

GABRIELA DA SILVA ROLIM

**EFEITOS SUB-LETAIS DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDADE KURSTAKI SOBRE
Palmistichus elaeisis E *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R748e
2019

Rolim, Gabriela da Silva, 1986-
Efeitos sub-letais de *Bacillus thuringiensis* variedade
Kurstaki sobre *Palmistichus elaeisis* e *Tetrastichus howardi*
(Hymenoptera : Eulophidae) / Gabriela da Silva Rolim. –
Viçosa, MG, 2019.
vii, 44 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanuncio.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Parasitismo. 3. Relação
hospedeiro-parasito. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.953

GABRIELA DA SILVA ROLIM

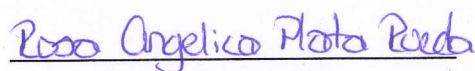
**EFEITOS SUB-LETAIS DE *Bacillus thuringiensis* VARIEDADE *KURSTAKI* SOBRE
Palmistichus elaeisis E *Tetrastichus howardi* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

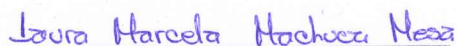
APROVADA: 31 de julho de 2019.



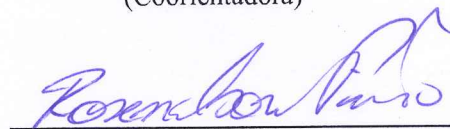
Luis Carlos Martínez Castrillón
(Coorientador)



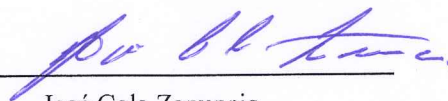
Rosa Angelica Plata Rueda
(Coorientadora)



Laura Marcela Machuca Mesa



Rosenilson Pinto



José Cola Zanuncio
(Orientador)

Ao Meu querido e amado pai, Geraldo Batista Rolim (in memoriam)

À Minha amada Mãe, Raimunda Euda da Silva

Ao Meu irmão, Geraldo da Silva Rolim

Eu dedico de todo meu coração este trabalho e título.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu trilhar esse caminho do conhecimento, me dando coragem, fé, força e perseverança para não desistir nos momentos difíceis. E, por todas as oportunidades que tem me concedido.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitotecnia e Departamento de Entomologia pelo apoio à realização desta pesquisa. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. José Cola Zanuncio e os Coorientadores Dr. Genésio Tâmara Ribeiro, Dr. Luis Carlos Martinez Castrillón e Dra. Rosa Angelica Plata-Rueda pela amizade, ensinamentos, paciência e disponibilidade para a realização desta pesquisa. Tenho plena ciência do meu amadurecimento como pessoa e pesquisadora graças a todos os seus conselhos. Muito obrigada.

À equipe do laboratório de Controle Biológico de Insetos, Bárbara Monteiro, Bruno Brugger, Carlos Henrique, Carlos Menezes e José Milton pela ajuda, amizade e apoio fundamental nessa jornada.

Não poderia deixar de citar nomes importantes que desde o início me acompanharam aqui em Viçosa, em especial, Fernanda Lamede, Dandara Felix, Bruno Freitas, José Geraldo, Juliana Mendonça, Valdeir Celestino, Tássia Fernanda, Ronaldo Vinícius, Wiane Meloni, Germano Vinha e Fernanda Andrade, obrigada por serem meu apoio e minha família nessa cidade. Obrigada por me acolherem tão bem, me ouvirem, me aconselharem e o mais importante, por terem ficado do meu lado em todos os momentos. Sou uma pessoa imensamente feliz por ter vocês ao meu lado.

Aos meus amigos de longa data que mesmo distantes sempre se fizeram presentes, torcendo e apoiando nessa jornada, Valter Junior, Jéssica Sá, Karol Oliveira, Isadora Ravine, Morgana Galvão, Karolline Souza e Tamires Reis, muito obrigada por todas as mensagens para me tranquilizar, reencontros e abraços acolhedores. Gratidão resume.

À minha amada família, por todo o apoio e incentivo. Em especial, a minha mãe, por ser essa mulher guerreira, e por me dar tanto amor, carinho e compreensão. Obrigada por ser sempre o meu porto seguro. Ao meu irmão, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando a buscar meus sonhos. E ao meu pai, que onde quer que ele esteja, tenho plena certeza que está ao meu lado.

RESUMO

ROLIM, Gabriela da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Efeitos sub-letais de *Bacillus thuringiensis* variedade *kurstaki* sobre *Palmistichus elaeisis* e *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae)**. Orientador: José Cola Zanuncio. Coorientadores: Genésio Tâmara Ribeiro, Luis Carlos Martinez Castrillón e Rosa Angelica Plata Rueda.

Os endoparasitoides *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) e *Tetrastichus howardi* Olliff (Hymenoptera: Eulophidae) são utilizados no controle de lepidópteros desfolhadores. Inseticidas podem reduzir a manutenção de inimigos naturais em campo, mas produtos biológicos, como o *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*), representam uma alternativa ecológica para o manejo de insetos-praga e interações *Bt*-inimigos naturais devem ser estudadas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos colaterais causados pelo *Bt* na geração parental (F_1) e prole (F_2) de *P. elaeisis* e *T. howardi* parasitando *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) suscetível e resistente. A toxicidade do *Bt* foi avaliada em lagartas suscetíveis de terceiro instar de *S. frugiperda*. Essas lagartas foram expostas a concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) do *Bt* e parasitadas por *P. elaeisis* e *T. howardi*. A longevidade, produção de imaturos, resposta comportamental e desempenho reprodutivo de *P. elaeisis* e *T. howardi* foram mensuradas. O *Bt* reduziu a produção de imaturos e exibiu atividade repelente sobre *P. elaeisis* e *T. howardi*. A sobrevivência desses parasitoides, parasitando lagartas que ingeriram o *Bt* foi menor nas F_1 e F_2 para ambos os sexos. O desempenho reprodutivo de *P. elaeisis* e *T. howardi* foi menor tanto em pupas suscetíveis quanto resistentes (expostas ao *Bt*) de *S. frugiperda*. O bioinseticida reduz o comportamento de busca e parâmetros reprodutivos de *P. elaeisis* e *T. howardi* emergidos de pupas de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes ao *Bt* sugerindo uma baixa compatibilidade entre *Bt* e o parasitoide.

ABSTRACT

ROLIM, Gabriela da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on *Palmistichus elaeisis* and *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae).** Adviser: José Cola Zanuncio. Co-advisers: Genésio Tâmara Ribeiro, Luis Carlos Martinez Castrillón and Rosa Angelica Plata Rueda.

The endoparasitoids, *Palmistichus elaeisis* Delvare and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) and *Tetrastichus howardi* Olliff (Hymenoptera: Eulophidae) are used to control of lepidopteran defoliating. Insecticides may reduce the maintenance of natural enemies in the field, but biological agents such as *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) represents an ecological alternative for pest management, and *Bt*-natural enemy interactions should be studied. The objective of this work was to evaluate the sublethal effects caused by *Bt* on the parental (F₁) and offspring (F₂) of *P. elaeisis* and *T. howardi* parasitizing susceptible and resistant *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bt* toxicity was evaluated in the third instar larvae susceptible of *S. frugiperda*. These larvae were exposed to lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) of *Bt* and parasitized by *P. elaeisis* and *T. howardi*. Longevity, immature production, behavioral response, and reproductive performance of *P. elaeisis* and *T. howardi* were measured. *Bt* reduced immature production and exhibited repellent activity on *P. elaeisis* and *T. howardi*. The survival of these parasitoids, parasitizing pupa that ingested *Bt* was lower in F₁ and F₂ for both sexes. The reproductive performance of *P. elaeisis* and *T. howardi* was lower in both susceptible and resistant (exposed to *Bt*) pupae of *S. frugiperda*. *Bacillus thuringiensis* reduces the search behavior and reproductive parameters of *P. elaeisis* and *T. howardi* emerged from susceptible and *Bt*-resistant *S. frugiperda* pupae, suggesting a low compatibility between *Bt* and these parasitoids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	3
Capítulo 1	6
Resumo	6
1. Introdução	6
2. Material e Métodos	8
2.1 Insetos	8
2.2 Teste de concentração-mortalidade	8
2.3 Teste de tempo-mortalidade	9
2.4 Produção de imaturos de <i>P. elaeisis</i>	9
2.5 Resposta comportamental	9
2.6 Sobrevivência do parasitoide em F ₁ e F ₂	10
2.7 Desempenho reprodutivo do parasitoide	10
2.8 Análise estatística	11
3. Resultados	11
3.1 Concentração e tempo-mortalidade de lagartas suscetíveis ao <i>Bt</i>	11
3.2 Produção de imaturos de <i>P. elaeisis</i>	12
3.3 Resposta comportamental	14
3.4 Sobrevivência dos adultos de <i>P. elaeisis</i>	15
3.5 Desempenho reprodutivo de <i>P. elaeisis</i>	16
4. Discussão	17
5. Referências	20
Capítulo 2	25
Resumo	25
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	27
2.1 Insetos	27
2.2 Teste de concentração-mortalidade	27
2.3 Teste de tempo-mortalidade	28
2.4 Produção de imaturos de <i>T. howardi</i>	28
2.5 Resposta comportamental	28
2.6 Sobrevivência do parasitoide em F ₁ e F ₂	29
2.7 Desempenho reprodutivo do parasitoide	29

2.8 Análise estatística	29
3. Resultados	30
3.1 Concentração e tempo-mortalidade de lagartas suscetíveis ao <i>Bt</i>	30
3.2 Produção de imaturos de <i>T. howardi</i>	31
3.3 Resposta comportamental	33
3.4 Sobrevivência dos adultos de <i>T. howardi</i>	34
3.5 Desempenho reprodutivo de <i>T. howardi</i>	35
4. Discussão	35
5. Referências.....	38
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44

1. INTRODUÇÃO GERAL

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto mais importante das Américas, e se tornou praga invasora na África e Ásia (Montezano et al., 2018). O inseto é polífago e cosmopolita, que se alimenta de uma ampla gama de espécies vegetais cultivadas (Casmuz et al. 2010; Kenis et al., 2019), porém seu maior dano é observado em Poaceae (Bueno et al., 2011; Hardke et al., 2015), sendo registrada no arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*) (Yang et al., 2017; Zuleta-Castro et al., 2017). No milho, as lagartas de *S. frugiperda* podem ser encontradas em todo o dossel da planta, causando prejuízos desde a fase de emergência das plântulas até a fase reprodutiva (Rodrigues-Del-Bosque et al., 2011). Esse inseto é exótico do hemisfério ocidental, com rápida disseminação devido a elevada capacidade de dispersão dos adultos (Barros et al., 2010).

O controle de *S. frugiperda* ainda é baseado no uso de inseticidas, onde o grau de seletividade aos inimigos naturais, nem sempre é considerado (Toscano et al., 2012), limitando a interação do controle químico com o biológico (Brunner, 1994). Os principais produtos químicos registrados para o controle desta praga são os benzoilureias, espinosinas, metilcarbamato de oxima, organofosforados e piretroides (Agrofit, 2019). Novos produtos são, constantemente, desenvolvidos para o controle de insetos pragas, reduzindo os índices de resistência das pragas, e os danos ao ambiente (Sparks, 2013). Substâncias de origem vegetal e agentes entomopatogênicos são boas alternativas, por serem seletivos, eficazes contra várias espécies de pragas e a estratégia mais segura para o homem e organismos não-alvo (Rattan, 2010).

Alternativas mais ecológicas que minimizem as perdas geradas por insetos considerados pragas são necessárias. O controle biológico aplicado, por meio do uso de medidas dentro de um programa de manejo integrado de pragas, promove a conservação do ambiente e a multiplicação de inimigos naturais (Moura e Moura, 2011). Os parasitoides (Pratissoli et al., 2005) e entomopatógenos (Nava et al., 2006).

Os bioinseticidas produzidos a partir da bactéria *Bacillus thuringiensis* são utilizados desde a segunda metade do século XX (Rosas-Garcia, 2009; Sanahuja et al., 2011). As propriedades do *Bt* a uma ampla gama de insetos ocorrem em razão das proteínas cristalinas (Cry) produzidas durante a esporulação (Palma et al., 2014). As toxinas de *Bt* promove a ruptura das células do epitélio do intestino médio dos insetos suscetíveis, causando um desequilíbrio no balanço osmótico destas células (Vachon et al., 2012).

As plantas transgênicas que expressam as proteínas Cry derivadas do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) são uma ferramenta importante para proteção às plantas contra imaturos da ordem Lepidoptera, principalmente para o controle de *S. frugiperda* (Sanahuja et al., 2011). Porém, a exposição contínua de insetos a plantas transgênicas pode contribuir para resistência da população de pragas (Baranek et al., 2017). Em situações de populações resistentes de *S. frugiperda*, utiliza-se culturas transgênicas que produzem duas ou mais toxinas de *Bt* ativas para retardar a evolução da resistência (Santos-Amaya et al., 2015).

O manejo de pragas utilizando plantas transgênicas, às vezes, não é possível, no caso de florestas, ou é restrita por lei (Baranek et al., 2017). Com isso, uma alternativa promissora para o controle biológico aplicado é a utilização de parasitoides, por representarem baixos custos, eficiência e menor risco para o ambiente (Barrat et al., 2010; Favero et al., 2013). Para *S. frugiperda* são relatadas 150 espécies de parasitoides, distribuídos em 13 famílias (Molina-Ochoa et al., 2003). Sendo mais comuns as espécies que parasitam ovos ou lagartas, como Braconidae, Eulophidae, Ichneumonidae e Trichogrammatidae (Hoballah et al., 2004; Zanuncio et al., 2008).

Interações entre *Bacillus thuringiensis* e parasitoides, ainda é pouco estudado. Os impactos são indiretos, sendo intermediado pelo hospedeiro, resultando em efeitos sobre os parâmetros reprodutivos desses inimigos naturais, como reprodução, tamanho da progênie e tempo de desenvolvimento (Vojtech et al., 2005; Romeis et al., 2006). Um estudo com milho *Bt* mostrou que plantas transgênicas podem ter um efeito negativo nos parâmetros da história de vida do parasitoide *Tetrastichus howardi* Olliff (Hymenoptera: Eulophidae), mediado através das pupas do herbívoro *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Crambidae) (Prutz et al., 2004). O uso do *Bacillus thuringiensis* aplicado em campo em mudas de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) não afetou as taxas de parasitismo em *Plutella xylostella*, porém houve uma redução da diversidade de seus parasitoides, independentemente dos regimes de aplicação (Bopape et al., 2014). O presente trabalho teve como objetivo determinar a toxicidade de *Bt* para larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) de terceiro instar suscetíveis e os efeitos colaterais de *Bt* sobre os parasitoides de pupas *Palmistichus elaeisis* (Delvare e LaSalle) e *Tetrastichus howardi* (Olliff) (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes à *Bt*.

