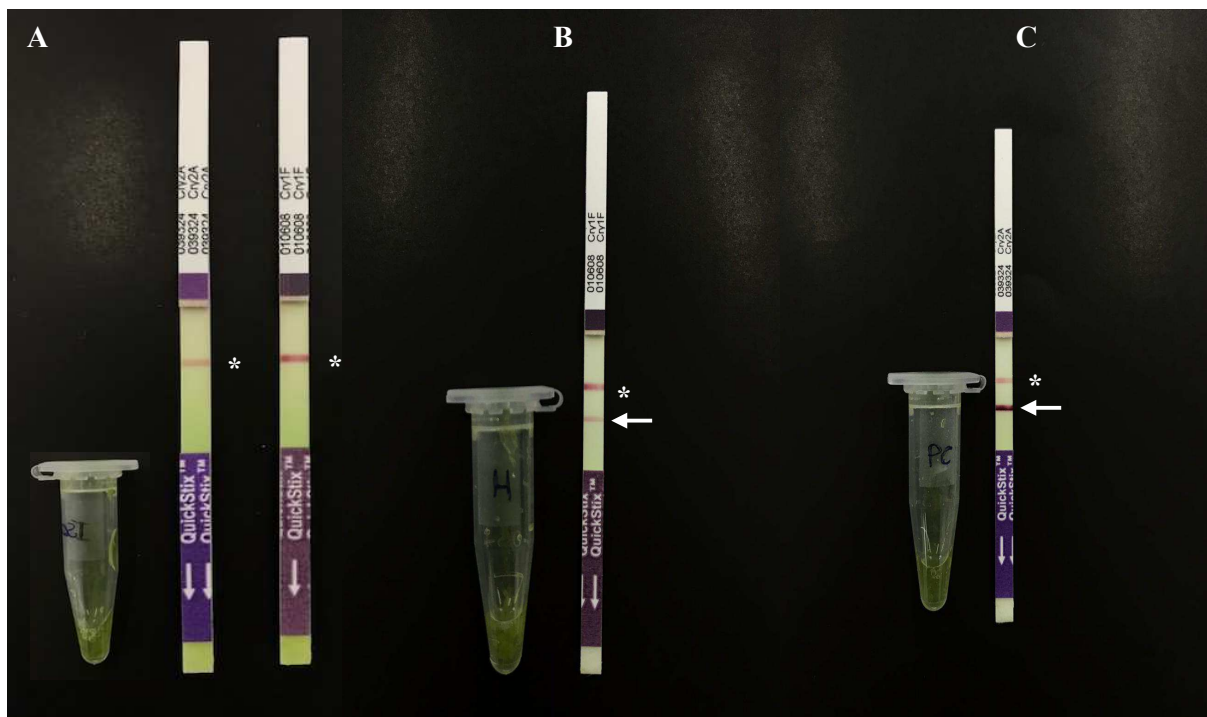
Os resultados do teste Enviroligix QuickStix™ são qualitativos e constataam a presença ou ausência das proteínas Cry1F ou Cry1A.105 e Cry2Ab2. Os dados de ganho de biomassa, biomassa consumida, reprodução e desenvolvimento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância com o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014).

## 6 RESULTADOS

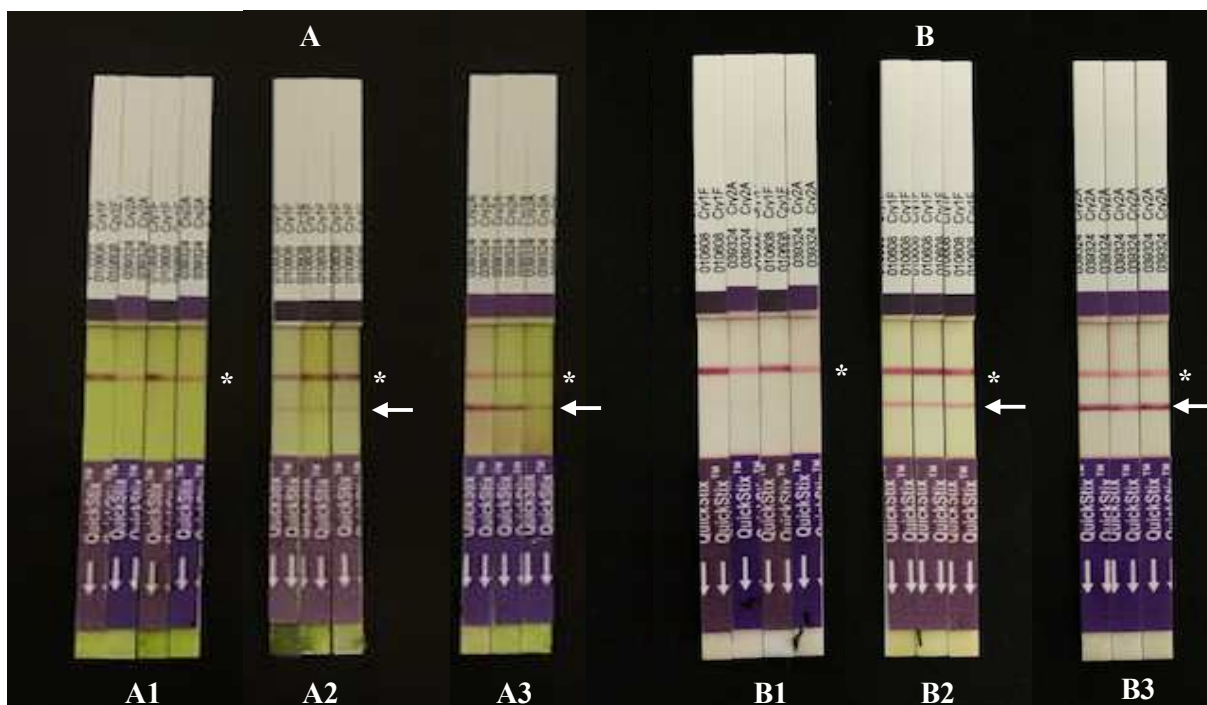
O teste imunocromatográfico em tiras QuickStix™ para Cry1F e Cry2A foram negativos para amostras de folha de milho (Fig1. A), *S. frugiperda* e *P. nigrispinus* no tratamento Isohíbrido (Fig2. A e B). O desenvolvimento da linha de controle, indica que a tira funcionou corretamente.

Os resultados das tiras QuickStix™ foram positivos para as amostras com folhas de milho Herculex® e PowerCore®, em que uma segunda linha (linha de teste) foi desenvolvida na região entre a linha de controle e a extremidade inferior da tira (Fig1. B e C). Esse resultado confirma a presença das proteínas Cry1F ou Cry1A.105 e Cry2Ab2 em todas as amostras destes tratamentos.

Nas amostras com *S. frugiperda* que se alimentaram com milho Bt, houve formação da linha de controle e a linha de teste, indicando a presença das proteínas (Fig2. A). De maneira semelhante, as amostras com o predador *P. nigrispinus* que se alimentaram de *S. frugiperda*, mantidas em folhas de milhos Bt, o resultado foi positivo (Fig2. B).



**Figura 1.** Tiras Enviroligix QuickStix™ Cry1F e Cry2A provenientes da amostra com discos de folhas de milho Isohíbrido (A), Herculex® (B) e PowerCore® (C). A seta indica a presença das proteínas. A detecção da linha de controle indica que a tira funcionou corretamente (\*).

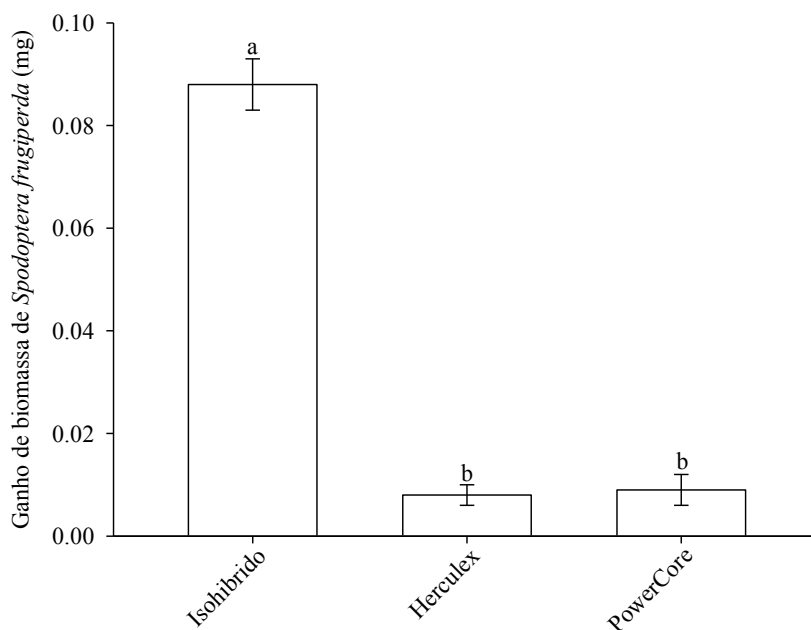


**Figura 2.** Tiras Enviroligix QuickStix™ Cry1F e Cry2A provenientes da amostra com predador *P. nigrispinus* (B) alimentados com *S. frugiperda* (A) mantidas em plantas de milho