2. BIBLIOGRAFIA

- AGROFIT, 2019. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. Acessado em: 14 de Junho de 2019. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- BARANEK, J., KONECKA, E., KAZNOWSKI, A. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *BioControl*, v. 62, n. 5, p. 649–658. 2017.
- BARRAT, B.I.P., HOWARTH, F.G., WITHERS, T.M., KEAN, J.M., RIDLEY, G.S. Progress in risk assessment for classical biological control. *Biological Control*, v. 52, n.3, p. 245–254. 2010.
- BARROS, E.M., TORRES, J.B., BUENO, A.F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Pest Management*, v. 39, n. 6, p. 996–1001. 2010.
- BOPAPE, M.J., NOFEMELA, R.S., MOSIANE, M.S., MODISE, D.M. Effects of a selective and a broad-spectrum insecticide on parasitism rates of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and species richness of its primary parasitoids. *African Entomology*, v. 22, n. 1, p. 115–126. 2014.
- BRUNNER, J.F. Integrated pest management in tree fruit crops. *Food Reviews International*, v. 10, n. 2, p. 135–157. 1994.
- BUENO, R.C.O.F., BUENO, A.F., MOSCARDI, F., PARRA, J.R., HOFFMANN-CAMPO, C.B. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Management Science*, v. 67, p. 170–174. 2011. <https://doi.org/10.1002/ps.2047>
- CASMUZ, A., JUÁREZ, M.L., SOCÍAS, M.G., MURÚA, M.G., PRIETO, S., MEDINA, S., WILLINK, E., GASTAMINZA, G. Revisión de los hospedeiros del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, v. 69, n. 3/4, p. 209–231. 2010.
- FAVERO, K., PEREIRA, F.F., KASSAB, S.O., OLIVEIRA, H.N., COSTA, D.P., ZANUNCIO, J.C. Biological characteristics of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) are influenced by the number of females exposed per pupa of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Florida Entomologist*, v. 96, n. 2, p. 583–589. 2013.
- HARDKE, J.T., LORENZ, G.M., LEONARD, B.R. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) ecology in south-eastern cotton. *Journal of Integrated Pest Management*, v. 6, n. 1, p. 10. 2015.
- HOBALLAH, M.E., DEGEN, T., BERGVINSON, D., SAVIDAN, A., TAMÒ, C., TURLINGS, T.C.J. Occurrence and direct control potential of parasitoids and

- predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical lowlands of Mexico. *Agricultural and Forest Entomology*, v. 6, n. 1, p. 83–88. 2004.
- KENIS, M., DU PLESSIS, H., VAN DEN BERG, J., BA, M.N., GOERGEN, G., KWADJO, K.E., BAOUA, I., TEFERA, T., BUDDIE, A., CAFÀ, G., OFFORD, L., RWOMUSHANA, I., POLASZEK, A. *Telenomus remus*, a candidate parasitoid for the biological control of *Spodoptera frugiperda* in Africa, is already present on the continent. *Insects*, v. 10, n. 4, p. 92. 2019.
- MOLINA-OCHOA, J., CARPENTER, J.E., HEINRICHS, E.A., FOSTER, J.E. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean basin: an inventory. *Florida Entomologist*, v. 86, n. 3, p. 254–289. 2003.
- MONTEZANO, D.G., SPECHT, A., SOSA-GÓMEZ, D.R., ROQUE-SPECHT, V.F., SOUSA-SILVA, J.C., PAULA-MORAES, S.V., PETERSON, J.A., HUNT, T.E. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, v. 26, n. 2, p. 286–300. 2018.
- MOURA, A.P., MOURA, D.C.M. Levantamento e flutuação populacional de parasitoides de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) de ocorrência em goiabeira (*Psidium guajava* L.) em Fortaleza, Ceará. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 2, p. 225–231. 2011.
- NAVA, D.E., SILVA, E.S., GUIMARÃES, J.A., DIEZ-RODRÍGUEZ, G.I., GARCIA, M.S., BATISTA FILHO, A., LEITE, L.G., RAGA, A., SATO, M.E. Controle biológico de pragas de frutíferas. In: Pinto, A.S., Nava, D.E., Rossi, M.M., Malerbo-Souza, D.T. (Eds.). *Controle Biológico na Prática*. ESALQ/USP, Piracicaba, 2006, 113–129 p.
- PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, v. 6, n. 12, p. 3296–3325. 2014.
- PRATISSOLI, D., ZANUNCIO, J.C., VIANNA, U.R., ANDRADE, J.S.; PINON, T.B.M. Biological characteristics of *Trichogramma pretiosum* and *Trichogramma acacioi* (Hym: Trichogrammatidae), parasitoids of the avocado defoliator *Nipteria panacea* (Lep.: Geometridae), on eggs of *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, n. 1, p. 7–13. 2005.
- PRUTZ, G., BRINK, A., DETTNER, K. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: effects of *Bacillus thuringiensis*-corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. *Naturwissenschaften*, v. 91, n. 9, p. 451–454. 2004.
- RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, v. 29, n. 9, p. 913–920. 2010.
- RODRÍGUES-DEL-BOSQUE, L.A., ROSALES-ROBLES, E., REYS-ROSAS, A. Unusual damage to maize shanks and cobs by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Northeastern Mexico. *Southwestern Entomologist*, v. 36, n. 3, p. 377–378. 2011.

- ROMEIS, J., MEISSLE, M., BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 1, p. 63–71. 2006.
- ROSAS-GARCIA, N.M. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 28–36. 2009.
- SANAHUJA, G., BANAKAR, R., TWYMAN, R.M., CAPELL, T., CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, v. 9, n. 3, p. 283–300. 2011.
- SANTOS-AMAYA, O.F., RODRIGUES, J.V.C., SOUZA, T.C., TAVARES, C.S., CAMPOS, S.O., GUEDES, R.N.C., PEREIRA, E.J.G. Resistance to dual-gene *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports* 5: 18243. 2015.
- SPARKS, T.C. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 107, n. 1, p. 8–17. 2013.
- TOSCANO, L.C., CALADO FILHO, G.C., CARDOSO, A.M., MARUYAMA, W.I., TOMQUELSKI, G.V. Impacto de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho safrinha cultivado em Cassilândia e Chapadão do sul, MS. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 79, n. 2, p. 223–231. 2012.
- VACHON, V., LAPRADE, R., SCHWARTZ, J.L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal Crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 111, n. 1, p. 1–12. 2012.
- VOJTECH, E., MEISSLE, M., POPPY, G. Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Transgenic Research*, v. 14, n. 2, p. 133–144. 2005.
- YANG, F., KERNS, D.L., BROWN, S., HEAD, G.P., HUANG, F. Pollen contamination in seed mixture increases the dominance of resistance to *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, v. 73, n. 11, p. 2379–2385. 2017.
- ZANUNCIO, J.C., SILVA, C.A.D., LIMA, E.R., PEREIRA, F.F., RAMALHO, F.S., SERRÃO, J.E. Predation rate of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with and without defense by *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, n. 1, p. 121–125. 2008.
- ZULETA-CASTRO, C., RIOS, D., HOYOS, R., OROZCO-SÁNCHEZ, F. First formulation of a botanical active substance extracted from neem cell culture for controlling the armyworm. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 37, n. 5, p. 40. 2017.

CAPÍTULO 1

*Submetido à revista: Ecotoxicology and Environmental Safety

Efeitos colaterais causados por *Bacillus thuringiensis* ao parasitoide *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae)

Resumo: O endoparasitoide *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) é utilizado no controle de lepidópteros desfolhadores. Inseticidas podem reduzir a manutenção de inimigos naturais em campo, mas produtos biológicos, como o *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*), representam uma alternativa ecológica para o manejo de insetos-praga e interações *Bt*-inimigos naturais devem ser estudadas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos sub-letais causados pelo *Bt* na geração parental (F₁) e prole (F₂) de *P. elaeisis* parasitando *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) suscetível e resistente. A toxicidade do *Bt* foi avaliada em lagartas suscetíveis de terceiro instar de *S. frugiperda*. Essas lagartas foram expostas a concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) do *Bt* e parasitadas por *P. elaeisis*. A longevidade, produção de imaturos, resposta comportamental e reprodução desse parasitoide foram avaliadas. O *Bt* reduziu a produção de imaturos e exibiu atividade repelente sobre *P. elaeisis*. A sobrevivência desse parasitoide, parasitando pupas oriundas de lagartas que ingeriram o *Bt* foi menor nas F₁ e F₂ para ambos os sexos. O desempenho de *P. elaeisis* foi menor em pupas suscetíveis ou resistentes (expostas ao *Bt*) de *S. frugiperda*. O bioinseticida reduz o comportamento de busca e parâmetros reprodutivos de *P. elaeisis* emergidos de pupas de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes ao *Bt* reduz compatibilidade entre o *Bt* e o parasitoide.

Palavras-chave: Compatibilidade com inseticidas, desempenho reprodutivo, parasitoides, performance de parasitismo, resposta comportamental, sobrevivência

1. Introdução

Palmistichus elaeisis Delvare e LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário que se desenvolve em pupas de coleópteros e lepidópteros (Zanuncio et al., 2008; Barbosa et al., 2016). Fêmeas de *P. elaeisis* depositam seus ovos em pupas e suas larvas se alimentam dos órgãos internos do hospedeiro (Soares et al., 2009). Esse parasitoide é nativo da região Neotropical e tem hábito polífago, sendo relatado em lepidópteros de importância econômica como *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Noctuidae) (Pereira et al.,

2013), *Diaphania hyalinata* Linnaeus (Crambidae) (Pratissoli et al., 2007), *Psorocampa denticulata* Schaus (Notodontidae) (Zanuncio et al., 2015), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Noctuidae) (Bittencourt & Berti-Filho, 1999), e *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Geometridae) (Barbosa et al., 2016), caracterizando-se como potencial agente de controle biológico.

O uso de inimigos naturais em programas de manejo integrado de pragas (MIP) necessita da compatibilidade com outros métodos de controle (Zanuncio et al., 2016; Alcántara-de La Cruz et al., 2017; Martínez et al., 2018a). O controle químico é o método mais comumente usado para controlar insetos-praga e a seletividade e impacto de inseticidas em inimigos naturais favorece o MIP em várias culturas (Desneux et al., 2007). Entretanto, efeitos colaterais à saúde humana, organismos não alvos e ao meio ambiente indicam a necessidade de se reduzir o uso de inseticidas (Desneux et al., 2007; Nicholson, 2007; Pedlowski et al., 2012). Nos parasitoides, a exposição a inseticidas pode causar efeito letal ou fisiológico afetando o desenvolvimento, longevidade e fecundidade, além de alterar a taxa do parasitismo (Alcántara-de La Cruz et al., 2017), por tanto, a utilização dos inseticidas devem ser compatíveis com agentes de controle biológico (Zanuncio et al., 2016; Alcántara-de La Cruz et al., 2017; Martínez et al., 2018a).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria gram-positiva, em forma de bastonete, que durante a esporulação produz proteínas de inclusão intracelular cristalina (Cry) tóxica para insetos (Bravo et al., 2011). Os cristais são dissolvidos e as protoxinas ativadas por proteases formam poros na membrana do intestino médio, provocando septicemia e morte do inseto (Oestergaard et al., 2007; Bravo et al., 2007). Variedades específicas do *Bt* para grupos de insetos-alvos têm menores efeitos tóxicos a vertebrados e impacto ambiental (Bravo et al., 2011). Neste contexto, o corpos parasporais de *Bt*, var. *kurstaki* estão entre os mais utilizados no manejo de lepidópteros (Sanahuja et al., 2011). Existe variedade de estirpes e toxinas *Bt* usada para a produção de bioinseticidas e o desenvolvimento de plantas transgênicas (Romeis et al., 2006).

Plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas Cry revolucionou o MIP em diferentes culturas (Sanahuja et al., 2011; Flagel et al., 2018). A exposição contínua de insetos a plantas transgênicas pode favorecer surtos de pragas resistentes (Baranek et al., 2017), mas a expressão de duas ou mais toxinas *Bt* ativas, pode retardar este processo (Santos-Amaya et al., 2015). Uma alternativa promissora é a utilização conjunta de parasitoides e *Bt* no controle biológico aplicado, por ter baixos custos, eficiência e menor risco para o ambiente

(Barrat et al., 2010). Embora, os impactos causados pelo *Bt* à parasitoides nos parâmetros reprodutivos, tamanho da progênie e tempo de desenvolvimento (Vojtech et al., 2005; Romeis et al., 2006) ainda são desconhecidos.

O objetivo de este estudo foi avaliar os efeitos colaterais em *P. elaeisis* parasitando pupas de *S. frugiperda*, suscetíveis e resistentes ao *Bt* e expostas a esse bioinseticida.

2. Material e Métodos

2.1 Insetos

Indivíduos de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), *P. elaeisis*, e *S. frugiperda* suscetível a *Bt* foram obtidos de criações mantidas no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). Indivíduos de *T. molitor* foram mantidos em caixas plásticas (60 × 40 × 12 cm) com temperatura de 25 ± 1°C, 70 ± 10% UR e fotoperíodo de 12:12 h [L:D]. Larvas e adultos foram alimentados *ad libitum* com farelo de trigo (12% de proteína, 2% de lipídios, 75% de carboidratos e 11% de mineral/açúcar), pedaços de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Linnaeus) e chuchu (*Sechium edule* Swartz) até a pupação.

Na criação massal do parasitoide, pupas de *T. molitor* foram colocadas em tubos de vidro fechados com tela “voile” contendo adultos de *P. elaeisis* previamente copulados por 24 h. Após a parasitização das pupas, adultos emergidos de *P. elaeisis* (24 h de idade) foram alimentados com mel puro e mantidos em tubos de vidro (14 × 2,2 cm) em sala aclimatada (25 ± 2°C, 70 ± 10% UR e fotoperíodo de 12:12 h [L:D]).

Lagartas de *S. frugiperda*, suscetíveis ou resistentes, foram criadas separadamente, em potes de polietileno (15 × 9 cm), alimentadas com dieta artificial constituída por 6,2 g de ágar, 15,2 g de levedura de cerveja, 23,7 g de gérmen de trigo, 50 g de feijão, 15,3 g de ácido ascórbico, 0,5 g de ácido sórbico, 1 g de nipagim e 1,2 mL de solução de inibidora (41,8% de ácido propionico e 4,2% de ácido fosfórico), em sala a 25 ± 2 °C, 75 ± 5% de umidade relativa e fotofase de 12 horas. *Spodoptera frugiperda*, resistente ao *Bt*, foi coletada em milho (30F35H DuPont Pioneer®, Santa Cruz do Sul, Brasil) expressando proteínas Cry1F.

2.2 Teste de concentração-mortalidade

Bacillus thuringiensis (*Bt*), variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 (Dipel®, Abbot Laboratories Chemical e Agricultural Products Division, North Chicago, IL, USA) foi diluído em 1L de água destilada produzindo uma solução estoque, ajustando 100 g L⁻¹ e obtendo as concentrações necessárias. Seis concentrações de *Bt* foram preparadas e usadas para avaliar a

toxicidade do bioinseticida e determinar os pontos toxicológicos relevantes, diluições em serie de concentrações (1,562, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 mg mL⁻¹) foram usadas para determinar relação concentração-mortalidade e concentração letal (CL). Água destilada foi usada como controle. Cada solução (2 µL) foi aplicada sob 1 g de dieta artificial. Três replicas de trinta lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda* suscetíveis foram individualizadas por placa de Petri (90 × 1,5 mm) e utilizadas por cada concentração. O número de lagartas mortas foi contabilizado após exposição ao *Bt* por 8 dias.

2.3 Teste de tempo-mortalidade

Lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda* suscetíveis foram individualizadas por placa de Petri e expostas às quatro concentrações de *Bt* (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀) determinadas pelo teste de concentração-mortalidade, além do controle com água destilada. Os procedimentos de exposição e condições foram feitos como descrito acima para o teste de concentração-mortalidade. O número de insetos que sobreviveram foi registrado a cada 12 h por 8 dias. Quatro réplicas de 30 insetos foram usadas para cada concentração de inseticida seguindo um delineamento inteiramente casualizado.

2.4 Produção de imaturos de *P. elaeisis*

Lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*, suscetíveis ou resistentes, foram tratadas com *Bt* usando a CL₅₀ e CL₉₀ estimada além de um controle com água destilada. A seguir, pupas (suscetíveis e resistentes) tratadas foram expostas ao parasitismo e imaturos (larvas e pupas) de *P. elaeisis* foram obtidos. Cada tratamento teve três repetições com 10 pupas de 24 h em delineamento inteiramente casualizado. As pupas parasitadas por *P. elaeisis* foram individualizadas em frascos de vidro (2,5 cm × 8 cm) e radiografadas usando um sistema de radiografia de espécimes MX-20 equipado com uma câmera digital de 14 bits (Faxitron X-Ray Corp., Wheeling, IL, EUA). A localização de cada parasitoide dentro da pupa de *S. frugiperda* foi gravada digitalmente durante todo o desenvolvimento dos imaturos em 5, 10, 15 e 20 dias após parasitação. O número de larvas e pupas de *P. elaeisis* vivas por pupa foi registrado.

2.5 Resposta comportamental

Adultos de *P. elaeisis* foram colocados em uma placa de Petri (90 × 15 mm) com disco de papel de filtro (9 cm em diâmetro com porosidade de 3 µm, 0,5% de teor de cinzas, e densidade de 80 g/m²) (Nalgon Equip. Científicos, Itupeva, SP, Brasil) fixado no fundo da

placa de Petri com cola sintética. Bioensaios de resposta comportamental foram realizados em arenas em que metade foi tratada com 1 mL de *Bt* dissolvido em água destilada (LC₅₀ ou LC₉₀); a outra metade tratada apenas com água destilada foi utilizada como controle. Um adulto de *P. elaeisis* foi liberado no centro da placa de Petri (no papel filtro) e mantido por 10 min. Vinte insetos foram utilizados para cada concentração letal, em um delineamento inteiramente casualizado. Cada inseto com atividade locomotora dentro da placa de Petri foi gravado usando uma filmadora digital (XL1 3CCD NTSC, Canon, Lake Success, NY, EUA) equipado com Lente de vídeo 16× (ZoomXL 5.5-88 mm, Canon). O sistema de rastreamento de vídeo (ViewPoint LifeSciences, Montreal, Quebec, Canadá) foi usado para analisar os vídeos e medir nos insetos a distância percorrida e o tempo de parada em cada metade da placa de Petri. Insetos que gastaram <1 s na metade tratada com inseticida da arena foram considerados repelidos, enquanto aqueles que gastaram <50% do tempo na superfície tratada com *Bt* foram considerados irritados (Fiaz et al., 2018; Plata-Rueda et al. 2019a).

2.6 Sobrevivência do parasitoide em F₁ e F₂

Vinte e cinco pupas de *S. frugiperda* suscetíveis ou resistentes com 24 h de idade tratadas com a CL₅₀ e CL₉₀ estimada do *Bt* foram expostas, individualmente, por 96 h ao parasitismo por dois casais de *P. elaeisis* com 72 h de idade em tubo de vidro (14 × 2,2 cm) tampado com algodão, alimentados com mel e mantidos em ambiente com temperatura de 25 ± 2°C e fotofase de 12 h. Após o parasitismo, as pupas foram mantidas nos tubos vidro até a emergência dos parasitoides. O número de parasitoides adultos que sobreviveram, separados por sexo, foi contabilizado diariamente. As avaliações foram realizadas por duas gerações.

2.7 Desempenho reprodutivo do parasitoide

Uma pupa de *S. frugiperda* suscetível ou resistente tratada com a CL₅₀ e CL₉₀ estimada do *Bt* foram expostas por 96 h ao parasitismo por dois casais de *P. elaeisis* com 72 h de idade em tubo de vidro (14 × 2,2 cm) com uma gota de mel, tampado com algodão, em ambiente com temperatura de 25 ± 2 °C e fotofase de 14 horas. Quinze repetições foram utilizadas por pupa (susceptível ou resistente) e os tubos mantidos nessas condições até a emergência do parasitoide ou do hospedeiro. O número de parasitoides emergido, tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) e razão sexual (número de fêmeas/machos + fêmeas) foi determinado por duas gerações (F₁ e F₂).

2.8 Análise estatística

Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise probit, gerando uma curva concentração-mortalidade (Finney, 1964). Os dados de tempo-mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência usando o estimador Kaplan-Meier (log-rank test) através do software Origin Pro v. 9.1. (OriginLab Corporation, 2013). Dados dos parasitoides que sobreviveram até o final do experimento foram tratados como censurados. A produção de parasitoides e os dados de resposta comportamental foram analisados por análise unidirecional de variância (ANOVA) e teste de diferença honesta significativa de Tukey (HSD) também foi utilizado para comparação de médias no nível de significância de 5%. Dados de produção larval e resposta comportamental foram transformados para satisfazer suposições de normalidade e homocedasticidade. Dados do número de parasitoides emergidos, tempo de desenvolvimento e razão sexual foram comparados pelo teste t de Student em nível de significância de 5%. Toxicidade, produção de larvas, resposta comportamental e os dados de parasitoides emergidos, tempo de desenvolvimento e razão sexual foram analisados usando o SAS para Windows v. 9.0. (SAS Institute, 2002).

3. Resultados

3.1 Concentração e tempo-mortalidade de lagartas suscetíveis ao *Bt*

O modelo de concentração–mortalidade utilizado foi adequado ($P > 0,05$), confirmando a toxicidade do *Bt* para *S. frugiperda* e permitindo as estimativas dos parâmetros toxicológicos desejados para uso posterior (Tabela 1). A mortalidade no grupo controle foi menor que 1%.

Análise de sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* suscetíveis expostas ao *Bt* mostraram diferenças significativas entre as concentrações letais (teste log-rank: $\chi^2 = 20,39$, g.l= 4, $P < 0,001$) (Figura 1). Após 200 h de exposição, a sobrevivência foi de 100% para lagartas não expostas ao *Bt* diminuindo para 70%, 6,25%, 0% e 0% com a CL_{25} , CL_{50} , CL_{75} e CL_{90} , respectivamente.

Tabela 1. Concentrações letais de *Bacillus thuringiensis* contra lagartas suscetíveis de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) obtida a partir da análise probit (df = 5, slope \pm SE = 8,175 \pm 1,09, intercepto = 5,506).

Concentração letal	Concentração estimada (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança 95%	χ^2 (P value)
CL ₂₅	5,67	5,22 – 5,99	0,87 (0,97)
CL ₅₀	6,39	6,10 – 6,68	
CL ₇₅	7,12	6,83 – 7,53	
CL ₉₀	7,84	7,45 – 8,48	

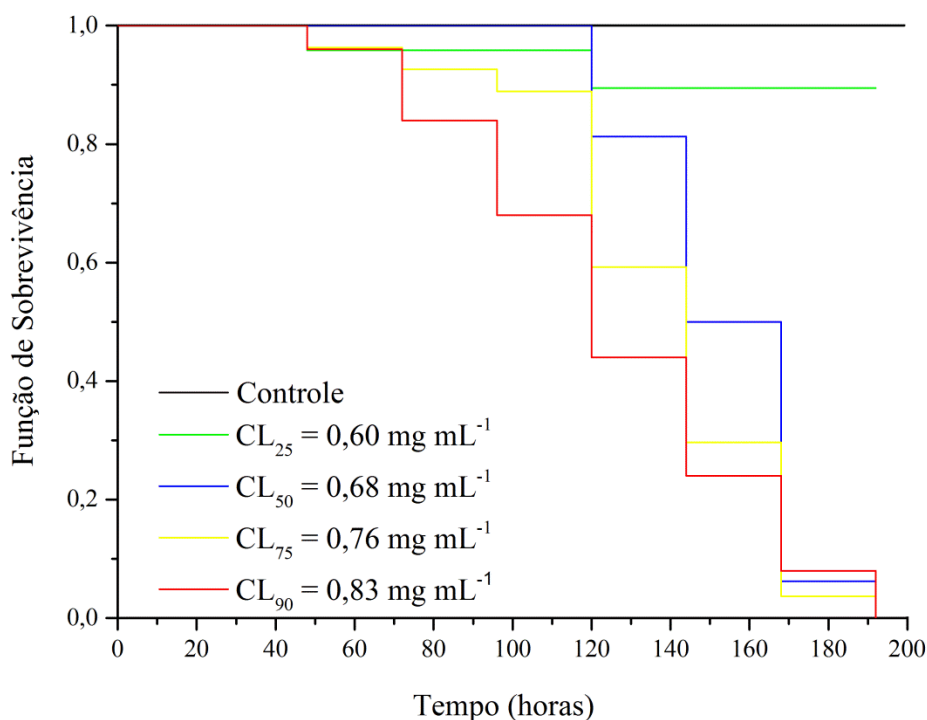


Figura 1: Sobrevivência de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), suscetíveis, até 200 h após o tratamento com diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis* utilizando o método Kaplan-Meier e comparado usando o teste Log-rank ($X^2 = 45,90$; $P < 0,001$).

3.2 Produção de imaturos de *Palmistichus elaeisis*

Larvas de *P. elaeisis* em pupa suscetível de *S. frugiperda* exposta ao *Bt* não foram observadas aos 5 e 20 dias após o parasitismo (Figura 2; Tabela 2). O número de larvas de *P. elaeisis* não diferiu, em 10 dias ($F_{2,11} = 3,17$; $P = 0,096$), entre os tratamentos e o controle, porém foi diferente na CL₅₀ após 15 dias de parasitismo ($F_{2,11} = 3,28$; $P < 0,009$). Pupas de *P.*

elaeisis não foram observadas após 5 e 10 dias do parasitismo em pupa suscetível de *S. frugiperda*. O número de pupas de *P. elaeisis* não diferiu entre os tratamentos e o controle, com 15 dias ($F_{2,11} = 1,94$; $P = 0,221$) e 20 dias ($F_{2,11} = 0,64$; $P = 0,676$).

Larvas de *P. elaeisis* em pupa resistente de *S. frugiperda* não foram observadas aos 5 e 20 dias após o parasitismo (Figura 2; Tabela 2). A produção de larvas de *P. elaeisis* não diferiu entre os tratamentos e o controle em 10 dias após parasitismo ($F_{2,11} = 1,33$; $P = 0,365$), no entanto, a exposição de pupas de *S. frugiperda* ao *Bt* (CL₅₀ e CL₉₀) diferiu o número de larvas 15 dias após o parasitismo ($F_{2,11} = 4,12$; $P < 0,005$). Pupas de *P. elaeisis* não foram observadas após 5 e 10 dias do parasitismo. O número de pupas de *P. elaeisis* diferiu nos tratamentos (CL₅₀ e CL₉₀) após 15 dias do parasitismo ($F_{2,11} = 6,98$; $P < 0,017$) (Tabela 2).

Tabela 2. Larvas e pupas de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) encontradas em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) suscetível ou resistente ao *Bacillus thuringiensis* (controle, valores estimados de CL₅₀ e CL₉₀) por 10, 15 e 20 dias. Os tratamentos (média ± erro padrão da média) diferem em $P < 0,05$ (teste de separação média de Tukey)

Tempo (dias)	Suscetível					
	Larva			Pupa		
	Controle	CL ₅₀	CL ₉₀	Controle	CL ₅₀	CL ₉₀
5	–	–	–	–	–	–
10	112±7.7ab	132±5.9a	115±6.6b	–	–	–
15	79.0±4.2a	34.0±13.2b	41.5±13.8ab	34.2±3.3a	31.2±3.7a	17.5±2.9a
20	–	–	–	127±24.3a	98.2±25.7a	101±11.8a
Tempo (dias)	Resistente					
	Larva			Pupa		
	Controle	CL ₅₀	CL ₉₀	Controle	CL ₅₀	CL ₉₀
5	–	–	–	–	–	–
10	119 ± 9.6a	149 ± 26.6a	149 ± 3.5a	–	–	–
15	24.2 ± 4.3a	12.5 ± 0.29b	13.5 ± 4.5b	108 ± 6.9a	115 ± 4.6b	157 ± 4.0b
20	–	–	–	121 ± 6.1b	152 ± 11,2ab	163 ± 7.9a

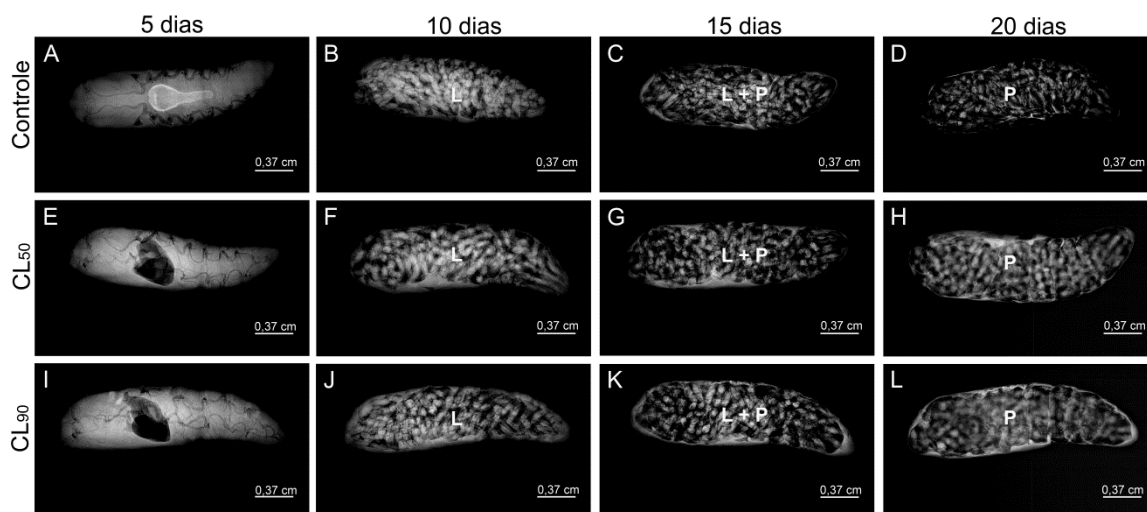


Figura 2. Sequência temporal de imagens de raios-X mostrando o desenvolvimento de *Palmistichus elaeisis* em pupas de *Spodoptera frugiperda* resistente ou suscetível ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀). Larvas e pupas foram indicadas (L ou P, respectivamente).

3.3 Resposta comportamental

Pistas de caminhada representativas para *P. elaeisis* liberados em arenas semi-tratadas foram mostradas (Figura 3). A distância percorrida foi maior no controle ($323,9 \pm 46,6$ cm) que nas CL₅₀ ($182,3 \pm 16,4$ cm) e CL₉₀ ($142,7 \pm 20,7$ cm) ($F_{2,41} = 2,06$; $P < 0,051$) (Figura 4a). O tempo de parada não diferiu no controle ($255,4 \pm 25,3$ s) e em arenas semi-tratadas a CL₅₀ ($245,6 \pm 24,5$ s) e CL₉₀ ($220,7 \pm 18,3$ s) ($F_{2,41} = 0,91$; $P = 0,563$) (Figura 4b).

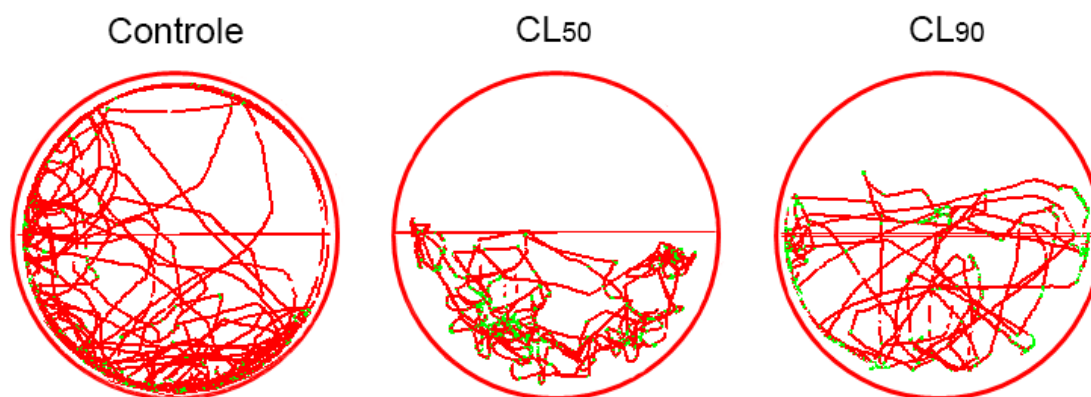


Figura 3. Atividade locomotora de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) durante 10 minutos em arenas de papel filtro (9 cm de diâmetro) meio impregnadas com *Bacillus thuringiensis* (metade superior de cada arena). Faixas vermelhas indicam alta velocidade de caminhada; faixas verdes baixa velocidade (inicial).