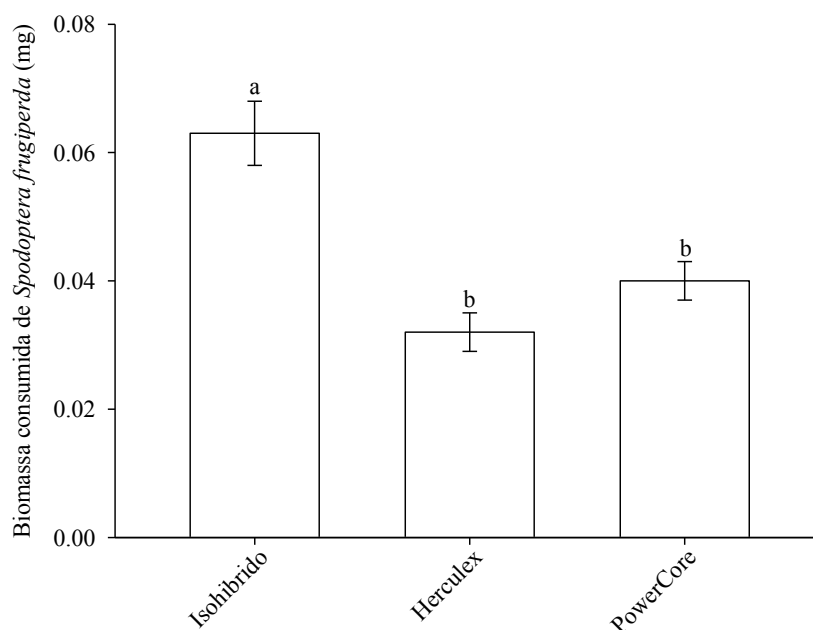
Isohíbrido (A1 - B1), Herculex<sup>®</sup> (A2 – B2) ou PowerCore<sup>®</sup> (A3 – B3). A seta indica a presença das proteínas. A detecção da linha de controle indica que a tira funcionou corretamente (\*).

O ganho de biomassa (mg) de *S. frugiperda* sem exposição à proteína Cry (Isohíbrido) é, aproximadamente, nove vezes maior que em lagartas alimentadas em folhas de milho Herculex<sup>®</sup> ou PowerCore<sup>®</sup> por 48 horas (Fig. 3).



**Figura 3.** Ganho de biomassa de *Spodoptera frugiperda* (mg) após alimentação por 48 horas em genótipos de milho Isohíbrido, Herculex<sup>®</sup> ou PowerCore<sup>®</sup>. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

A biomassa consumida (mg) de *S. frugiperda* por *P. nigrispinus* (predação) foi maior no tratamento Isohíbrido enquanto, Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>®</sup> não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (Fig. 4).



**Figura 4.** Biomassa consumida de *Spodoptera frugiperda* (mg) após alimentação por 48 horas em genótipos de milho Isohíbrido, Herculex<sup>®</sup> ou PowerCore<sup>®</sup> pelo predador *Podisus nigrispinus*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Os resultados para as variáveis de reprodução período de oviposição, número de posturas, número de ovos, número de ovos por postura, número de ninfas, viabilidade dos ovos, período embrionário e longevidade das fêmeas não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Variáveis de reprodução (média  $\pm$  erro padrão) de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) após predação de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com genótipos de milho Isohíbrido, Herculex<sup>®</sup> ou PowerCore<sup>®</sup>. Diamantina, Minas Gerais, Brasil

Variáveis	Isohíbrido	Herculex <sup>®</sup>	PowerCore <sup>®</sup>
Oviposição (dias)	18,41 $\pm$ 7,49a	24,33 $\pm$ 9,83a	17,16 $\pm$ 8,60a
Número de posturas	17,25 $\pm$ 8,40a	21,41 $\pm$ 8,36a	15,25 $\pm$ 6,45a
N. de ovos	222,00 $\pm$ 126,34a	339,75 $\pm$ 195,83a	219,66 $\pm$ 153,28a
N. de ovos por postura	12,28 $\pm$ 3,90a	14,67 $\pm$ 4,78a	13,84 $\pm$ 4,41a
N. de Ninfas	187,91 $\pm$ 114,74a	289,58 $\pm$ 200,30a	187,50 $\pm$ 144,21a
Viabilidade dos ovos (%)	81,73 $\pm$ 10,00a	76,05 $\pm$ 27,94a	84,15 $\pm$ 7,78a
Período embrionário (dias)	4,77 $\pm$ 0,12a	4,29 $\pm$ 1,36a	4,74 $\pm$ 0,13a
Longevidade das fêmeas (dias)	27,91 $\pm$ 9,57a	33,08 $\pm$ 10,84a	25,33 $\pm$ 9,51a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Não houve diferença na duração da fase ninfal de *P. nigrispinus*. No entanto, a duração do V estágio foi de 2 dias a mais quando os predadores consumiram *S. frugiperda* alimentada com o genótipo Isohíbrido. A duração do V estágio foi de 5 dias para o Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>®</sup> (Tabela 2).

**Tabela 2.** Duração em dias (média  $\pm$  erro padrão) dos estádios e da fase ninfal de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) após predação de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com genótipos de milho Isohíbrido, Herculex<sup>®</sup> ou PowerCore<sup>®</sup>. Diamantina, Minas Gerais, Brasil

Estádios	Duração (dias)		
	Isohíbrido	Herculex <sup>®</sup>	PowerCore <sup>®</sup>
I	2,50 $\pm$ 0,17a	2,70 $\pm$ 0,15a	2,38 $\pm$ 0,18a
II	3,40 $\pm$ 0,16a	3,86 $\pm$ 0,26a	3,63 $\pm$ 0,18a
III	2,50 $\pm$ 0,22a	2,86 $\pm$ 0,14a	2,88 $\pm$ 0,35a
IV	3,50 $\pm$ 0,22a	4,00 $\pm$ 0,38a	3,29 $\pm$ 0,18a
V	7,33 $\pm$ 0,67a	5,14 $\pm$ 0,14b	5,50 $\pm$ 0,22b
Fase ninfal	19,11 $\pm$ 1,11a	18,43 $\pm$ 0,75a	17,16 $\pm$ 0,48a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

## 7 DISCUSSÃO

Agentes de controle biológico podem atrasar o aparecimento da resistência de insetos alvo à tecnologia Bt (PEREIRA, 2014). A avaliação dos efeitos de proteínas Cry sobre as variáveis biológicas em laboratório e a densidade populacional em campo são importantes, no entanto, os impactos sobre agentes de controle biológico, como as taxas de predação e parasitismo, e efeitos sobre a dinâmica das pragas são mais críticos (TIAN *et al.*, 2015). Presas expostas à proteína Cry podem reduzir o crescimento e desenvolvimento de inimigos naturais (ROMEIS *et al.*, 2006).

O resultado negativo do teste imunocromatográfico no tratamento Isohíbrido confirma que este genótipo não expressa proteínas Bt. Resultados positivos nos tratamentos Herculex<sup>®</sup> e PowerCore<sup>®</sup> em amostras de folhas, *S. frugiperda* e *P. nigrispinus* demonstram a transferência das diferentes proteínas Cry da planta aos níveis tróficos superiores. A alimentação de lagartas

em folhas de milho contendo a proteína Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2, mesmo que por 48 horas, propiciou o sequestro e transferência para o predador *P. nigrispinus*.

Estudos sobre o fluxo de proteínas Cry na cadeia alimentar confirmam que a maioria dos herbívoros ingerem as proteínas Cry e as transmitem aos seus inimigos naturais (DUTRA *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2018). A quantidade de proteína Bt ingerida pode diferir entre as espécies herbívoras. Essa variação reflete o tempo e o local de expressão da toxina na planta, a ecologia alimentar dos herbívoros e a quantidade de material vegetal ingerido (DEVOS *et al.*, 2012). Porém, as proteínas Cry são diluídas dos níveis tróficos mais baixos para os mais altos devido à excreção e digestão (SVOBODOVÁ *et al.*, 2017 b; LI *et al.*, 2017).

Predadores que se alimentam de herbívoros são expostos a concentrações de proteínas Bt variando de 5% a 50% das concentrações médias nas folhas. Os predadores *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae), *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) e *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) continham de 1% a 30% da concentração de proteínas Bt da presa *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), o que demonstra que as proteínas são diluídas em níveis tróficos superiores (MEISSLE & ROMEIS, 2018). *Podisus nigrispinus* possui uma complementação alimentar sugando água e nutrientes das plantas (PELUZIO *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018), podendo assim, adquirir uma maior concentração de proteínas Bt que outros predadores.