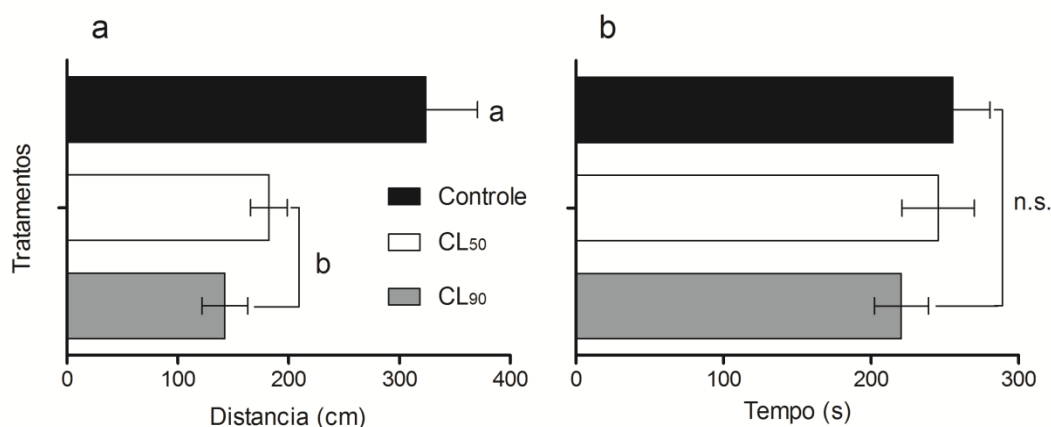


Figura 4. Distância de caminhada (a) e tempo de parada (b) (média \pm erro padrão da média) de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) submetido ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀) por 10 min. Tratamentos (médias \pm desvio padrão) diferem em $P < 0,05$ (teste médio de separação de Tukey).

3.4 Sobrevivência dos adultos de *Palmistichus elaeisis*

A sobrevivência de adultos de *P. elaeisis* submetidos a pupas de *S. frugiperda* suscetível e resistente reduziu quando exposto ao *Bt*, principalmente na segunda geração, comparado ao controle (Figura 5). Em pupas suscetíveis, a sobrevivência teve uma redução quando submetidas a CL₅₀ de 12,2 dias para fêmeas (teste log-rank: $\chi^2 = 380,39$, g.l. = 4, $P < 0,001$) e 12,4 dias para os machos (teste log-rank: $\chi^2 = 148,47$, g.l. = 4, $P < 0,001$). Em pupas de *S. frugiperda* resistente expostas a CL₅₀ a redução foi de 18,4 dias para fêmeas (teste log-rank: $\chi^2 = 673,64$, g.l. = 4, $P = 0,001$) e 19,2 dias para machos (teste log-rank: $\chi^2 = 157,46$, g.l. = 4, $P = 0,001$).

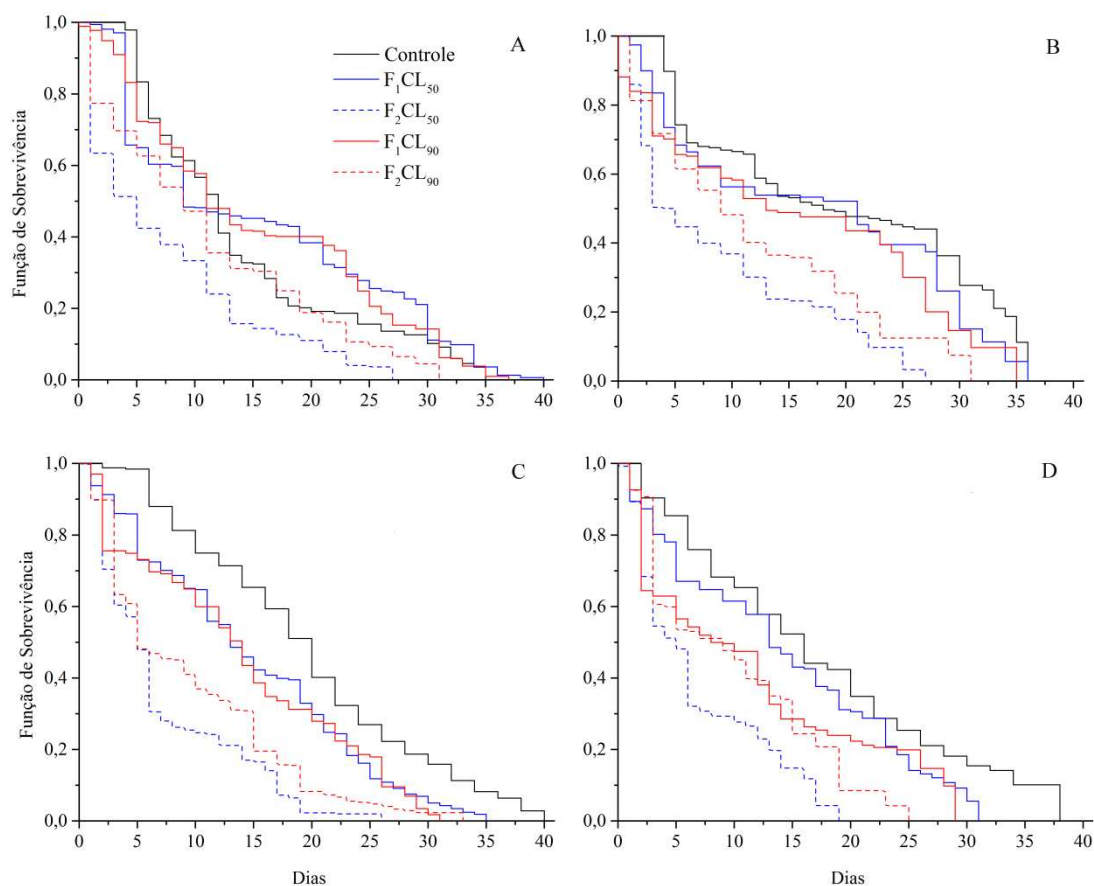


Figura 5. Sobrevivência de *Palmistichus elaeisis* em pupas de *Spodoptera frugiperda* suscetível e resistente ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀). a) Fêmeas × pupa suscetível. b) Machos × pupa suscetível. c) Fêmeas × pupa resistente. d) Machos × pupa resistente.

3.5 Desempenho reprodutivo de *Palmistichus elaeisis*

O período de desenvolvimento de *P. elaeisis* (ovo – adulto) reduziu entre a primeira e segunda geração de pupas *S. frugiperda* suscetível e resistente. Em pupas de suscetível, o desenvolvimento diferiu entre as gerações quando submetidas a CL₅₀ ($t = 1,36$; $g.l = 5$, $P < 0,115$). Nas pupas de *S. frugiperda* resistente, o desenvolvimento ovo-adulto reduziu entre as gerações quando expostas a CL₅₀ ($t = 13,0$; $g.l = 5$, $P < 0,0001$) e CL₉₀ ($t = 3,50$; $g.l = 5$, $P < 0,009$) (Figura 6a).

O número de adultos do parasitoide, emergidos de pupas de *S. frugiperda* suscetível ($t = 1,04$; $g.l = 5$, $P = 0,173$) e resistente ($t = 0,89$; $g.l = 5$, $P = 0,206$) expostas a CL₅₀ do *Bt* não diferiu entre as gerações. No entanto, quando expostos a CL₉₀ teve uma redução no número de adultos de parasitoides emergidos de pupas suscetíveis ($t = 5,59$; $g.l = 5$, $P < 0,001$) e resistentes ($t = 2,24$; $g.l = 5$, $P < 0,037$) na segunda geração (Figura 6b).

A razão sexual de *P. elaeisis* em pupas de *S. frugiperda* suscetível ($t= 7,450$; $g.l = 5$, $P < 0,001$) e resistente ($t= 4,98$; $g.l = 5$, $P < 0,004$) reduziu entre as gerações quando submetidas a CL₅₀ do *Bt*. Nas pupas de *S. frugiperda* submetidas a CL₉₀, não houve diferença entre as gerações em resistente ($t= 0,54$; $g.l = 5$, $P = 0,612$), na suscetível diferiu entre as gerações ($t= 11,34$; $g.l = 5$, $P < 0,0001$) (Figura 6c).

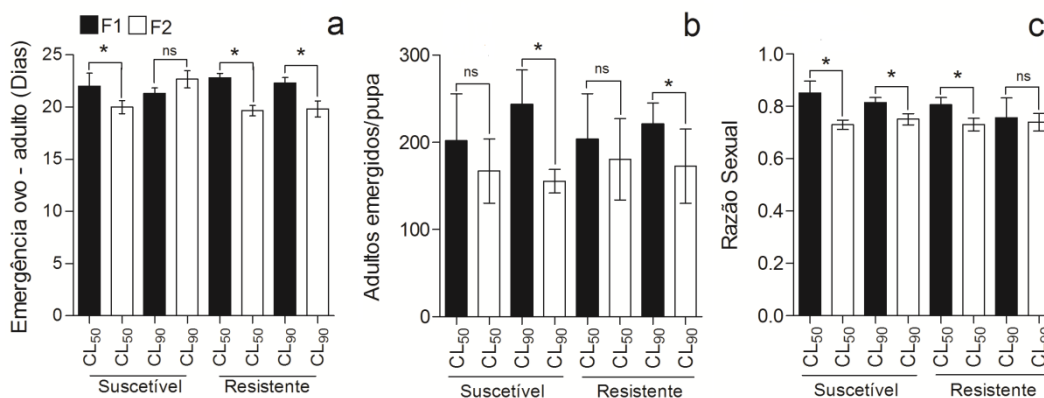


Figura 6. Desempenho reprodutivo de *Palmistichus elaeisis* em pupas de *Spodoptera frugiperda* suscetível e resistente ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀). a) Período de desenvolvimento (ovo – adulto). b) Número de adultos. c) Razão Sexual (número de fêmeas / total de adultos).

4. Discussão

Os efeitos do *Bacillus thuringiensis* no parasitoide, *P. elaeisis*, foram demonstrados a partir de bioensaios nas condições de laboratório. *Bt* foi tóxico para lagartas de *S. frugiperda* causando elevada mortalidade, conforme relatado para outras espécies Lepidoptera como *Tuta absoluta* Meyrick (Gelechiidae) (Gonzalez-Cabrera et al., 2011), *Helicoverpa armigera* Hübner (Noctuidae) (Regode et al., 2016), *Plutella xylostella* Linnaeus (Plutellidae) (Stemele, 2016) e *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae) (Vineela et al., 2017). *Bt* segrega uma matriz de proteínas inseticidas, como a Cry, importante para o controle de lepidópteros (Oestergaard et al., 2007; Bravo et al., 2011). Após ingestão da bactéria, os cristais da toxina são solubilizados na solução alcalina do intestino médio de lagartas e suas protoxinas ativadas por proteases intestinais, formando poros na membrana plasmática, lise celular e morte do inseto (Bravo et al., 2007; Tabashnik et al., 2015). Portanto, *Bt* é tóxico a lagartas de *S. frugiperda* via ingestão em diferentes concentrações.

Períodos prolongados de exposição ao *Bt* foram necessários para induzir mortalidade em *S. frugiperda*. A baixa sobrevivência de *S. frugiperda* suscetível mostra a ação lenta do

bioinseticida via ingestão (Gómez et al., 2014). Uma menor probabilidade na sobrevivência de *S. frugiperda* suscetível também ocorre quando a lagarta é exposta a plantas transgênicas, como algodão *Bt* (Armstrong et al., 2011) e milho *Bt* contendo a proteína Vip3Aa20 (Burtet et al., 2017) sugerindo a alta suscetibilidade desse inseto as toxinas de *Bt* durante a exposição prolongada.

O número de larvas e pupas do parasitoide por pupa susceptível e resistente de *S. frugiperda* variou com o aumento das concentrações de *Bt*. Os resultados mostram que o número larvas vivas do parasitoide declinaram em pupas de *S. frugiperda* suscetíveis sob exposição ao *Bt*, 15 dias após do parasitismo como relatado para imaturos de *Trichogramma bourarachae* Pintureau e Babault (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Ksentini et al., 2010) e *Diadegma insulare* Cresson (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Ebrahimi et al., 2012). Nesse contexto, a ação inseticida do *Bt* afeta a taxa de crescimento populacional intrínseca, longevidade, sobrevivência de diferentes estágios de insetos e reprodução (Liu et al., 2005; Mohan et al., 2008) podendo inviabilizar larvas e comprometer a prole de *P. elaeisis*.

O ensaio de resposta comportamental indicou que o *Bt* causou mudanças nos padrões de caminhada de *P. elaeisis*. Os padrões de caminhada podem variar quando os insetos são expostos a compostos tóxicos, devido a prejuízos no seu sistema nervoso, causando uma estimulação ou redução na mobilidade (Martínez et al. 2018b; Plata-Rueda et al., 2018). A menor distância percorrida pelo *P. elaeisis*, indica uma resposta comportamental de repelência devido à exposição de *Bt* e pode limitar taxa de parasitismo no campo (Chichera et al., 2012; Dias-Pini et al., 2014). A repelência do *Bt* observada em *P. elaeisis* é semelhante ao relatado para *Coptotermes formosanus* (Blattodea: Rhinotermitidae) (Wright & Cornelius, 2012). O parasitoide evita a área tratadas com *Bt*, como relatado para *Tranosema rostrale* Brishke (Hymenoptera: Ichneumonidae) em teste de escolha (Schoenmaker et al., 2001). Estudos mostram que inseticidas biológicos e químicos podem prejudicar os insetos durante no reconhecimento do substrato ou alimento (Plata-Rueda et al., 2019b). No caso dos parasitoides, isto pode influenciar na orientação olfatória e na caminhada para reconhecimento do hospedeiro (Erb et al., 2001). Os resultados indicam que o *Bt* causa repelencia em *P. elaeisis* exibindo comportamento alterado ao contato com superfícies contaminadas com o bioinseticida.

A redução na sobrevivência de *P. elaeisis* obtidos de pupas de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes (expostas ao *Bt*) ao longo das gerações pode ser devido a redução na qualidade (Hilbeck, 2001) e à morte prematura do hospedeiro (Mohan et al., 2008). Impactos

do *Bt* em parasitoides (Chilcutt & Tabashnik, 1999) após a ingestão da toxina na dieta artificial (Salama et al., 1996), e em plantas transgênicas (Bernal et al., 2002; Baur & Boethel, 2003) foram relatados. Efeitos negativos do *Bt* sobre parasitoides de insetos-praga na taxa de sobrevivência (Blumberg et al., 1997), com menores taxas de emergência (Atwood et al., 1997), aumento do tempo de desenvolvimento de larvas, redução da longevidade e fecundidade (Baur & Boethel, 2003) pode reduzir o potencial de controle por esses agentes biológicos em campo. Neste estudo, a sobrevivência de *P. elaeisis* emergido desde pupas tratadas com *Bt* foi afetada, sugerindo um baixo sinergismo entre esses agentes de controle biológico.