O mecanismo fisiológico de como acontece o sequestro de proteínas Bt não é conhecido. No entanto, quando o inseto ingere uma proteína, esta passa pela membrana peritrófica do intestino médio e pode ser armazenada no corpo gorduroso (TELFER & KUNKEL, 1991; LOCKE & COLLINS, 1968). O movimento de proteínas da hemolinfa para o corpo gorduroso por pinocitose é comum (LOCKE & COLLINS, 1968) e permite que insetos armazenem proteínas ao longo do estágio larval antes da pupação como uma reserva para novos tecidos adultos (LOCKE & COLLINS, 1966; TOJO *et al.*, 1978). Desta forma, isto pode ocorrer em *S. frugiperda* permitindo o movimento das diferentes proteínas Cry da planta aos níveis tróficos superiores.

O maior ganho de biomassa de *S. frugiperda* no milho Isohíbrido em relação aos genótipos transgênicos sugere que insetos alimentados com toxinas Bt podem consumir uma quantidade menor de tecido vegetal como resultado da paralisia intestinal (SIKOROWSKI & LAWRENCE, 1997; PRÜTZ & DETTNER, 2004). Peso reduzido pode ser explicado através de uma taxa mais lenta de alimentação nas plantas Bt (DE SOUSA RAMALHO *et al.*, 2011),

observado visualmente neste trabalho, e uma taxa mais lenta de digestão (RAZZE *et al.*, 2011). *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho Cry1Ab em comparação com aquelas alimentadas com o mesmo híbrido não-Bt tiveram uma redução de 20 vezes em sua biomassa (MENDES *et al.*, 2011). A quantidade de alimento consumido por *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), *S. frugiperda* e *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no cultivar de algodão não Bt (DPL50) foi maior que nas cultivares Bt. Cultivar com duas toxinas apresentou efeitos subletais maiores do que a cultivar de toxina única com redução no tamanho da lagarta (STEWART *et al.*, 2001). Neste estudo não houve diferenças estatísticas entre os genótipos com mais ou menos proteínas Bt.

A menor predação de *P. nigrispinus* em presas alimentadas com milho Bt pode ser devido à menor biomassa e deficiência nutricional das lagartas. O baixo acúmulo de biomassa pode ser um indicador de menor qualidade nutricional (PEREIRA, 2014). O algodoeiro expressando proteína Cry1Ac (cultivar DP 404 BG Bollgard; Monsanto, Santo Louis, MO, USA) afetou negativamente índices nutricionais de *S. frugiperda*, como à taxa de crescimento relativo, taxa relativa de consumo, taxa metabólica relativa, digestibilidade aproximada, custo metabólico, eficiência da conversão alimentar ingerida e a eficiência de conversão alimentar digerida (DE SOUSA RAMALHO *et al.*, 2011). O menor consumo em genótipos de milho transgênico pode afetar também a quantidade de nitrogênio adquirida pelos insetos. É evidente a necessidade de nitrogênio da fonte de alimento vegetal para insetos fitófagos, devido ao papel central que este elemento exerce nos processos metabólicos, estrutura celular e código genético (PIZZAMIGLIO, 1991). *Dicyphus hesperus* (Knight) (Hemiptera: Miridae) alimenta-se mais de presas com altas concentrações de nitrogênio em comparação com aquelas com concentrações baixas (VANKOSKY & VANLAERHOVEN, 2015). Assim, a deficiência nutricional, como a falta de nitrogênio nas presas alimentadas com milho Herculex<sup>®</sup> ou PowerCore<sup>®</sup>, pode desestimular a predação do *P. nigrispinus*.

Ainda, conforme Cunha *et al.* (2013), a ingestão diária de dieta com aproximadamente  $23 \pm 0,70 \text{ ng g}^{-1}$  de Cry1Ac pelo peso úmido das folhas e expressa pelo algodão Bt induz pequenas alterações ultra-estruturais nos granulócitos e plasmatócitos do predador *P. nigrispinus*. A exposição a proteínas Bt provoca também o alongamento de microvilosidades, presença de esferocristais e grânulos de diferentes eletrondensidades, além de alterar o padrão de distribuição de glicogênio, lipídios e cálcio dessas células na região mediana do intestino médio (DA CUNHA *et al.*, 2012), o que pode interferir na capacidade de predação.

*Spodoptera frugiperda* sem exposição à proteína Cry (Isohíbrido) teve maior biomassa para serem predadas, ao contrário de lagartas expostas, que eram rapidamente consumidas por

inteiro. Este trabalho não avaliou número de presas consumidas, mas possivelmente este número seria maior em presas em contato com culturas transgênicas devido à redução do valor nutricional. A predação de ninfas e adultos de *P. nigrispinus* foi maior em *S. frugiperda* alimentada com folhas do cultivar transgênico NuOpal<sup>®</sup> (DE JESUS *et al.*, 2014). Existe uma preferência do predador *H. axyridis* por *S. frugiperda* mais velhas e alimentadas com Bt, quando as diferenças de peso entre as larvas expostas ou não ao Bt aumentaram (SVOBODOVÁ *et al.*, 2017 a). É provável que *H. axyridis* tenha compensado a redução da biomassa de *S. frugiperda* alimentada com Bt, aumentando o número de larvas consumidas (LAWO *et al.*, 2010). Isso explica, em parte, os efeitos indiretos encontrados neste trabalho, do menor consumo de biomassa em *S. frugiperda* alimentadas com milho Herculex<sup>®</sup> ou PowerCore<sup>®</sup>, quando a mesma quantidade de presas são oferecidas aos predadores.

As variáveis de reprodução de *P. nigrispinus* não foram afetadas por presas que se alimentaram de milho transgênico ou Isohíbrido. Resultado semelhante na exposição e desempenho do *P. nigrispinus* a proteínas Cry através de diferentes fontes de alimentos onde o número de ovos por fêmea, número de ovos por dia, fecundidade e fertilidade (CARVALHO *et al.*, 2012), sobrevivência ninfal, duração dos períodos de pré oviposição, oviposição e longevidade de adultos (fêmeas e machos) (SANTANA *et al.*, 2017), não foram afetados. Por outro lado, as variáveis período de oviposição e número de ovos por postura de *P. nigrispinus* foram alteradas quando predaram larvas de *T. molitor* alimentadas com farelo de trigo contendo diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis* do produto biológico Agree<sup>®</sup> (CARVALHO *et al.*, 2018). Apesar das diferenças encontradas nos períodos de oviposição e número de ovos por fêmea, esses valores foram superiores aos encontrados respectivamente, quando o predador foi alimentado com lagartas *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) (VACARI *et al.*, 2007) e com a presa alternativa *T. molitor* (ZANUNCIO *et al.*, 1996; DE BORTOLI *et al.*, 2011).

O prolongamento do quinto estágio de ninfas de *P. nigrispinus* ao preda presas alimentadas com genótipo Isohíbrido pode estar relacionado a diversos fatores como a qualidade alimentar (ZANUNCIO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2011), no entanto, uma duração mais longa de instares finais é comum para esses inimigos naturais (ZANUNCIO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004). As proteínas Cry1A, Cry2Ab e Cry1F não afetam a sobrevivência larval e o tempo de desenvolvimento de *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister) (Neuroptera: Chrysopidae), embora este predador tenha sido exposto a essas toxinas através de presas (TIAN *et al.*, 2013). Por outro lado, a duração do terceiro estágio de *P. nigrispinus* variou de 4,90 a 3,23 dias quando as presas eram alimentadas com algodão transgênico NuOpal<sup>®</sup> e não

transgênico DeltaOpal<sup>®</sup>, respectivamente (DE JESUS *et al.*, 2014). E o desenvolvimento ninfal deste predador foi de 4 dias a mais quando consumiram *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) tratadas com bioinseticida-Bt HD-1, provavelmente devido à má qualidade nutricional das presas. O período ninfal foi de 21,1; 18,6 e 17,1 dias para o HD-1, Agree<sup>®</sup> e o controle, respectivamente (MAGALHÃES *et al.*, 2015).

Nossos resultados mostram que diferentes proteínas Cry se movem através da cadeia alimentar de *P. nigrispinus*. Além disso, fornece evidências de que a ingestão de três diferentes proteínas Cry não leva a efeitos sinérgicos inesperados que poderiam causar impactos adversos sobre a espécie não alvo investigada. Porém, a absorção de toxina Cry e a transferência para demais níveis tróficos devem ser considerados na avaliação de risco ecológico de plantas geneticamente modificadas e no conhecimento a respeito da evolução da resistência e no manejo integrado de pragas em culturas Bt.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. S. T. (2018). Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 28(1), 52.
- CARVALHO, G. A. S. D., MARTINS, D. J., BRITO, I. M. C. D., ASSIS JÚNIOR, S. L. D., SOARES, M. A., LAIA, M. L. D., & VALICENTE, F. H. (2018). Can *Bacillus thuringiensis* affect the biological variables of natural enemies of Lepidoptera? **Arquivos do Instituto Biológico**, 85, p.e0052018.
- CARVALHO, V. F. P., VACARI, A. M., POMARI, A. F., DE BORTOLI, C. P., RAMALHO, D. G., & DE BORTOLI, S. A. (2012). Interaction between the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) and the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. **Environmental Entomology**, 41(6), 1454-1461.
- CUNHA, F. M., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TEIXEIRA, Á. A. C., SANTOS, F. A. B. D., ALVES, L. C., & CAETANO, F. H. (2013). Insect/Bt-cotton interactions: are immunological variables and hemocyte ultrastructure in *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) affected?. **International Journal of Pest Management**, 59(2), 157-164.

CRUZ, J. C. (2010). **Cultivo do Milho**. 6 ed.- Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Brazil.

DA CUNHA, F. M., CAETANO, F. H., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TORRES, J. B., TEIXEIRA, Á. A., & ALVES, L. C. (2012). Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on bt-cotton. **Micron**, 43(2-3), 245-250.

DE BORTOLI, S. A., OTUKA, A. K., VACARI, A. M., MARTINS, M. I., & VOLPE, H. X. (2011). Comparative biology and production costs of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) when fed different types of prey. **Biological Control**, 58(2), 127-132.

DE JESUS, F. G., BOIÇA, A. L., ALVES, G. C., & ZANUNCIO, J. C. (2014). Behavior, development, and predation of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed transgenic and conventional cotton cultivars. **Annals of the Entomological Society of America**, 107(3), 601-606.

DE SOUSA RAMALHO, F., AZEREDO, T. L., DE NASCIMENTO, A. R. B., FERNANDES, F. S., JÚNIOR, J. L. N., MALAQUIAS, J. B., ... & ZANUNCIO, J. C. (2011). Feeding of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on Bt transgenic cotton and its isoline. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 139(3), 207-214.

DEVOS, Y., DE SCHRIJVER, A., DE CLERCQ, P., KISS, J., & ROMEIS, J. (2012). Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms. **Transgenic Research**, 21(6), 1191-1214.

DUTRA, C. C., KOCH, R. L., BURKNESS, E. C., MEISSLE, M., ROMEIS, J., HUTCHISON, W. D., & FERNANDES, M. G. (2012). *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) exhibits no preference between Bt and non-Bt maize fed *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS One**, 7(9), e44867.

FERREIRA, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, 38(2), 109-112.



FIGUEIREDO, M. D. L. C., MARTINS-DIAS, A. M. P., & CRUZ, I. (2006). Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(12), 1693-1698.

GREENE, G. L., LEPLA, N. C., & DICKERSON, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, 69(4), 487-488.

HILBECK, A., & OTTO, M. (2015). Specificity and combinatorial effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in the context of GMO environmental risk assessment. **Frontiers in Environmental Science**, 3, 71.

ISAAA. 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. ISAAA Brief N° 53. **ISAAA: Ithaca, NY**.

LAWO, N. C., WÄCKERS, F. L., & ROMEIS, J. (2010). Characterizing indirect prey-quality mediated effects of a Bt crop on predatory larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. **Journal of Insect Physiology**, 56(11), 1702-1710.

LI, Y., ZHANG, Q., LIU, Q., MEISSLE, M., YANG, Y., WANG, Y., ... & ROMEIS, J. (2017). Bt rice in China—focusing the nontarget risk assessment. **Plant Biotechnology Journal**, 15(10), 1340-1345.

LOCKE, M., & COLLINS, J. V. (1966). Sequestration of protein by the fat body of an insect. **Nature**, 210(5035), 552.

LOCKE, M. T., & COLLINS, J. V. (1968). Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. **The Journal of Cell Biology**, 36(3), 453-483.

MAGALHÃES, G. O., VACARI, A. M., BORTOLI, C. D., POMARI, A. F., BORTOLI, S. D., & POLANCZYK, R. A. (2015). Interactions between Bt-bioinsecticides and *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), a predator of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, 44(5), 521-527.

MARQUES, L. H., SANTOS, A. C., CASTRO, B. A., STORER, N. P., BABCOCK, J. M., LEPPING, M. D., ... & FERNANDES, O. A. (2018). Impact of transgenic soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins on the non-target arthropod community associated with soybean in Brazil. **PloS One**, 13(2), e0191567.

MEISSLE, M., & ROMEIS, J. (2018). Transfer of Cry1Ac and Cry2Ab proteins from genetically engineered Bt cotton to herbivores and predators. **Insect Science**, 25(5), 823-832.

MENDES, S. M., BOREGAS, K. G. B., LOPES, M. E., WAQUIL, M. S., & WAQUIL, J. M. (2011). Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A (b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46(3), 239-244.

NEVES, R. C. D. S., TORRES, J. B., & ZANUNCIO, J. C. (2010). Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. **Biocontrol Science and Technology**, 20(10), 1013-1025.

OLIVEIRA, H. N. D., ESPINDULA, M. C., DUARTE, M. M., PEREIRA, F. F., & ZANUNCIO, J. C. (2011). Development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) reared on guava leaves. Brazilian Archives of **Biology and Technology**, 54(3), 429-434.

OLIVEIRA, H. N. D., PRATISSOLI, D., PEDRUZZI, E. P., & ESPINDULA, M. C. (2004). Development of the predator *Podisus nigrispinus* fed on *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39(10), 947-951.

PELUZIO, R. J. E., CASTRO, B. M. D. C. E., BRÜGGER, B. P., PLATA-RUEDA, A., FERNANDES, F. L., SANTOS, R. H. S., ... & ZANUNCIO, J. C. (2018). Does diet of prey affect life table parameters of the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae)? **Florida Entomologist**, 101(1), 40-43.

PEREIRA, G. (2014). Does Cry1Ab maize interfere in the biology and behavioural traits of *Podisus nigrispinus*?. **Bulletin of Insectology**, 67(2), 265-271.

PIZZAMIGLIO, M. A. (1991). Ecologia das interações inseto/planta. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo, Manole, 101-129.

PRÜTZ, G., & DETTNER, K. (2004). Effect of Bt corn leaf suspension on food consumption by *Chilo partellus* and life history parameters of its parasitoid *Cotesia flavipes* under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 111(3), 179-187.

RAZZE, J. M., MASON, C. E., & PIZZOLATO, T. D. (2011). Feeding behavior of neonate *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) on Cry1Ab Bt corn: Implications for resistance management. **Journal of Economic Entomology**, 104(3), 806-813.

ROMEIS, J., MEISSLE, M., & BIGLER, F. (2006). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, 24(1), 63.

SANTANA, A. G., ÁVILA, C. J., DE OLIVEIRA, H. N., BELLON, P. P., & SCHLICK-SOUZA, E. C. (2017). Direct and Indirect Effect of Bt Cotton and No Bt Cotton on the Development and Reproduction of the Predator *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae). **American Journal of Plant Sciences**, 8(06), 1438.

SIKOROWSKI, P. P., & LAWRENCE, A. M. (1997). **Major diseases of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* in Mississippi fields and insectaries**.

STEWART, S. D., ADAMCZYK, J. J., KNIGHTEN, K. S., & DAVIS, F. M. (2001). Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. **Journal of Economic Entomology**, 94(3), 752-760.

SVOBODOVÁ, Z., BURKNESS, E. C., SKOKOVÁ HABUŠTOVÁ, O., & HUTCHISON, W. D. (2017 a). Predator Preference for Bt-Fed *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Prey: Implications for Insect Resistance Management in Bt Maize Seed Blends. **Journal of Economic Entomology**, 110(3), 1317-1325.

SVOBODOVÁ, Z., SHU, Y., HABUŠTOVÁ, O. S., ROMEIS, J., & MEISSLE, M. (2017 b). Stacked Bt maize and arthropod predators: exposure to insecticidal Cry proteins and potential hazards. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 284(1859), 20170440.

TELFER, W. H., & KUNKEL, J. G. (1991). The function and evolution of insect storage hexamers. **Annual Review of Entomology**, 36(1), 205-228.

TIAN, J. C., WANG, X. P., LONG, L. P., ROMEIS, J., NARANJO, S. E., HELLMICH, R. L., ... & SHELTON, A. M. (2013). Bt crops producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F do not harm the green lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. **PloS One**, 8(3), e60125.

TIAN, J. C., WANG, X. P., LONG, L. P., ROMEIS, J., NARANJO, S. E., HELLMICH, R. L., & SHELTON, A. M. (2014). Eliminating host-mediated effects demonstrates Bt maize producing Cry1F has no adverse effects on the parasitoid *Cotesia marginiventris*. **Transgenic Research**, 23(2), 257-264.

TIAN, J. C., YAO, J., LONG, L. P., ROMEIS, J., & SHELTON, A. M. (2015). Bt crops benefit natural enemies to control non-target pests. **Scientific Reports**, 5, 16636.