O número de parasitoides emergidos, tempo de desenvolvimento e razão sexual foi reduzido desde pupas susceptíveis ou resistentes (expostas ao *Bt*) de *S. frugiperda*. Isto se deve a que os parasitoides completam seu desenvolvimento larval e podem emergir antes que seu hospedeiro infestado por *Bt* morra se não fosse parasitado, desde que o nível de toxina *Bt* esteja presente em um nível que não cause letalidade do hospedeiro. Por outro lado, a nutrição de *S. frugiperda* é reduzida após exposição do *Bt* e pode ser em grande parte o resultado de uma má nutrição do hospedeiro causada pelas toxinas *Bt* nas membranas intestinais (Groot & Dicke, 2003), permitindo um fraco desempenho do parasitoide. A exposição direta de adultos parasitoides é improvável, pois o néctar não contém toxinas *Bt* (Groot & Dicke, 2003). Também é improvável que os parasitoides de pragas Lepidoptera sejam afetados porque as toxinas de *Bt* se ligam aos receptores no epitélio do intestino médio das lagartas do hospedeiro e perdem sua toxicidade para os inimigos naturais. No entanto, os parasitoides nos estágios imaturos podem ser influenciados indiretamente pelos efeitos letais ou subletais sobre a saúde e o desenvolvimento do hospedeiro (Bernal et al., 2002). Os efeitos causados pelo *Bt* são indiretos, e afetam a qualidade do hospedeiro, não entanto, isto pode comprometer o desempenho das gerações de *P. elaeisis*. A redução da razão sexual de *P. elaeisis* em pupas suscetíveis ou resistentes (expostas ao *Bt*) de *S. frugiperda*, pode ser devido a menor produção de espermatozóides ou a esterilidade masculina, já observada após exposição a outros inseticidas, pois himenópteros têm partenogênese arrenótoca (Rabeling & Kronauer, 2013).

Em geral, *Bt* causa efeitos colaterais em *P. elaeisis*, pois reduz produção de imaturos e desempenho reprodutivo ao longo das gerações e altera o comportamento durante a busca do hospedeiro. Os resultados deste estudo são úteis para desenvolver estratégias apropriadas no emprego seguro do bioinseticida em campo, pois a exposição do hospedeiro ao *Bt* pode representar riscos no estabelecimento e desempenho de *P. elaeisis*.

5. Referências

- Alcántara-de La Cruz, R., Zanuncio, J.C., Lacerda, M.C., Wilcken, C.F., Fernandes, F.L., Tavares, W.S., Soares, M.A., Sedyama, C.S., 2017. Side-effects of pesticides on the generalist endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Sci. Rep.* 7, 10064.
- Armstrong, J.S., Adamczyk, J.J., Shoil, J., Greenberg, M., 2011. Efficacy of single and dual gene cotton *Gossypium hirsutum* events on neonate and third instar fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* development based on tissue and meridic diet assays. *Fla. Entomol.* 94, 262–271.
- Atwood, D.W., Young, S.Y., Kring, T.J., 1997. Development of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae treated with *Bacillus thuringiensis* and thiodicarb. *J. Econ. Entomol.* 90, 751–756.
- Baranek, J., Konecka, E., Kaznowski, A., 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *BioControl* 62, 649–658.
- Barbosa, R.H., Zanuncio, J.C., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Rossoni, C., 2016. Foraging activity of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) at various densities on pupae of the eucalyptus defoliator *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). *Fla. Entomol.* 99, 686–690.
- Barrat, B.I.P., Howarth, F.G., Withers, T.M., Kean, J.M., Ridley, G.S., 2010. Progress in risk assessment for classical biological control. *Biol. Control* 52, 245–254.
- Baur, M.E., Boethel, D.J., 2003. Effect of *Bt*-cotton expressing Cry1A(c) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biol. Control* 26, 325–332.
- Bernal, J.S., Griset, J.G., Gillogly, P.O., 2002. Impacts of developing on *Bt* maize-intoxicated hosts on Witness parameter of a stem borer parasitoid. *J. Entomol. Sci.* 37, 27–40.
- Bittencourt, M.A.L., Berti Filho, E., 1999. Preference of *Palmistichus elaeisis* for pupae of some lepidopterous pests. *Sci. Agr.* 56, 1281–1283.
- Blumberg, D., Navon, A., Goldenberg, S.K.S., Ferkovich, S.M., 1997. Interactions among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 90, 1181–1186.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.

- Burtet, L.M., Bernardi, A.O., Melo, M.A., Pes, T.P., Strahl, T., Guedes, J.V., 2017. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with *Bt* maize and insecticides in southern Brazil. *Pest Manag. Sci.* 73, 2569–2577.
- Chichera, R.A., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Barbosa, R.H., Pastori, P.L., Rossoni, C., 2012. Ability to quest and reproduction of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) in pupae of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Interciencia* 37, 852–856.
- Chilcutt, C.F., Tabashnik, B.E., 1999. Effects of *Bacillus thuringiensis* on adults of *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Biocontrol Sci. Techn.* 9, 435–440.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106.
- Dias-Pini, N.S., DaSilva, C.S.B., Penaflor, M.F.G.V., Parra, J.R.P., 2014. Does host determine short-range flight capacity of trichogrammatids? *J. Appl. Entomol.* 138, 677–682.
- Ebrahimi, M., Sahragard, A., Talaei-Hassanloui, R., 2012. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on survival and mortality of immature and mature stages of *Diadegma insulare* parasitizing *Plutella xylostella*. *Phytoparasitica* 40, 393–401.
- Erb, S.L., Bouchier, R.S., van Frankenhuyzen, K., Smith, S.M., 2001. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). *Environ. Entomol.* 30, 1174–1181.
- Fiaz, 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, 237–345.
- Finney, D.J., 1964. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Flagel, L., Lee, Y.W., Wanjugi, H., Swarup, S., Brown, A., Wang, J., Kraft, E., Greenplate, J., Simmons, J., Adams, N., Wang, Y., Martinelli, S., Hass, J.A., Gowda, A., Head, G., 2018. Mutational disruption of the ABCC2 gene in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, confers resistance to the Cry1Fa and Cry1A.105 insecticidal proteins. *Sci. Rep.* 8, 7255.
- Gómez, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Matus, V., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2014. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochem. J.* 459, 383–396.
- Gonzalez-Cabrera, J., Molla, O., Monton, H., Urbaneja, A., 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) for controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl* 56, 71–80.

- Groot, A.T., Dicke, M., 2003. Insect-resistant transgenic plants in a multitrophic context. *Plant J.* 31, 387–406.
- Hilbeck, A., 2001. Implications of transgenic, insecticidal plants for insect and plant biodiversity. *Perspec. Plant Ecol. Evol. Syst.* 4, 43–61.
- Ksentini, I., Jardak, T., Zeghal, N., 2010. *Bacillus thuringiensis*, deltamethrin and spinosad side-effects on three *Trichogramma* species. *Bull. Insectol.* 63, 31–37.
- Liu, X.X., Sun, C.G., Zhang, Q.W., 2005. Effects of transgenic Cry1A+CPTI cotton and CryIAc toxin on the parasitoid, *Campoletis chlorideae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect Sci.* 12, 101–108.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., da Silva Neves, G., Gonçalves, W.G., Zanuncio, J.C., Bozdoğan, H., Serrão, J.E., 2018a. Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* 212, 629–637.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Colares, H.C., Campos, J.M., Dos Santos, M.H., Fernandes, F.L., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., 2018b. Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Bull. Entomol. Res.* 108, 716–725.
- Mohan, M., Sushil, S.N., Bhatt, J.C., Gujar, G.T., Gupta, H.S. Synergistic interaction between sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* and *Campoletis chlorideae* in managing *Helicoverpa armigera*. *BioControl* 53: 375–386, 2008.
- Nicholson, G.M., 2007. Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* 49, 413–422.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3623–3629.
- Originlab Corporation, 2013. OriginPro v. 9.0.0 SR2 b87. Originlab Corporation. Originlab Corporation, Northampton, MA. (<http://www.OriginLab.com>).
- Pedlowski, A.M., Canela, M.C., Terra, M.A.C., Faria, R.M.R., 2012. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. *Crop Prot.* 31, 113–118.
- Pereira, F.F., Zanuncio, J.C., Kassab, S.O., Pastori, P.L., Barbosa, R.H., Rossoni, C., 2013. Biological characteristics of *Palmistichus elaeisis* Delvare e LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) on refrigerated pupae of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Chil. J. Agr. Res.* 73, 117–121.
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Santos, M.H.D., Fernandes, F.L., Wilcken, C.F., Soares, M.A., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., 2017. Insecticidal activity of garlic essential oil and

- their constituents against the mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sci. Rep.* 7, 46406.
- Plata-Rueda, A., Campos, J.M., da Silva Rolim, G., Martínez, L.C., Dos Santos, M.H., Fernandes, F.L., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., 2018. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Ecotox. Environ. Safe.* 156, 263–270.
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Costa, N.C.R., Zanuncio, J.C., Sena Fernandes, M.E., Serrão, J.E., Guedes, R.N.C., Fernandes, F.L., 2019a. Chlorantraniliprole-mediated effects on survival, walking abilities, and respiration in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Ecotox. Environ. Safe.* 172, 53–58.
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Da Silva, B.K.R., Zanuncio, J.C., Sena Fernandes, M.E., Serrão, J.E., Guedes, R.N.C., Fernandes, F.L., 2019b. Exposure to cyantraniliprole causes mortality and disturbs behavioral and respiratory response in the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Pest Manag. Sci.* 75, 1–9.
- Pratissoli, D., Polanczyk, R.A., Holtz, A.M., Cocheto, J.G., Tamanhoni, T., Milanez, A.M., 2007. Development of melonworm on different feeding substrates. *Hortic. Bras.* 25, 598–601.
- Rabeling, C., Kronauer, D.J.C., 2013. Telytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 273–92.
- Regode, V., Kuruba, S., Mohammad, A.S., Sharma, H.C., 2016. Isolation and characterization of gut bacterial proteases involved in inducing pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* toxin in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Front. Microbiol.* 7, 1567–1567.
- Romeis, J., Meissle, M., Bigler, F., 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnol.* 24, 63–71.
- Salama, H.S., Zaki, F.N., Sabbour, M.M., 1996. Effect of *Bacillus thuringiensis* endotoxin on *Apanteles litae* Nixon and *Bracon instabilis* Marsh (Hymenoptera: Braconidae), two parasitoids of the potato tuber moth *Phthorimia operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelishiidae). *J. Appl. Entomol.* 120, 565–568.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 9, 283–300.
- Santos-Amaya, O.F., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Tavares, C.S., Campos, S.O., Guedes, R.N.C., Pereira, E.J.G., 2015. Resistance to dual-gene *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Sci. Rep.* 5, 18243.
- SAS Institute, 2002. The SAS System for Windows, release 9.0. SAS Institute, Cary, N.C. (<http://www.sas.com>).

- Schoenmaker, A., Cusson, M., van Frankenhuyzen, K., 2001. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and parasitoids of late-instar larvae of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. J. Zool.* 79, 1697–1703.
- Soares, M.A., Gutierrez, C.T., Zanuncio, J.C., Pedrosa, A.R.P., Lorenzon, A.S., 2009. Superparasitismo de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) y comportamiento de defensa de dos hospederos. *Rev. Colomb. Entomol.* 35, 62–65.
- Stemele, M.A., 2016. Impact of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* application on population densities of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae), and its dominant parasitoid, *Cotesia vestalis* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) and the implications on cabbage yield. *Afr. Entomol.* 24, 398–406.
- Tabashnik, B.E., Zhang, M., Fabrick, J.A., Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhang, J., Yelich, A., Unnithan, G.C., 2015. Dual mode of action of *Bt* proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Sci. Rep.* 5, 15107.
- Vineela, V., Nataraj, T., Reddy, G., Devi, P.S.V., 2017. Enhanced bioefficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) through particle size reduction and formulation as a suspension concentrate. *Biocontrol Sci. Technol.* 27, 58–69.
- Wright, M.S., Cornelius, M., 2012. Mortality and repellent effects of microbial pathogens on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *BMC Microbiol.* 12, 291.
- Zanuncio, J.C., Pereira, F.F., Jacques, G.C., Tavares, M.T., Serrão, J.E., 2008. *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), a new alternative host to rear the pupae parasitoid *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae). *The Coleopt. Bull.* 62, 64–66.
- Zanuncio, J.C., Vinha, G.L., Ribeiro, R.C., Fernandes, B.V., Kassab, S.O., Wilcken, C.F., Zanuncio, T.V., 2015. *Psorocampa denticulata* (Lepidoptera: Notodontidae) pupae as an alternative host for *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fla. Entomol.* 98, 1003–1005.
- 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). *Sci. Rep.* 6, 30261.

CAPÍTULO 2

*Submetido à revista: Journal of Pest Science

O desenvolvimento e a sobrevivência do parasitoide *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) difere em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) suscetíveis ou resistentes ao *Bacillus thuringiensis*

Resumo: O endoparasitoide, *Tetrastichus howardi* Olliff (Hymenoptera: Eulophidae) é utilizado no manejo de pragas Coleoptera e Lepidoptera. Inseticidas químicos podem não serem compatíveis com inimigos naturais. Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) têm menor impacto nos mesmos, mas interações dessa bactéria com o parasitoide *T. howardi* precisam ser estudadas. O objetivo deste trabalho avaliar os efeitos subletais de *Bt* nos progenitores de *T. howardi*, parentais e de primeira geração, parasitando esse hospedeiro suscetível ou resistentes à essa bactéria. As larvas de *S. frugiperda* foram expostas a concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) de *Bt* e parasitadas por *T. howardi*. A resposta comportamental, longevidade e a reprodução desse parasitoide foram avaliados. *Bacillus thuringiensis* repeliu e reduziu a produção de imaturos de *T. howardi*. A sobrevivência dos parasitoides parentais e de primeira geração, de ambos os sexos emergidos de larvas tratadas com *Bt*, foi menor que no controle. A reprodução desse parasitoide foi menor em pupas suscetíveis ou resistentes a *Bt* que nas não tratadas. *Tetrastichus howardi* emergiu, de pupas de *S. frugiperda* suscetível ou resistente ao *Bt*, mas o comportamento de busca do hospedeiro e parâmetros reprodutivos alterados indica baixa compatibilidade entre esse bioinseticida e o parasitoide.

Palavras-chave: desempenho reprodutivo; parasitoide; produção de imaturos; repelência; sobrevivência; toxicidade

1 Introdução

Tetrastichus howardi Olliff (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide ou hiperparasitoide facultativo de hábito gregário (La Salle e Polaszek, 2007), de pupas de coleópteros e lepidópteros (Tiago et al., 2018; Prasad et al., 2007). *Tetrastichus howardi* pode parasitar larvas e adultos de *D. saccharalis* (Vargas et al., 2011; Pereira et al., 2015). Este parasitoide tem distribuição geográfica desde a região Afrotropical, Ásia e Austrália até a

região Neotropical (La Salle e Polaszek, 2007) e relatado em lepidópteros de importância econômica, como *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Costa et al., 2014), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Oliveira et al., 2016), e *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Silva-Torres et al., 2010).

O controle químico é um método de controle de insetos, amplamente, utilizado, mas seu uso constante pode contaminar o ambiente e reduzir populações de inimigos naturais, e facilitar o surgimento de insetos resistentes (Song e Swinton, 2009; Torres et al., 2010). Inseticidas podem causar efeitos subletais em inimigos naturais (Desneux et al., 2007), aumentando a necessidade de métodos mais sustentáveis de controle de pragas (Nicholson, 2007; Pedlowski et al., 2012). Inseticidas podem afetar o desenvolvimento, longevidade, fecundidade e parasitismo de parasitoides (Alcántara-de La Cruz et al., 2017). Inimigos naturais devem ser compatíveis com métodos químicos manejo integrado de pragas (MIP) (Zanuncio et al., 2016; Martínez et al., 2018a).