TOJO, S., BETCHAKU, T., ZICCARDI, V. J., & WYATT, G. R. (1978). Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. **The Journal of Cell Biology**, 78(3), 823-838.

TORRES, J. B., BARROS, E. M., COELHO, R. R., & PIMENTEL, R. M. (2010). Zoophytophagous pentatomids feeding on plants and implications for biological control. **Arthropod-Plant Interactions**, 4(4), 219-227.

VANKOSKY, M. A., & VANLAERHOVEN, S. L. (2015). Plant and prey quality interact to influence the foraging behaviour of an omnivorous insect, *Dicyphus hesperus*. **Animal Behaviour**, 108, 109-116.

VACARI, A. M., OTUKA, A. K., & DE BORTOLI, S. A. (2007). Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Diatraea*

*saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 74(3), 259-265.

VIEIRA, E. R. D., DE BARROS SILVA, E., SOARES, M. A., JÚNIOR, S. L. A., BARROSO, G. A., & LEMES, P. G. (2018). Lack of macronutrients in *Eucalyptus urophylla* ST Blake (Myrtaceae) seedlings affects feed and development of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: pentatomidae). **Bioscience Journal**, 34(1).

YU, H., ROMEIS, J., LI, Y., LI, X., & WU, K. (2014). Acquisition of Cry1Ac protein by non-target arthropods in Bt soybean fields. **PLoS One**, 9(8), e103973.

ZANUNCIO, J. C., MOLINA-RUGAMA, A. J., SERRAO, J., & PRATISSOLI, D. (2001). Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, 11(3), 331-337.

ZANUNCIO, J. C., MOURÃO, S. A., MARTÍNEZ, L. C., WILCKEN, C. F., RAMALHO, F. S., PLATA-RUEDA, A., ... & SERRÃO, J. E. (2016). Toxic effects of the neem oil (*Azadirachta indica*) formulation on the stink bug predator, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, 6, 30261.

ZANUNCIO, T. V., ZANUNCIO, J. C., SAAVEDRA, J. L., & LOPES, E. D. (1996). Development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) fed with *Zophobas confusa* Gebien (Coleoptera: Tenebrionidae) compared with two other alternative preys. **Revista Brasileira de Zoologia**, 13(1), 159-164.

## **CAPÍTULO CIENTÍFICO II**

### **CITOTOXICIDADE DE PROTEÍNAS CRY NO SISTEMA DIGESTÓRIO DO PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

## 1 RESUMO

É possível que espécies moderadamente suscetíveis ou não suscetíveis a proteínas Cry, possam adquirir essa toxina transferindo-a ao terceiro nível trófico, dessa forma, o uso efetivo de predadores como *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) em programas de manejo integrado de pragas (MIP) depende da compatibilidade do predador com outros métodos de controle. Assim, testamos a hipótese de que o consumo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), como presa, alimentada em genótipos de milho Bt, poderia levar a alterações nas células do intestino médio de *P. nigrispinus*. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos i) Isohíbrido (não Bt), ii) Herculex<sup>®</sup> (milho transgênico que codifica a proteína Cry1F) e iii) PowerCore<sup>®</sup> (milho transgênico piramidado que codifica as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2), com 14 repetições cada. Lagartas de *S. frugiperda* com dez dias foram individualizadas e alimentadas *ad libitum* com folhas de milho transgênico Herculex<sup>®</sup>, PowerCore<sup>®</sup> ou Isohíbrido durante 48 horas. Posteriormente, fêmeas de *P. nigrispinus* com 72 horas de vida foram alimentadas, diariamente, por três dias com uma *S. frugiperda* após alimentação em milho Bt ou Isohíbrido. *Podisus nigrispinus*, após predação de *S. frugiperda*, foram crioanestesiados e dissecados sob estereomicroscópio para remoção do intestino médio que, posteriormente, foi fixado em glutaraldeído. Seções de 3 µm, obtidas em micrótomo, foram coradas com hematoxilina e eosina. As toxinas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 consumidas por *S. frugiperda* promoveram alterações histológicas no predador *P. nigrispinus* (pertencente terceiro nível trófico), ocasionando desorganização da matriz peritrófica, fragmentos de citoplasma e núcleos com cromatina condensada no lúmen e aumento da quantidade e tamanho dos vacúolos nessas células na região mediana do intestino médio. Portanto, concluímos que *S. frugiperda* pode adquirir toxinas Cry e expô-las a *P. nigrispinus*, o que pode interferir na sua capacidade de predação e digestão.

**Palavras-chave:** Histologia, manejo integrado de pragas, toxina Cry

## 2 ABSTRACT

It is possible that species moderately susceptible or not susceptible to Cry proteins, can acquire this toxin and exposing it to the third trophic level, thus, the effective use of predators such as *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) in integrated pest management (MIP) depends on the predator's compatibility with other control methods. Hence, we hypothesized that the consumption of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) as prey fed on Bt maize genotypes could lead to changes in *P. nigrispinus* midgut cells. The experiment was carried out in a completely randomized design with three treatments: i) Isohybrid (not Bt), ii) Herculex<sup>®</sup> (transgenic corn encoding Cry1F protein) and iii) PowerCore<sup>®</sup> (pyramid transgenic maize encoding the Cry1F, Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins), with 14 replicates each. Ten-day *S. frugiperda* caterpillars were individualized and fed *ad libitum* with Isohybrid, Herculex<sup>®</sup> or PowerCore<sup>®</sup> maize leaves for 48 hours. Twenty-two-hour-old *P. nigrispinus* females were fed daily for three days with a *S. frugiperda* after contact with Bt or Isohybrid maize. *Podisus nigrispinus* after predation of *S. frugiperda* were cryoesthetized and dissected under stereomicroscope for removal of the midgut which was later fixed in glutaraldehyde. Sections of 3  $\mu\text{m}$ , obtained in microtome, were stained with hematoxylin and eosin. The toxins Cry1F, Cry1A.105 and Cry2Ab2 consumed by *S. frugiperda* promoted histological changes in the predator *P. nigrispinus* (belonging to the third trophic level), causing disorganization of the peritrophic matrix, fragments of cytoplasm and nuclei with condensed chromatin in the lumen and increase in the amount and size of the vacuoles in these cells in the middle region of the midgut. Therefore, we conclude that *S. frugiperda* can acquire Cry toxins and expose them to *P. nigrispinus*, which can interfere in its predation and digestion capacity.

**Keywords:** Histology, integrated pest management, Cry toxin



### 3 INTRODUÇÃO

O percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) é utilizado como agente de controle biológico em culturas agrícolas e áreas florestais, devido seu fácil manejo e alta capacidade predatória (ZANUNCIO *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2015; MARTÍNEZ *et al.*, 2016).

Entre os métodos utilizados no controle de insetos, destaca-se o uso de plantas geneticamente modificadas (GMs) que expressam proteína inseticida do *Bacillus thuringiensis* (Bt) (WANG *et al.*, 2018). O uso efetivo de *P. nigrispinus* em programas de manejo integrado de pragas (MIP) depende da compatibilidade do predador com outros métodos de controle (DE CASTRO *et al.*, 2015).

Além de se alimentarem de presas, *P. nigrispinus* possui o hábito de sugar partes das plantas para obter água e minerais (TORRES *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2018). Tal comportamento aumenta o risco de contato com toxinas Cry quando expostos a plantas Bt. Para estes insetos predadores, a exposição a proteínas Cry pode causar danos fisiológicos, afetando o comportamento, o desenvolvimento e a longevidade (CUNHA *et al.*, 2013; DE JESUS *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2018).

O sistema digestório é considerado parte integrante do sistema de defesa de insetos, funcionando como uma barreira estrutural, que protege contra a ação de patógenos e toxinas ingeridas durante a alimentação (BROWN *et al.*, 2003). O intestino médio de insetos predadores (Pentatomidae) é anatomicamente dividido em três regiões: anterior, média e posterior, que desempenham diferentes funções na digestão (FIALHO *et al.*, 2012; MARIA DO CARMO *et al.*, 2013).

Após a ingestão, as toxinas Cry podem se ligar a receptores específicos nas microvilosidades das células colunares do intestino médio, formando poros na membrana plasmática, causando lise celular, septicemia e morte do inseto (ARONSON & SHAI, 2001; BRAVO *et al.*, 2007; OESTERGAARD *et al.*, 2007). Assim, testamos a hipótese de que o consumo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), como presa, alimentada em genótipos de milho Bt, poderia levar a alterações nas células do intestino médio de *P. nigrispinus*.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Plantas de milho

Os híbridos Isohíbrido não Bt (controle), Herculex<sup>®</sup> - TC1507 (milho transgênico que codifica a proteína Cry1F) e PowerCore<sup>®</sup> - MON 89034 x TC1507 x NK603 (milho transgênico piramidado que codifica as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2), foram utilizados neste experimento. O milho foi plantado em casa de vegetação em vasos de 8 L. O cultivo foi realizado de acordo com as recomendações para o Brasil (CRUZ, 2010), sem aplicação de inseticidas, fungicidas e herbicidas.

#### 4.2 Criação de insetos

Ovos de *S. frugiperda* foram obtidos da criação massal do Laboratório de Controle Biológico de Insetos (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, Brasil), mantidos à  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $75 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12:12 horas. Após eclosão, larvas foram alimentadas com dieta artificial (GREENE *et al.*, 1976).

Adultos de *P. nigrispinus* foram obtidos da criação massal, mantidos à  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $75 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12:12 horas. Esses insetos foram alimentados *ad libitum* com pupas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Eucalyptus grandis* (Myrtaceae) (NEVES *et al.*, 2010).

#### 4.3 Bioensaios

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: i) Isohíbrido, ii) Herculex<sup>®</sup> e iii) PowerCore<sup>®</sup> com 14 repetições cada. Lagartas ativas de *S. frugiperda* com dez dias após a eclosão foram individualizadas em potes plásticos transparentes (capacidade de 500 g) e alimentadas *ad libitum* com folhas de milho transgênico Herculex<sup>®</sup>, PowerCore<sup>®</sup> ou Isohíbrido no estágio vegetativo V3 por 48 horas. O material foliar foi renovado a cada 24 horas.

Fêmeas de *P. nigrispinus* com 72 horas de vida foram individualizadas e alimentadas, diariamente, por três dias com uma *S. frugiperda* após alimentação com milho Bt ou Isohíbrido.

Para confirmação da presença da proteína Cry1F e das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 nas plantas de milho, na presa *S. frugiperda* e no predador *P. nigrispinus* foi utilizado o kit Envirologix QuickStix<sup>TM</sup> para Cry1F e Cry2A.

Em cada tubo Eppendorf<sup>®</sup>, contendo as amostras, foi adicionado 0,5 ml do tampão de extração, em seguida com pistilo descartável as amostras foram maceradas. Os insetos foram macerados por inteiro. Os eppendorfs<sup>®</sup> foram fechados e agitados cuidadosamente por aproximadamente 30 segundos. Posteriormente os tubos foram colocados em um suporte e uma

tira Enviroligix QuickStix™ Cry1F para amostras do milho Herculex® e uma tira Enviroligix QuickStix™ Cry2A para o milho PowerCore® foram adicionadas. As tiras foram mantidas no interior de cada amostra por cinco minutos para interpretação dos resultados. Em amostras com a presença da proteína Cry1F ou Cry1A.105 e Cry2Ab2, uma segunda linha (linha de teste) foi detectada na região entre a linha de controle e a extremidade inferior da tira. Para amostras negativas, a tira somente desenvolveu a linha de controle.

#### 4.4 Análise histológica

Nove fêmeas de *P. nigrispinus* após predação de *S. frugiperda* foram crioanestesiadas a 4 °C e dissecadas sob microscópio estereoscópico (marca QUIMIS - modelo 1069) para remoção do intestino médio que, posteriormente, foi fixado em glutaraldeído 2,5% durante 24 horas. A desidratação foi realizada em banhos com gradiente crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%) por 10 minutos e incluídas em Histo-resina (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Alemanha) por 24 horas. Seções de 3 µm, obtidas no micrótomo Leica® Ultracut UCT foram coradas com hematoxilina e eosina no Laboratório de Ultraestrutura Celular da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Após a coloração, os cortes foram lavados em água destilada para se retirar o excesso de corante e posterior secagem.

As lâminas coradas foram fotografadas em microscópio Olympus BX-60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão). As imagens (fotomicrografias) foram submetidas ao software Adobe Photoshop®, versão 6.01 (Adobe Systems Incorporated) para ajuste de contraste, controle de branco, balanço e inserção de escala. Posteriormente, as pranchas foram elaboradas a partir das fotomicrografias utilizando o software Corel DRAW 12 (Corel Incorporated).

## 5 RESULTADOS

O teste imunocromatográfico em tiras QuickStix™ para Cry1F e Cry2A foram negativos para amostras de folha de milho, *S. frugiperda* e *P. nigrispinus* no tratamento Isohíbrido. O desenvolvimento da linha de controle, indica que a tira funcionou corretamente.

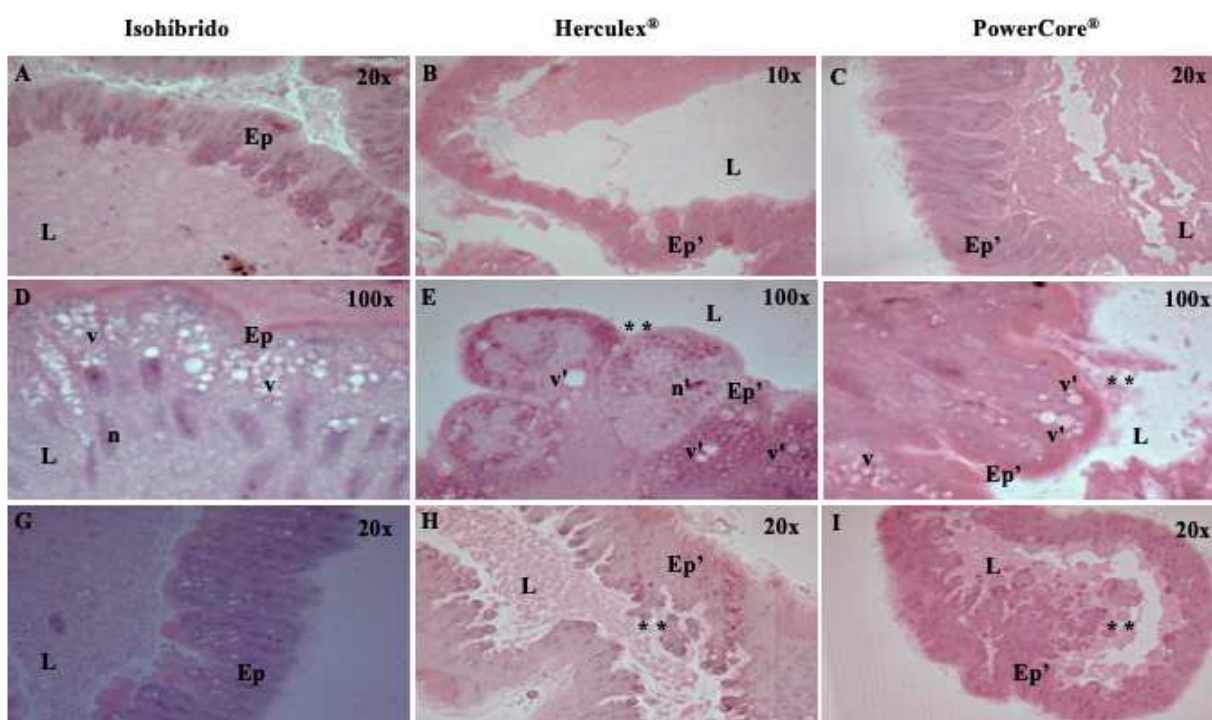
Os resultados das tiras QuickStix™ com folhas de milho Herculex® e PowerCore®, *S. frugiperda* que se alimentaram com milho Bt e amostras com o predador *P. nigrispinus* que predaram *S. frugiperda*, foram positivos.

O intestino de fêmeas de *P. nigrispinus* não expostas a proteínas Cry apresentou epitélio composto de células colunares e porção apical com borda estriada. O citoplasma das células

colunares apresentou pequenos vacúolos, vesículas secretoras com diâmetros similares e pequenos grânulos (Fig1. A, D e G).

Alterações histológicas foram observadas no intestino de *P. nigrispinus* após exposição às proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2. O epitélio apresentou formato irregular, início da degeneração celular e fragmentos celulares foram observados. Fragmentos de citoplasma e núcleo com cromatina condensada foram notados no lúmen do intestino médio. A matriz peritrófica apresentou-se desorganizada (Fig1. B, C, E e F).

Após exposição a proteínas Cry, a quantidade e tamanho dos vacúolos aumentaram, ocupando grande parte do volume celular. A presença de inúmeras vesículas secretoras no citoplasma epitelial, de variados tamanhos, localizados na região apical celular pode ser observada, onde o conteúdo citoplasmático se projeta para o meio externo (Fig1. E, F, H e I).



**Figura 1.** Seções histológicas do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) após predação *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentada com milho Isohíbrido, Herculex® ou PowerCore®. Intestino anterior (A à C), médio (D à F) e posterior (G à I) mostrando efeitos das proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 com maior número de vacúolos (v) grandes (v'), núcleos (n) com cromatina condensada (n'), fragmentos celulares (\*\*) liberados no lúmen (L) e epitélio (Ep) com formato irregular (Ep') (B, C, E, F, H e I).