Bioinseticidas à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) são utilizados desde a segunda metade do século XX (Rosas-Garcia, 2009; Sanahuja et al., 2011). A toxicidade do *Bt* a uma ampla gama de insetos se deve às suas proteínas cristalinas (Cry) produzidas durante a esporulação (Palma et al., 2014) e dissolvidas e ativadas por proteases dos insetos formando poros na membrana do intestino médio, causando septicemia e morte (Oestergaard et al., 2007; Castro et al., 2019). Cepas específicas de *Bt*, desenvolvidas para grupos de insetos-alvo, são menos tóxicas para vertebrados e têm menor impacto ambiental (Bravo et al., 2011). *Bt* subespécie *kurstaki* é usado no controle de lepidópteros (Sanahuja et al., 2011) e cepas e toxinas de *Bt* são usadas na produção de bioinseticidas e genes *cry* no desenvolvimento de plantas transgênicas (Romeis et al., 2006).

Plantas transgênicas expressando proteínas Cry são usadas no manejo de imaturos pragas da ordem Lepidoptera (Carrière et al., 2010; Sanahuja et al., 2011). Plantas expressando uma única proteína Cry podem favorecer surtos de pragas resistentes (Baranek et al., 2017) e aquelas expressando duas ou mais toxinas *Bt* ativas retardam este processo (Santos-Amaya et al., 2015).

Interações entre *Bacillus thuringiensis* e parasitoides são pouco estudados. O uso combinado desses dois métodos no manejo integrado de pragas (MIP) pode ter baixo custo e risco ambiental e eficiência alta (Barrat et al., 2010). Os efeitos do *Bt* em *T. howardi* são, ainda, desconhecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a reprodução e o comportamento de *T. howardi* parasitando pupas de *S. frugiperda* suscetíveis e ou não ao *Bt*.

2 Material e Métodos

2.1 Insetos

Indivíduos de *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), *T. howardi* e *S. frugiperda* suscetível ou resistente a *Bt* foram obtidos de criações mantidas no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). Indivíduos de *T. molitor* foram mantidos em caixas plásticas (60 × 40 × 12 cm) com temperatura de 25 ± 1°C, 70 ± 10% UR e fotoperíodo de 12:12 h [L:D]. Larvas e adultos, desse inseto, foram alimentados *ad libitum* com farelo de trigo (12% de proteína, 2% de lipídios, 75% de carboidratos e 11% de mineral/açúcar), pedaços de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* Linnaeus) e chuchu (*Sechium edule* Swartz) até a pupação.

Pupas de *T. molitor* foram colocadas em tubos de vidro fechados com tela “voile”, por 24 horas, com adultos de *T. howardi* copulados por 24 h. Após a parasitismo das pupas, adultos emergidos de *T. howardi* (24 h de idade) foram alimentados com mel puro e mantidos em tubos de vidro (14 × 2,2 cm) em sala aclimatada (25 ± 2°C, 70 ± 10% UR e fotoperíodo de 12:12 h [L:D]).

Lagartas de *S. frugiperda* suscetíveis ou resistentes foram criadas separadamente, em potes de polietileno (15 × 9 cm) com dieta artificial constituída por 6,2 g de ágar, 15,2 g de levedura de cerveja, 23,7 g de gérmen de trigo, 50 g de feijão, 15,3 g de ácido ascórbico, 0,5 g de ácido sórbico, 1 g de nipagim e 1,2 mL de solução de inibidora (41,8% de ácido propionico e 4,2% de ácido fosfórico), em sala a 25 ± 2 °C, 75 ± 5% de umidade relativa e fotofase de 12 horas. *Spodoptera frugiperda*, resistente ao *Bt*, foi coletada em milho (30F35H DuPont Pioneer®, Santa Cruz do Sul, Brasil) expressando proteínas Cry1F.

2.2 Teste de concentração-mortalidade

Bacillus thuringiensis (*Bt*), variedade *kurstaki*, linhagem HD-1 (Dipel®, Abbot Laboratories Chemical e Agricultural Products Division, North Chicago, IL, USA) foi diluído quanto de *Bt* em 1L de água destilada produzindo uma solução estoque, ajustando 100 g L⁻¹ e obtendo as concentrações necessárias. Seis concentrações de *Bt* foram preparadas e usadas para avaliar a toxicidade do bioinseticida e determinar os pontos toxicológicos relevantes utilizando diluições em serie de concentrações (1,562, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 mg mL⁻¹) para se determinar a relação concentração-mortalidade e concentração letal (CL). Água destilada foi usada como controle. Cada solução (2 µL) foi aplicada sob 1 g de dieta artificial. Trinta lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda* suscetíveis foram individualizadas por placa

de Petri (90 × 1,5 mm), constituindo uma repetição, por concentração em triplicata. O número de lagartas mortas foi contabilizado após exposição ao *Bt* a cada 24 h por oito dias.

2.3 Teste de tempo-mortalidade

Lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*, suscetíveis, foram individualizadas por placa de Petri e expostas às quatro concentrações de *Bt* (CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀) determinadas pelo teste de concentração-mortalidade, além do controle com água destilada. A exposição e as condições foram as descritas para o teste de concentração-mortalidade. O número de insetos sobreviventes foi registrado a cada 12 h por 8 dias. Quatro repetições, com 30 insetos cada uma, foram usadas por concentração de inseticida seguindo um delineamento inteiramente casualizado.

2.4 Produção de imaturos de *T. howardi*

Lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*, suscetíveis ou resistentes, foram tratadas com a CL₅₀ e CL₉₀ estimada do *Bt*, além de um controle com água destilada. A seguir, pupas (suscetíveis e resistentes) tratadas foram expostas ao parasitismo e imaturos (larvas e pupas) de *T. howardi* foram obtidos. Cada tratamento teve três repetições com dez pupas de 24 h de idade em delineamento inteiramente casualizado. As pupas parasitadas por *T. howardi* foram individualizadas em frascos de vidro (2,5 cm × 8 cm) e radiografadas usando um sistema de radiografia de espécimes MX-20 equipado com uma câmera digital de 14 bits (Faxitron X-Ray Corp., Wheeling, IL, EUA). A localização de cada parasitoide dentro da pupa de *S. frugiperda* foi gravada, digitalmente, durante o desenvolvimento dos imaturos em 5, 10 e 15 dias após o parasitismo. O número de larvas e pupas de *T. howardi* vivas por pupa foi registrado.

2.5 Resposta comportamental

Sessenta adultos de *T. howardi* foram colocados por placa de Petri (90 × 15 mm) com um disco de papel de filtro (9 cm em diâmetro com porosidade de 3 µm, 0,5% de teor de cinzas, e densidade de 80 g/m²) (Nalgon Equip. Científicos, Itupeva, SP, Brasil) fixado no fundo da placa de Petri com cola sintética. Bioensaios de resposta comportamental foram realizados em arenas com metade tratada com 1 mL de *Bt* dissolvido em água destilada (CL₅₀ ou CL₉₀) e, a outra metade, apenas, com água destilada como controle. Um adulto de *T. howardi* foi liberado no centro da placa de Petri (no papel filtro) e mantido por 10 min. Vinte insetos foram utilizados por concentração letal em delineamento inteiramente casualizado.

Cada inseto com atividade locomotora, dentro da placa de Petri, foi gravado com filmadora digital (XL1 3CCD NTSC, Canon, Lake Success, NY, EUA) equipado com Lente de vídeo 16× (ZoomXL 5.5-88 mm, Canon). A distância percorrida e o tempo de parada em cada metade da placa de Petri pelos parasitoides foram registradas com sistema de rastreamento de vídeo (ViewPoint LifeSciences, Montreal, Quebec, Canadá). Insetos que gastaram <1 s na metade tratada com inseticida da arena foram considerados repelidos e aqueles que gastaram <50% do tempo na superfície tratada com *Bt* foram considerados irritados (Fiaz et al., 2018; Plata-Rueda et al., 2019a).

2.6 Sobrevivência do parasitoide em F₁ e F₂

Vinte e cinco pupas de *S. frugiperda* suscetíveis e vinte e cinco resistentes, com 24 h de idade e tratadas com a CL₅₀ e CL₉₀ estimada do *Bt* foram expostas, individualmente, por 96 h ao parasitismo por dois casais de *T. howardi* com 72 h de idade em tubo de vidro (14 × 2,2 cm) tampado com algodão, alimentados com mel e mantidos em ambiente com temperatura de 25 ± 2°C e fotofase de 14 h. Após o parasitismo, essas pupas foram mantidas nos tubos de vidro até a emergência dos parasitoides. O número de parasitoides adultos que sobreviveram, por sexo, foi contabilizado diariamente. As avaliações foram realizadas por duas gerações.

2.7 Desempenho reprodutivo do parasitoide

Uma pupa de *S. frugiperda*, suscetível ou resistente, tratada com a CL₅₀ e CL₉₀ estimada do *Bt* foi exposta por 96 h ao parasitismo por dois casais de *T. howardi* com 72 h de idade em tubo de vidro (14 × 2,2 cm) com uma gota de mel, tampado com algodão, em ambiente com temperatura de 25 ± 2°C e fotofase de 14 horas. Quinze repetições foram utilizadas por pupa (suscetível ou resistente) e os tubos mantidos nessas condições até a emergência do parasitoide ou do hospedeiro. O número de parasitoides emergido, tempo de desenvolvimento (ovo-adulto) e razão sexual (número de fêmeas/machos + fêmeas) foi determinado por duas gerações (F₁ e F₂).

2.8 Análise estatística

Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise probit, gerando uma curva concentração-mortalidade (Finney, 1964). Os dados de tempo-mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência usando o estimador Kaplan-Meier (log-rank test) através do software Origin Pro v. 9.1. (OriginLab Corporation, 2013). Dados dos parasitoides que sobreviveram até o final do experimento foram tratados como censurados. A produção de

parasitoides e os dados de resposta comportamental foram analisados por análise unidirecional de variância (ANOVA) e diferenças entre tratamentos obtidos com o teste de Tukey (HSD) em nível de significância de 5%. Dados do número de larvas produzidas e resposta comportamental foram transformados para satisfazer suposições de normalidade e homocedasticidade e aqueles do número de parasitoides emergidos, tempo de desenvolvimento e razão sexual comparados pelo teste t de Student em nível de significância de 5%. Toxicidade, produção de larvas, resposta comportamental e os dados de parasitoides emergidos, tempo de desenvolvimento e razão sexual foram analisados usando o SAS para Windows v. 9.0. (SAS Institute, 2002).

3 Resultados

3.1 Concentração e tempo-mortalidade de lagartas suscetíveis ao *Bt*

O ajuste do modelo concentração-mortalidade foi adequado ($P > 0,05$) para estimar parâmetros toxicológicos (Tabela 1) confirmando a toxicidade do *Bt* para *S. frugiperda* suscetível. A mortalidade no grupo controle foi menor que 1%.

A sobrevivência de larvas de *S. frugiperda*, suscetíveis, diferiu entre as concentrações letais do *Bt* ($\chi^2 = 20,39$; DF= 4; $P < 0,001$) (Figura 1). Essa sobrevivência, após 200 h, foi de 100% para aquelas não expostas ao *Bt* (controle) e de 70%, 6,25%, 0% e 0% com CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀, respectivamente.

Tabela 1. Concentrações letais de *Bacillus thuringiensis* contra lagartas suscetíveis de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) obtida a partir da análise probit (df= 5, slope \pm SE= 8,175 \pm 1,09, intercepto= 5,506)

Concentração letal	Valor estimado (mg L ⁻¹)	Limites		X ²
		Inferior	Superior	
CL ₂₅	5,67	5,22	5,99	45,90
CL ₅₀	6,39	6,10	6,68	
CL ₇₅	7,12	6,83	7,53	
CL ₉₀	7,84	7,45	8,48	

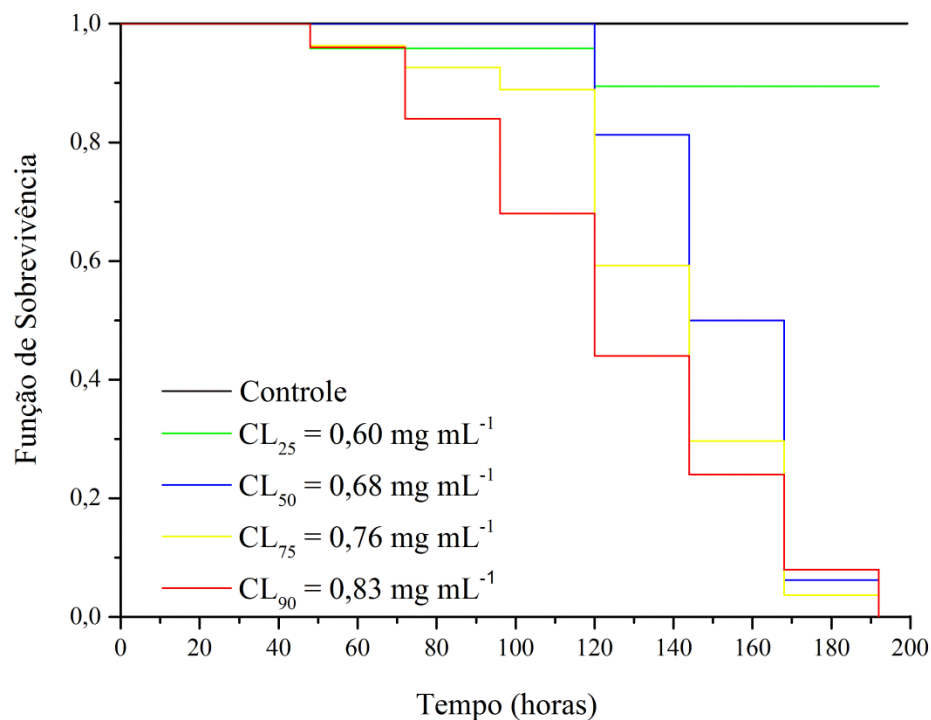


Figura 1: Curvas de sobrevivência de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), suscetíveis, até 200 h após o tratamento com diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis* utilizando o método Kaplan-Meier e comparado usando o teste Log-rank ($X^2 = 45,90$; $P < 0,001$).

3.2 Produção de imaturos de *T. howardi*

Após cinco dias de exposição ao *Bt*, nenhuma larva de *T. howardi* viva foi observada em pupas de *S. frugiperda* (Figura 2 e Tabela 2). O número de larvas de *T. howardi* vivas diferiu entre o grupo CL₉₀ e a CL₅₀ após 10 dias de inoculação do parasitoide ($F_{2,11} = 2,74$; $P < 0,012$); Após 15 dias, o grupo CL₉₀ diferiu de outros tratamentos ($F_{2,11} = 42,19$; $P < 0,001$). Nenhuma pupa de *T. howardi* foi observada em *S. frugiperda* suscetível após cinco e 10 dias de exposição ao parasitoide. O número de pupas de *T. howardi*, produzidas diferiu entre o controle e tratamentos ($F_{2,11} = 13,85$; $P < 0,001$).

Larvas de *T. howardi* não foram observadas em pupas de *S. frugiperda* resistentes ao *Bt* aos cinco dias após a inoculação (Figura 2 e Tabela 2). A produção de larvas foi semelhante entre tratamentos após 10 dias ($F_{2,11} = 1,19$; $P = 0,411$); no entanto, com 15 dias, o número de larvas em desenvolvimento em *S. frugiperda* expostas à CL₅₀ e CL₉₀ de *Bt* foi maior do que no controle ($F_{2,11} = 18,69$; $P < 0,001$). Nenhuma pupa de *T. howardi* foi observada após 5 e 10 dias do parasitismo. O número de pupas de *T. howardi* foi maior no controle que nos tratamentos ($F_{2,11} = 83,01$; $P < 0,001$).

Tabela 2. Larvas e pupas de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) por pupa de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) suscetível ou resistente ao *Bacillus thuringiensis* (controle, valores estimados de CL₅₀ e CL₉₀) por 10, 15 e 20 (Dias). Os tratamentos (média ± erro padrão da média) diferem em $P < 0,05$ (teste de separação média de Tukey)

	Larva			Pupa		
	Controle	CL ₅₀	CL ₉₀	Controle	CL ₅₀	CL ₉₀
Suscetível						
5	–	–	–	–	–	–
10	63.5 ± 8.3ab	39.5 ± 7.1b	77.2 ± 4.6a	–	–	–
15	21.5 ± 2.9b	20.5 ± 1.3b	62.5 ± 3.5a	38.0 ± 4.3a	16.2 ± 3.7b	7.5 ± 1.4b
Resistente						
5	–	–	–	–	–	–
10	37.0 ± 1.1a	41.0 ± 3.3a	37.0 ± 6.0a	–	–	–
15	1.5 ± 0.6b	33.5 ± 3.2a	33.2 ± 5.4a	38.2 ± 1.8a	3.2 ± 0.7b	1.0 ± 0.7b

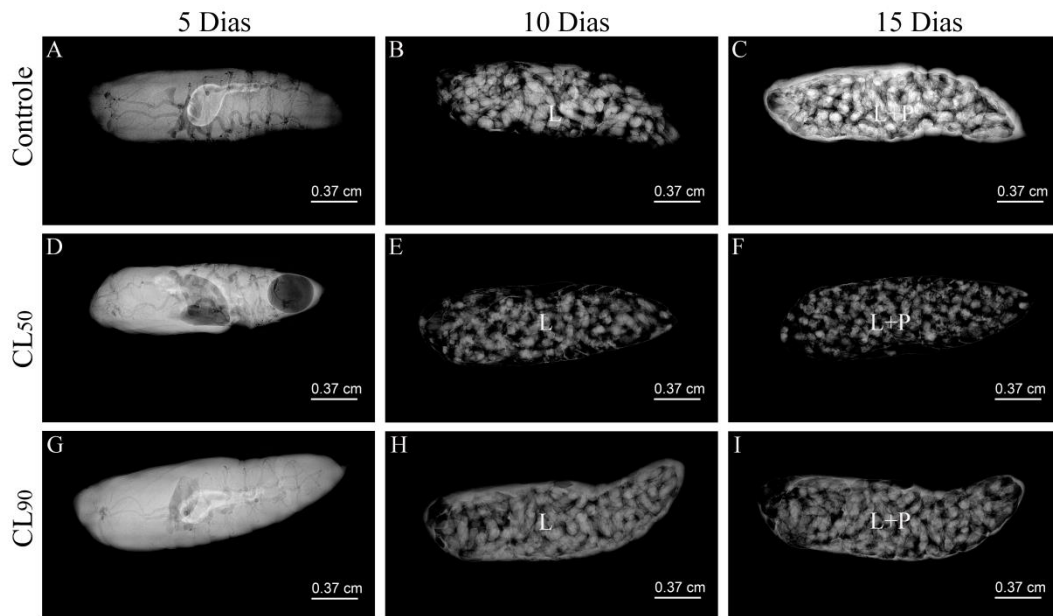


Figura 2: Sequência temporal de imagens de raios-X mostrando o desenvolvimento de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistente ou suscetível ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀). Larvas e pupas foram indicadas (L ou P, respectivamente).

3.3 Resposta comportamental

Trilhas de *T. howardi* em arenas semi-tratadas (Figura 3) mostram distância percorrida semelhante entre tratamentos ($186,53 \pm 19,87$ cm) com parasitoides em arenas, parcialmente, tratados com as CL₅₀ ($188,39 \pm 11,67$ cm) e CL₉₀ ($172,30 \pm 10,11$ cm) ($F_{2,13} = 0,39$; $P = 0,681$) (Figura 4A). O tempo de repouso dos parasitoides foi maior com a CL₅₀ ($276,29 \pm 16,99$ s) que com a CL₉₀ ($223,4 \pm 11,24$ s) e no controle ($210,98 \pm 19,68$ s) ($F_{2,13} = 4,68$; $P < 0,018$) (Figura 4B).

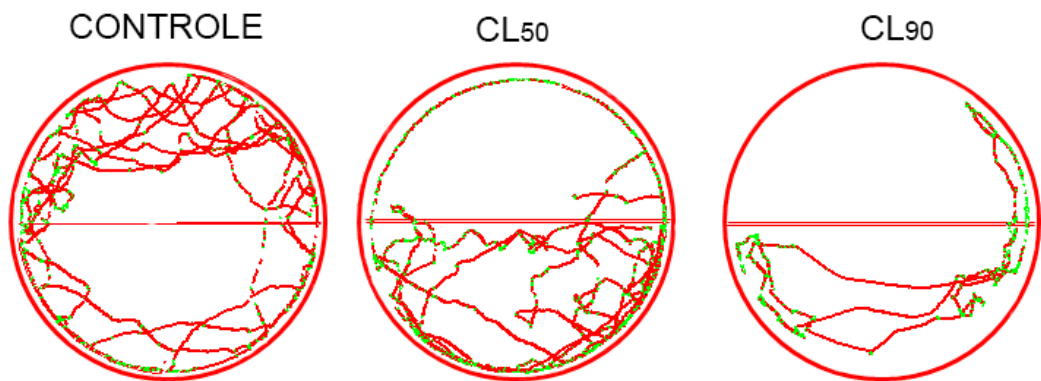


Figura 3. Caminhamento de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) durante 10 minutos em arenas de papel filtro (9 cm de diâmetro) com metade impregnada com *Bacillus thuringiensis* (metade superior de cada arena). Faixas vermelhas indicam alta velocidade de caminhamento; faixas verdes baixa velocidade (inicial).

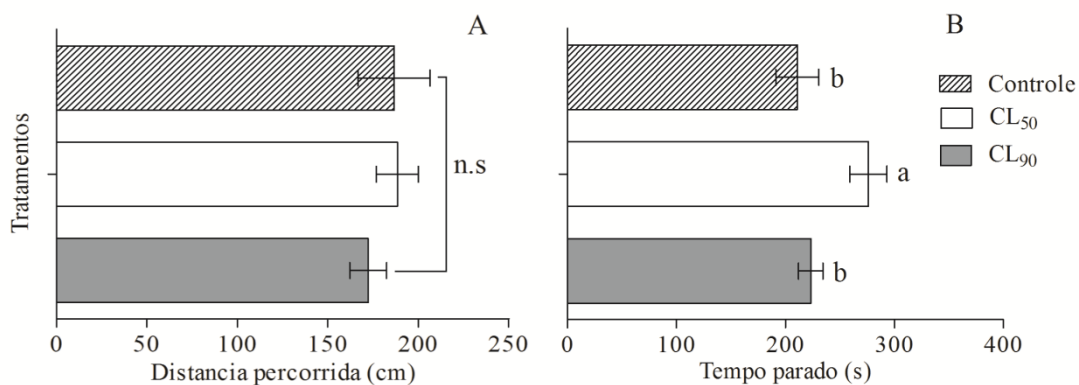


Figura 4. Distância de caminhamento (a) e tempo de parada (b) (média \pm erro padrão da média) de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) submetido ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀) por 10 min. Tratamentos (médias \pm desvio padrão) diferem em $P < 0,05$ (teste médio de separação de Tukey).

3.4 Sobrevivência dos adultos de *T. howardi*

Tetrastichus howardi emergiu de pupas de *S. frugiperda* tratadas com *Bt* (suscetíveis ou resistentes), mas com menor sobrevivência que no controle, principalmente na geração F1 (Figura 5). A sobrevivência foi menor em 47 dias para as fêmeas ($\chi^2= 1663,5$; DF= 4; $P< 0,001$) e 37,6 dias para machos ($\chi^2= 545,27$; DF= 4; $P< 0,001$) em pupas suscetíveis tratadas com CL₉₀. A sobrevivência de parasitoides emergidos de *S. frugiperda* resistentes a *Bt* e expostas a CL₉₀ dessa bactéria foi menor em 41 dias para fêmeas ($\chi^2= 2468,2$; DF= 4; $P< 0,001$) e de 30,2 dias para machos (teste log-rank: $\chi^2= 578,02$; DF= 4; $P< 0,001$).

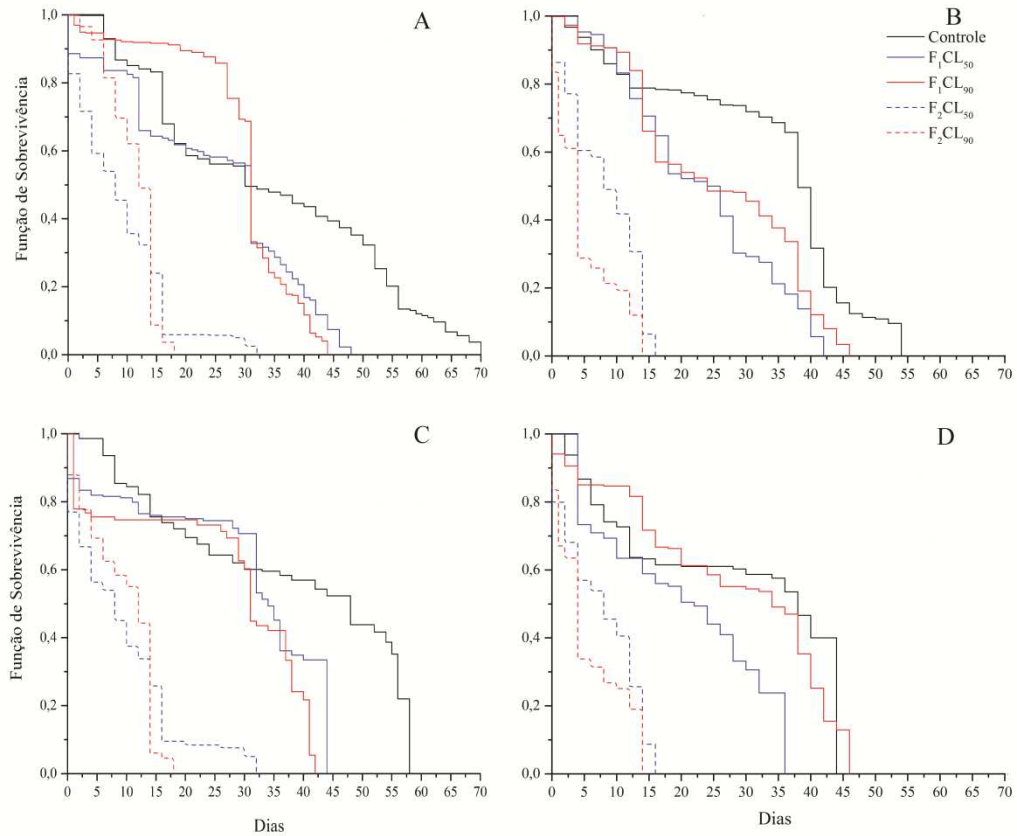


Figura 5. Longevidade e sobrevivência de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) suscetível e resistente ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀). a) Fêmeas/pupa suscetível. b) Machos/pupa suscetível. c) Fêmeas/pupa resistente. d) Machos/pupa resistente.

3.5 Desempenho reprodutivo de *T. howardi*

O período de desenvolvimento ovo – adulto foi maior na geração parental que na primeira geração de *T. howardi* em pupas de *S. frugiperda* resistentes a *Bt*. O tempo de desenvolvimento, em pupas suscetíveis, não diferiu entre gerações na CL₅₀ ($t_{1,8} = 2,45$; g.l = 5, $P = 0,004$) e em pupas resistentes, entre gerações nos grupos CL₅₀ ($t_{1,8} = 5,11$; g.l = 5, $P < 0,001$) e CL₉₀ ($t_{1,8} = 3,46$; g.l = 5, $P < 0,009$) (Figura 6A).

O número de parasitoides adultos emergidos de pupas de *S. frugiperda* suscetível exposto ao CL₅₀ ($t_{1,8} = 0,24$; g.l = 5, $P = 0,813$) e a CL₉₀ ($t_{1,8} = 1,32$; g.l = 5, $P = 0,222$) de *Bt* não diferiu entre gerações. No entanto, o número de parasitoides adultos da primeira geração, emergidos de hospedeiro resistente diferiu quando expostos à CL₅₀ ($t_{1,8} = 5,38$; g.l = 5, $P < 0,001$) e à CL₉₀ ($t_{1,8} = 3,51$, g.l = 5, $P < 0,007$) (Figura 6B).

A razão sexual de *T. howardi* em pupas suscetíveis expostas a CL₅₀ ($t_{1,8} = 0,63$; g.l = 5, $P = 0,543$) e CL₉₀ ($t_{1,8} = 1,43$; g.l = 5, $P = 0,191$) foi semelhante entre tratamentos. Nas pupas resistentes com as CL₅₀ ($t_{1,8} = 2,61$; g.l = 5, $P < 0,031$) e CL₉₀ ($t_{1,8} = 2,97$; g.l = 5, $P < 0,018$) (Figura 6C) houve diferença significativa entre gerações.

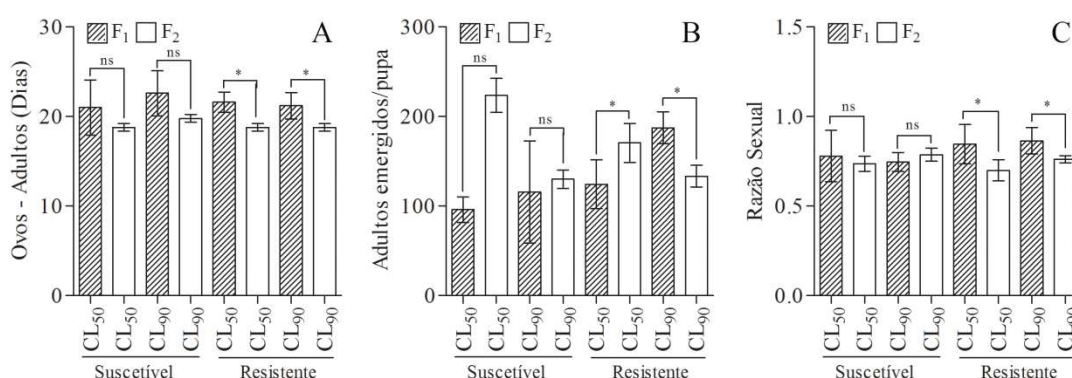


Figura 6. Reprodução de *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) suscetíveis ou resistentes ao *Bacillus thuringiensis* (valores estimados de controle, CL₅₀ e CL₉₀). a) Emergência. b) Número de adultos. c) Razão sexual (número de fêmeas/total de adultos).

4 Discussão

A alta mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* exposta ao *Bt* via ingestão foi semelhante ao observado para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, *Helicoverpa armigera* Hübner, *Trichoplusia ni* Hübner e *Spodoptera exigua* Hübner (Noctuidae) (Şahin et al., 2018; Castro et al., 2019; Khorramnejad et al., 2019) e se deve à matriz de proteínas inseticidas produzidas pelo *B. thuringiensis* como as Cry (Bravo et al., 2011; Sanchis et al., 2011). Cristais tóxicos

são solubilizados no intestino médio alcalino das larvas, após a ingestão das bactérias, e as protoxinas são ativadas por proteases formando poros na membrana plasmática, lise celular e morte de insetos (Tabashnik et al., 2015; Castro et al., 2019). A morte de larvas de *S. frugiperda*, após a exposição ao *Bt*, confirma a toxicidade do bioinseticida via ingestão como relatado para *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae) (Gómez et al., 2014).