## 6 DISCUSSÃO

No milho, é possível que espécies moderadamente suscetíveis ou não suscetíveis a proteínas Cry, possam adquirir essa toxina transferindo-a ao terceiro nível trófico. Assim, espécies de Lepidoptera como o gênero *Spodoptera* podem ser afetadas pelo milho Bt (GÓMEZ *et al.*, 2018), e transmitir essa toxina a seus predadores.

A suscetibilidade de *P. nigrispinus* às proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 após predação de *S. frugiperda* alimentada em genótipos de milho Bt foi observada pela ocorrência de alterações histológicas no complexo digestório desse predador. De Oliveira *et al.* (2016) sugerem que as enzimas do trato digestório de *P. nigrispinus* não degradam totalmente a toxina Cry1Ac.

A suscetibilidade de insetos a proteína Bt varia com tempo e o local de expressão da toxina na planta, a ecologia alimentar dos herbívoros, a quantidade de material vegetal ingerido (DEVOS *et al.*, 2012) e a presença de receptores específicos nas microvilosidades das células colunares do intestino médio (BRAVO *et al.*, 2007; DE CASTRO *et al.*, 2017; JAVED *et al.*, 2019).

Características típicas de degeneração celular, como epitélio com formato irregular, aumento da vacuolização citoplasmática, condensação de cromatina e fragmentos celulares com conteúdo citoplasmático e nuclear sendo liberados no lúmen do intestino de *P. nigrispinus* mostram possíveis efeitos das toxinas Bt. Essas alterações morfológicas podem indicar uma redução na capacidade digestiva de insetos como já observado em *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (BARBETA *et al.*, 2008; E CASTRO *et al.*, 2019), sugerindo resposta ao efeito tóxico do Bt.

Fragmentos celulares liberados no lúmen do intestino médio de *P. nigrispinus* após predação de *S. frugiperda* alimentada com milho transgênico implica efeito citotóxico causando apoptose, um padrão morfológico de morte celular programada (IHARA *et al.*, 1998). A eliminação de células pela morte celular (DOS SANTOS *et al.*, 2015) seria uma resposta ao dano às células epiteliais do intestino médio após ingestão de Bt. Estímulos como infecções, mutações, presença de vírus, agressões tóxicas como inseticidas ou herbicidas, choque térmico, baixa quantidade de nutrientes, radiação ionizante, entre outros, foram descritos como desencadeadores deste processo de morte celular (GONÇALVES *et al.*, 2013; DANIEL *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Apesar da importância da apoptose na eliminação de células danificadas ou infectadas que podem interferir na sua função normal, a mesma em excesso pode prejudicar o funcionamento tecidual (PORTT *et al.*, 2011; CLAPP *et al.*, 2012), afetando importantes processos na digestão e, conseqüentemente, a predação e sobrevivência.

A desorganização da matriz peritrófica do intestino médio de *P. nigrispinus* expostos a proteínas Cry compromete a absorção de nutrientes e expõe células epiteliais a danos mecânicos provocados pelo bolo alimentar. Essa membrana, em algumas regiões do intestino médio de *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas de algodão transgênico com genes Bt, foi destruída (SOUSA *et al.*, 2010). Essa matriz age como uma barreira contra produtos tóxicos, retardando o contato com células digestórias (TERRA, 1988; ALBUQUERQUE-CUNHA *et al.*, 2004; TERRA *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2007).

A presença de vacúolos nas células do intestino médio é habitual em insetos (ALVES *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2015), mas sua maior quantidade no citoplasma tem sido caracterizada como processo de autofagia (LEVINE & KLIONSKY, 2004; SANTOS *et al.*, 2015). Os efeitos histológicos observados no intestino de *P. nigrispinus* sugerem uma tentativa de desintoxicação das proteínas Cry.

A vacuolização citoplasmática sugere que a célula está no estágio inicial de degradação autofágica de componentes celulares danificados em resposta ao estresse químico e/ou fisiológico (CLARKE, 1990; LOCKSHIN & ZAKERI, 2004). A autofagia não necessariamente culmina com a morte celular, pois é um processo fisiológico normal de reciclagem de proteínas e organelas (FERREIRA *et al.*, 2013). No entanto, se o estresse químico prevalecer, a célula pode morrer pela autofagia ou desencadear apoptose (FIAZ *et al.*, 2018; MARTÍNEZ *et al.*, 2019).

A ingestão diária de dieta com aproximadamente  $23 \pm 0,70 \text{ ng g}^{-1}$  de Cry1Ac pelo peso úmido das folhas e expressa pelo algodão Bt induz pequenas alterações ultraestruturais nos granulócitos e plasmatócitos do predador *P. nigrispinus* (CUNHA *et al.*, 2013). A exposição a proteínas Bt provoca também o alongamento de microvilosidades, presença de esferocristais e grânulos de diferentes eletrondensidades, além de alterar o padrão de distribuição de glicogênio, lipídios e cálcio dessas células na região mediana do intestino médio (DA CUNHA *et al.*, 2012).

A conservação de inimigos naturais para ajudar no controle de pragas é um desafio no MIP, assim o uso de plantas Bt chama à atenção de pesquisadores em relação ao seu possível efeito adverso sobre organismos não alvos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). No presente estudo, as toxinas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 consumidas por *S. frugiperda* promoveram alterações histológicas no *P. nigrispinus* (terceiro nível trófico), ocasionando desorganização da matriz

peritrófica, fragmentos do citoplasma e núcleos com cromatina condensada no lúmen e aumento da quantidade e tamanho dos vacúolos nessas células na região mediana do intestino médio. Assim, concluímos que *S. frugiperda* pode sequestrar toxinas Cry e expô-las a *P. nigrispinus*, o que pode interferir na sua capacidade de predação.

## 7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M., MELLO, C. B., GARCIA, E. S., AZAMBUJA, P., DE SOUZA, W., GONZALEZ, M. S., & NOGUEIRA, N. F. S. (2004). Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut epithelial cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(8), 815-822.

ALVES, C. R., ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M., MELLO, C. B., GARCIA, E. D. S., NOGUEIRA, N. F., BOURGUINGNON, S. C., ... & GONZALEZ, M. S. (2007). *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, 116(1), 44-52.

ALVES, S. N., SERRÃO, J. E., & MELO, A. L. (2010). Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides. **Micron**, 41(6), 592-597.

ARONSON, A. I., & SHAI, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, 195(1), 1-8.

BARBETA, B. L., MARSHALL, A. T., GILLON, A. D., CRAIK, D. J., & ANDERSON, M. A. (2008). Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105(4), 1221-1225.

BRAVO, A., GILL, S. S., & SOBERON, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, 49(4), 423-435.

BROWN, M. J. F., MORET, Y., & SCHMID-HEMPEL, P. (2003). Activation of host constitutive immune defence by an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. **Parasitology**, 126(3), 253-260.

CARVALHO, G. A. S. D., MARTINS, D. J., BRITO, I. M. C. D., ASSIS JÚNIOR, S. L. D., SOARES, M. A., LAIA, M. L. D., & VALICENTE, F. H. (2018). Can *Bacillus thuringiensis* affect the biological variables of natural enemies of Lepidoptera? **Arquivos do Instituto Biológico**, 85, p. e0052018.

CLAPP, C., PORTT, L., KHOURY, C., SHEIBANI, S., EID, R., GREENWOOD, M., ... & GREENWOOD, M. D. (2012). Untangling the roles of anti-apoptosis in regulating programmed cell death using humanized yeast cells. **Frontiers in Oncology**, 2, 59.

CLARKE, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embryology**, 181(3), 195-213.

CRUZ, J. C. (2010). **Cultivo do Milho**. 6 ed.- Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Brazil.

CUNHA, F. M., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TEIXEIRA, Á. A. C., SANTOS, F. A. B. D., ALVES, L. C., & CAETANO, F. H. (2013). Insect/Bt-cotton interactions: are immunological variables and hemocyte ultrastructure in *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) affected? **International Journal of Pest Management**, 59(2), 157-164.

DA CUNHA, F. M., CAETANO, F. H., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TORRES, J. B., TEIXEIRA, Á. A., & ALVES, L. C. (2012). Ultra-structure and histochemistry of digestive cells of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) fed with prey reared on bt-cotton. **Micron**, 43(2-3), 245-250.

DANIEL, A. G., PETERSON, E. J., & FARRELL, N. P. (2014). The Bioinorganic Chemistry of Apoptosis: Potential Inhibitory Zinc Binding Sites in Caspase-3. **Angewandte Chemie International Edition**, 53(16), 4098-4101.



DE CASTRO, A. A., PODEROSO, J. C. M., RIBEIRO, R. C., LEGASPI, J. C., SERRÃO, J. E., & ZANUNCIO, J. C. (2015). Demographic parameters of the insecticide-exposed predator *Podisus nigrispinus*: implications for IPM. **BioControl**, 60(2), 231-239.

DE CASTRO, D. L. M., GARCÍA-GÓMEZ, B. I., GÓMEZ, I., BRAVO, A., & SOBERÓN, M. (2017). Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod binding-proteins from *Spodoptera frugiperda*. **Peptides**, 98, 99-105.

DE JESUS, F. G., BOIÇA, A. L., ALVES, G. C., & ZANUNCIO, J. C. (2014). Behavior, development, and predation of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed transgenic and conventional cotton cultivars. **Annals of the Entomological Society of America**, 107(3), 601-606.

DE OLIVEIRA, A. C. B., DE SIQUEIRA, H. Á. A., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., & TEIXEIRA, Á. A. C. (2016). Proteolytic activity characterization of *Podisus nigrispinus* gut contents and apparent lack of Cry1Ac toxin hydrolysis. **Bulletin of Insectology**, 69(1), 143-148.

DEVOS, Y., DE SCHRIJVER, A., DE CLERCQ, P., KISS, J., & ROMEIS, J. (2012). Bt-maize event MON 88017 expressing Cry3Bb1 does not cause harm to non-target organisms. **Transgenic Research**, 21(6), 1191-1214.

DOS SANTOS, M. C., JUNQUEIRA, M. R., DE SÁ, V. M., ZANÚNCIO, J. C., & SERRÃO, J. E. (2015). Effect of silicon on the morphology of the midgut and mandible of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae. **Invertebrate Survival Journal**, 12(1), 158-165.

E CASTRO, B. M. D. C., MARTINEZ, L. C., BARBOSA, S. G., SERRÃO, J. E., WILCKEN, C. F., SOARES, M. A., ... & ZANUNCIO, J. C. (2019). Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Scientific Reports**, 9(1), 6667.

FERNANDES, K. M., GONZAGA, W. G., PASCINI, T. V., MIRANDA, F. R., TOMÉ, H. V. V., SERRÃO, J. E., & MARTINS, G. F. (2015). Imidacloprid impairs the post-embryonic

development of the midgut in the yellow fever mosquito *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). **Medical and Veterinary Entomology**, 29(3), 245-254.

FERREIRA, R. A. C., ZACARIN, E. C. M. S., MALASPINA, O., BUENO, O. C., TOMOTAKE, M. E. M., & PEREIRA, A. M. (2013). Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. **Micron**, 46, 57-65.

FIALHO, M. C., MOREIRA, N. R., ZANUNCIO, J. C., RIBEIRO, A. F., TERRA, W. R., & SERRÃO, J. E. (2012). Prey digestion in the midgut of the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Physiology**, 58(6), 850-856.

FAIZ, M., MARTÍNEZ, L. C., PLATA-RUEDA, A., GONÇALVES, W. G., SHAREEF, M., ZANUNCIO, J. C., & SERRÃO, J. E. (2018). Toxicological and morphological effects of tebufenozide on *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Chemosphere**, 212, 337-345.

GÓMEZ, I., OCELOTL, J., SÁNCHEZ, J., LIMA, C., MARTINS, E., ROSALES-JUÁREZ, A., ... & PEÑA, G. (2018). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Fa toxicity to *Spodoptera frugiperda* by domain III mutations indicates there are two limiting steps in toxicity as defined by receptor binding and protein stability. **Applied and Environmental Microbiology**, 84(20), e01393-18.

GONÇALVES, C. A. P., BOTTEON, P. T. L., ALVES, G. E. S., FALEIROS, R. R., PAES LEME, F. O., MENDES, H. M. F., & VASCONCELOS, A. C. (2013). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on apoptosis of epidermal lamellar cells of equines with laminitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 65(5), 1409-1418.

GONÇALVES, T. S., SOARES, M. A., SANTOS, C. A., SANTOS, D. A., SANTOS, J. B., & BARROSO, G. A. (2016). Does the ingestion of isoxaflutole herbicide affect the midgut and salivary glands of Pentatomidae Predators? **Planta Daninha**, 34(1), 125-132.

GREENE, G. L., LEPPLA, N. C., & DICKERSON, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, 69(4), 487-488.

IHARA, T., YAMAMOTO, T., SUGAMATA, M., OKUMURA, H., & UENO, Y. (1998). The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. **Virchows Archiv**, 433(5), 443-447.

JAVED, M. A., COUTU, C., THEILMANN, D. A., ERLANDSON, M. A., & HEGEDUS, D. D. (2019). Proteomics analysis of *Trichoplusia ni* midgut epithelial cell brush border membrane vesicles. **Insect Science**, 26(3), 424-440.

LEVINE, B., & KLIONSKY, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental Cell**, 6(4), 463-477.

LOCKSHIN, R. A., & ZAKERI, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36(12), 2405-2419.

MARIA DO CARMO, Q. F., TERRA, W. R., MOREIRA, N. R., ZANUNCIO, J. C., & SERRÃO, J. E. (2013). Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Arthropod Structure & Development**, 42(4), 277-285.

MARQUES, L. H., SANTOS, A. C., CASTRO, B. A., STORER, N. P., BABCOCK, J. M., LEPPING, M. D., ... & FERNANDES, O. A. (2018). Impact of transgenic soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins on the non-target arthropod community associated with soybean in Brazil. **PloS One**, 13(2), e0191567.

MARTÍNEZ, L. C., FIALHO, M. D. C. Q., BARBOSA, L. C. A., OLIVEIRA, L. L., ZANUNCIO, J. C., & SERRÃO, J. E. (2016). Stink bug predator kills prey with salivary non-proteinaceous compounds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 68, 71-78.

MARTÍNEZ, L. C., PLATA-RUEDA, A., GONÇALVES, W. G., FREIRE, A. F. P. A., ZANUNCIO, J. C., BOZDOĞAN, H., & SERRÃO, J. E. (2019). Toxicity and cytotoxicity of the insecticide imidacloprid in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 167, 69-75.

NEVES, R. C. D. S., TORRES, J. B., & ZANUNCIO, J. C. (2010). Production and storage of mealworm beetle as prey for predatory stinkbug. **Biocontrol Science and Technology**, 20(10), 1013-1025.

OESTERGAARD, J., EHLERS, R. U., MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C., & REAL, M. D. (2007). Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(11), 3623-3629.

PIRES, E. M., SOARES, M. A., NOGUEIRA, R. M., ZANUNCIO, J. C., MOREIRA, P. S. A., & DE OLIVEIRA, M. A. (2015). Seven decades of studies with Asopinae predators in Brazil (1933●-○ 2014). **Bioscience Journal**, 31(5).

PORTT, L., NORMAN, G., CLAPP, C., GREENWOOD, M., & GREENWOOD, M. T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(1), 238-259.

SANTOS, D. E., AZEVEDO, D. O., CAMPOS, L. A. O., ZANUNCIO, J. C., & SERRÃO, J. E. (2015). *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. **Protoplasma**, 252(2), 619-627.

SOUSA, M. E. C., SANTOS, F. A., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., TEIXEIRA, Á. A., DE SIQUEIRA, H. Á. A., ALVES, L. C., & TORRES, J. B. (2010). Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. **Journal of Insect Physiology**, 56(12), 1913-1919.

TERRA, W. R. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 21(4), 675-734.

TERRA, W. R., COSTA, R. H., & FERREIRA, C. (2006). Plasma membranes from insect midgut cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 78(2), 255-269.

TORRES, J. B., BARROS, E. M., COELHO, R. R., & PIMENTEL, R. M. (2010). Zoophytophagous pentatomids feeding on plants and implications for biological control. **Arthropod-Plant Interactions**, 4(4), 219-227.

VIEIRA, E. R. D., DE BARROS SILVA, E., SOARES, M. A., JÚNIOR, S. L. A., BARROSO, G. A., & LEMES, P. G. (2018). Lack of macronutrients in *Eucalyptus urophylla* ST Blake (Myrtaceae) seedlings affects feed and development of *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: pentatomidae). **Bioscience Journal**, 34(1).

WANG, G., DONG, Y., LIU, X., YAO, G., YU, X., & YANG, M. (2018). The current status and development of insect-resistant genetically engineered poplar in China. **Frontiers in Plant Science**, 9.

ZANUNCIO, J. C., SILVA, C. A. D. D., LIMA, E. R. D., PEREIRA, F. F., RAMALHO, F. D. S., & SERRÃO, J. E. (2008). Predation rate of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with and without defense by *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51(1), 121-125.

## CONCLUSÃO GERAL

Nossos resultados mostram que as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 se movem através da cadeia alimentar de *P. nigrispinus*. Além disso, fornece evidências de que a ingestão de três diferentes proteínas Cry não leva a efeitos sinérgicos inesperados que poderiam causar impactos adversos sobre a espécie não alvo investigada. No entanto, as toxinas Cry promoveram alterações histológicas nas células do intestino médio de *P. nigrispinus*.

Assim, a absorção de toxina Cry e a transferência para demais níveis tróficos devem ser considerados na avaliação de risco ecológico de plantas geneticamente modificadas e no conhecimento a respeito da evolução da resistência e no manejo integrado de pragas em culturas Bt.