A necessidade de períodos prolongados de exposição ao *Bt*, de 12 a 200 h, para causar a morte de *S. frugiperda* está associada à ação lenta do *Bt* com toxicidade por ingestão como relatado para *Heliothis virescens* Fabricius (Gore et al., 2005), *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre (González-Cabrera et al., 2006) e *Spodoptera litura* Fabricius (Vineela et al., 2017). Um bioinseticida de ação lenta facilita a impregnação de tecidos vegetais e as pragas desfolhadoras ao se alimentar morrem mais tarde. Os efeitos toxicológicos das proteínas Cry podem reduzir os danos causados a insetos em culturas comerciais (Gore et al., 2005; González-Cabrera et al., 2006; Vineela et al., 2017). A alta mortalidade de *S. frugiperda* após exposição ao *Bt* na CL₉₀, indicando suscetibilidade desse inseto, principalmente, com altas concentrações dessa bactéria.

A menor produção de imaturos de *T. howardi* em pupas de *S. frugiperda*, suscetível e resistente, com *Bt*, principalmente de pupas se deve a toxina desta bactéria causar danos subletais sobre o parasitoide (Bernal et al., 2002). Isto reduz a absorção de nutrientes do hospedeiro (Castro et al., 2019) e, conseqüentemente, o desenvolvimento do parasitoide (Liu et al., 2005; Mohan et al., 2008).

Alterações no caminamento do *T. howardi* após exposição ao *Bt* desse deve à danos no sistema nervoso, estimulando ou reduzindo a mobilidade (Martínez et al., 2018b; Plata-Rueda et al., 2018). As curtas distâncias percorridas por *T. howardi* após a exposição indicam repelência de *Bt* (Dias-Pini et al., 2014) como relatado para *Coptotermes formosanus* Shiraki (Blattodea: Rhinotermitidae) (Wright e Cornelius, 2012) e o parasitoide *Tranosema rostrale* (Brishke) (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Schoenmaker et al., 2001). *Cotesia vestialis* (Haliday) (Braconidae) parasitou um maior número de hospedeiros após a aplicação do *Bt* em doses baixas (Bopape et al., 2014). Inseticidas biológicos e químicos podem interromper atividades de insetos, como forrageio de substrato e reconhecimento de alimentos (Plata-Rueda et al., 2019b) e causarem efeitos colaterais na orientação olfatória e caminamento prejudicando o reconhecimento do hospedeiro e limitando a taxa de parasitismo (Erb et al., 2001).

A sobrevivência de *T. howardi* obtidos de hospedeiros suscetíveis e resistentes ao *Bt* diminuiu ao longo de gerações, provavelmente por causa da baixa qualidade nutricional (Hilbeck, 2001) e morte prematura do hospedeiro (Mohan et al., 2008). A qualidade do hospedeiro altera o desenvolvimento do imaturo, a capacidade de parasitismo, a fecundidade, longevidade e razão sexual dos descendentes (Farahani et al., 2016; Liu et al., 2013). Efeitos prejudiciais do *Bt* foram relatados para o parasitoide *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) (Vojtech et al., 2005; Ramirez-Romero et al., 2007) após exposição à toxina via hospedeiro alimentado com milho *Bt*.

Impactos negativos nos parâmetros reprodutivos, período de desenvolvimento, razão sexual e número de parasitoides emergidos de pupas de *S. frugiperda* tratadas com *Bt* (suscetíveis e resistentes) em relação ao controle se deve aos efeitos negativos da toxina sobre o hospedeiro (Groot e Dicke, 2003) e, conseqüentemente, o parasitoide que, em sua fase imatura, tem o hospedeiro como única fonte de alimento (Farahani et al., 2016). A redução do parasitismo (Amaro et al., 2018), da sobrevivência (Blumberg et al., 1997), sobrevivência larval e fecundidade e aumento do período de desenvolvimento tem sido relatados para parasitoides após em hospedeiros expostos ao *Bt* (Ramirez-Romero et al., 2007). Efeitos indiretos nas gerações de *T. howardi* causados pelo *Bt* se devem à redução da qualidade do hospedeiro por essa bactéria. A qualidade do hospedeiro é um dos principais fatores que afetam a proporção entre os filhos (Ueno, 2015), mas a maioria dos parasitoides tem um sistema de determinação do sexo haplodiploide, onde a fêmea controla o sexo dos seus descendentes (Beukeboom e Van de Zande, 2010). A redução na razão sexual de *T. howardi*, emergido de hospedeiros suscetíveis ou resistentes a *Bt* pode ser devido à baixa qualidade nutricional da *S. frugiperda* reduzindo a produção espermática e causando esterilidade masculina, como observado para *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) exposto a outros inseticidas (Rabeling e Kronauer, 2013; Alcántara-de La Cruz et al., 2017).

Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-1, reduziram a produção de imaturos e o desempenho reprodutivo ao longo das gerações do *T. howardi*. Esse bioinseticida afeta o estabelecimento e a taxa de parasitismo do *T. howardi* devido a efeitos sobre parâmetros comportamentais e reprodutivos deste inimigo natural.

5 Referências

- Alcántara-de La Cruz, R., Zanuncio, J.C., Lacerda, M.C., Wilcken, C.F., Fernandes, F.L., Tavares, W.S., Soares, M.A., Sediya, C.S. 2017. Side-effects of pesticides on the generalist endoparasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Scientific Reports* 7: 10064.
- Amaro, J.T., Bueno, A.F., Neves, P.M.O.J., Silva, D.M., Pomari-Fernandes, A. Favetti, B.M. 2018. Selectivity of different biological products to the egg parasitoid *Telenomus remus* (Hymenoptera: Platygasteridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 62(3): 195–197.
- Baranek, J., Konecka, E., Kaznowski, A. 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *BioControl* 62(5): 649–658.
- Barrat, B.I.P., Howarth, F.G., Withers, T.M., Kean, J.M., Ridley, G.S. 2010. Progress in risk assessment for classical biological control. *Biological Control* 52(3): 245–254.
- Bernal, J.S., Griset, J.G., Gillogly, P.O. 2002. Impacts of developing on *Bt* maize-intoxicated hosts on Witness parameter of a stem borer parasitoid. *Journal of Entomological Science* 37(1): 27–40.
- Beukeboom, L.W., Van de Zande, L. 2010. Genetics of sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Genetics* 89(3): 333–339.
- Blumberg, D., Navon, A., Goldenberg, S.K.S., Ferkovich, S.M. 1997. Interactions among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* 90(5): 1181–1186.
- Bopape, M.J., Nofemela, R.S., Mosiane, M.S., Modise D.M. 2014. Effects of a selective and a broad-spectrum insecticide on parasitism rates of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and species richness of its primary parasitoids. *African Entomology* 22(1): 115–126.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41(7): 423–431.
- Carrière, Y., Crowder, D.W., Tabashnik, B.E. 2010. Evolutionary ecology of insect adaptation to *Bt* crops. *Evolutionary Applications* 3(5-6): 561–573.
- Castro, B.M.D.C., Martinez, L.C., Barbosa, S.G., Serrão, J.E., Wilcken, C. F., Soares, M. A., Silva, A.A.D., Carvalho, A.G.D., Zanuncio, J.C. 2019. Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientific Reports* 9: 6667.

- Costa, D.P., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Rossoni, C., Favero, K., Barbosa, R.H. 2014. Reprodução de *Tetrastichus howardi* em pupas de *Diatraea saccharalis* de diferentes idades. *Revista de Ciências Agrárias* 57(1): 67–71.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81–106.
- Dias-Pini, N.S., DaSilva, C.S.B., Penafior, M.F.G.V., Parra, J.R.P. 2014. Does host determine short-range flight capacity of trichogrammatids? *Journal of Applied Entomology* 138(1): 677–682.
- Erb, S.L., Bouchier, R.S., van Frankenhuyzen, K., Smith, S.M. 2001. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). *Environmental Entomology* 30(6): 1174–1181.
- Farahani, H.K., Ashouri, A., Zibae, A., Abroon, P., Alford, L. 2016. The effect of host nutritional quality on multiple components of *Trichogramma brassicae* fitness. *Bulletin of Entomological Research* 106(5): 633–641.
- Fiaz, 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: 237–345.
- Finney, D.J. 1964. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gómez, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Matus, V., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A. 2014. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochemical Journal* 459(2): 383–396.
- González-Cabrera, J., Farinós, G.P., Caccia, S., Díaz-Mendoza, M., Castanera, P., Leonardi, M.G., Giordana, B., Ferré, J. 2006. Toxicity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Applied and Environmental Microbiology* 72(4): 2594–2600.
- Gore, J., Adamczyk Jr, J.J., Blanco, C.A. 2005. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. *Journal of Economic Entomology* 98(1): 88–94.
- Groot, A.T., Dicke, M. 2003. Insect-resistant transgenic plants in a multitrophic context. *Plant Journal* 31(4): 387–406.
- Hilbeck, A., 2001. Implications of transgenic, insecticidal plants for insect and plant biodiversity. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 4(1): 43–61.
- Khorramnejad, A., Talaei-Hassanloui, R., Hosseininaveh, V., Bel, Y., Escriche, B. 2019. Characterization of new *Bacillus thuringiensis* strains from Iran, based on cytotoxic

- and insecticidal activity, proteomic analysis and gene content. *BioControl* 63(6): 807–818.
- La Salle, J., Polaszek, A. 2007. Afrotropical species of the *Tetrastichus howardi* species group (Hymenoptera: Eulophidae). *African Entomology* 15(1): 45–56.
- Liu, X.X., Sun, C.G., Zhang, Q.W. 2005. Effects of transgenic Cry1A+CPTI cotton and Cry1Ac toxin on the parasitoid, *Campoletis chlorideae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect Science* 12(2): 101–108.
- Liu, Y.H., Li, B., Xu, Z. 2013. Effect of host instar and temperature on fitness-related traits in the solitary endoparasitoid, *Meteorus pulchricornis*. *Phytoparasitica* 41(1): 1–7.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Colares, H.C., Campos, J.M., Dos Santos, M.H., Fernandes, F.L., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2018b. Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Bulletin of Entomological Research* 108(6): 716–725.
- Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., da Silva Neves, G., Gonçalves, W.G., Zanuncio, J.C., Bozdoğan, H., Serrão, J.E. 2018a. Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Chemosphere* 212: 629–637.
- Mohan, M., Sushil, S.N., Bhatt, J.C., Gujar, G.T., Gupta, H.S. 2008. Synergistic interaction between sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* and *Campoletis chlorideae* in managing *Helicoverpa armigera*. *BioControl* 53(2): 375–386.
- Nicholson, G.M. 2007. Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* 49(4): 413–422.
- 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.
- Oliveira, H.N., Simonato, J., Glaeser, D.F., Pereira, F.F. 2016. Parasitismo of *Helicoverpa armigera* pupae (Lepidoptera: Noctuidae) by *Tetrastichus howardi* and *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae). *Semina: Ciências Agrárias* 37(1): 111–115.
- Originlab Corporation, 2013. OriginPro v. 9.0.0 SR2 b87. Originlab Corporation. Originlab Corporation, Northampton, MA. (<http://www.OriginLab.com>).
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6(12): 3296–3325.
- Pedlowski, A.M., Canela, M.C., Terra, M.A.C., Faria, R.M.R. 2012. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. *Crop Protection* 31(1): 113–118.

- Pereira, F.F., Kassab, S.O., Calado, V.R.F., Vargas, E.L., Oliveira, H.N., Zanuncio, J. C. 2015. Parasitism and emergence of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) on *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae, pupae and adults. *Florida Entomologist* 98(1): 377–379.
- Plata-Rueda, A., Campos, J.M., da Silva Rolim, G., Martínez, L.C., Dos Santos, M.H., Fernandes, F.L., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2018. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156: 263–270.
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Costa, N.C.R., Zanuncio, J.C., Sena Fernandes, M.E., Serrão, J.E., Guedes, R.N.C., Fernandes, F.L. 2019a. Chlorantraniliprole-mediated effects on survival, walking abilities, and respiration in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172: 53–58.
- Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., Da Silva, B.K.R., Zanuncio, J.C., Sena Fernandes, M.E., Serrão, J.E., Guedes, R.N.C., Fernandes, F.L. 2019b. Exposure to cyantraniliprole causes mortality and disturbs behavioral and respiratory response in the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Pest Management Science* 75: 1–9.
- Prasad, K.S., Aruna, A.S., Kumar, V., Kariappa, B.K. 2007. Feasibility of mass production of *Tetrastichus howardi* (Olliff), a parasitoid of leaf roller (*Diaphania pulverulentalis*), on *Musca domestica* (L.). *Indian Journal of Sericulture* 46(1): 89–91.
- Rabeling, C., Kronauer, D.J.C. 2013. Telytokous parthenogenesis in eusocial Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 58: 273–292.
- Ramirez-Romero, R., Bernal, J.S., Chaufaux, J., Kaiser, L. 2007. Impact assessment of *Bt*-maize on a moth parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), via host exposure to purified Cry1Ab protein or *Bt*-plants. *Crop Protection* 26(7): 953–962.
- Romeis, J., Meissle, M., Bigler, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24(1): 63–71.
- Rosas-Garcia, N.M. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. *Recent Patents on Biotechnology* 3(1): 28–36.
- Şahin, B., Gomis-Cebolla, J., Guneş, H., Ferré, J. 2018. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates by their insecticidal activity and their production of Cry and Vip3 proteins. *PLoS ONE* 13: e0206813.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9(3): 283–300.
- Sanchis, V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 31(1): 217–231.

- Santos-Amaya, O.F., Rodrigues, J.V.C., Souza, T.C., Tavares, C.S., Campos, S.O., Guedes, R.N.C., Pereira, E.J.G. 2015. Resistance to dual-gene *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports* 5: 18243.
- SAS Institute, 2002. The SAS System for Windows, release 9.0. SAS Institute, Cary, N.C. (<http://www.sas.com>).
- Schoenmaker, A., Cusson, M., van Frankenhuyzen, K. 2001. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and parasitoids of late-instar larvae of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Canadian Journal of Zoology* 79(9): 1697–1703.
- Silva-Torres, C.S.A., Pontes, I.V.A.F., Torres, J.B., Barros, R. 2010. New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. *Neotropical Entomology* 39(5): 835–838.
- Song, F., Swinton, S.M. 2009. Returns to integrated pest management research and outreach for soybean aphid. *Journal of Economic Entomology* 102(6): 2116–2125.
- Tabashnik, B.E., Zhang, M., Fabrick, J.A., Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhang, J., Yelich, A., Unnithan, G.C. 2015. Dual mode of action of *Bt* proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Scientific Reports* 5: 15107.
- Tiago, E.F., Pereira, F.F., Kassab, S.O., Barbosa, R.H., Cardoso, C.R.G., Zanuncio, J.C. 2018. Biological quality of *Tetrastichus howardi* (Hym.: Eulophidae) reared with *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae) pupae after storage at low temperatures for different periods. *PeerJ Preprints* 6: e26865v1.
- Torres, J.B., Barros, E.M., Coelho, R.C., Pimentel, R.M.M. 2010. Zoophytophagous pentatomids feeding on plants and implications for biological control. *Arthropod-Plant Interactions* 4(4): 219–227.
- Ueno, T. 2015. Effects of host size and laboratory rearing on offspring development and sex ratio in the solitary parasitoid *Agrothereutes lanceolatus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *European Journal of Entomology* 112(2): 281–287.
- Vargas, E.L., Pereira, F.F., Tavares, M.T., Pastori, P.L. 2011. Record of *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing *Diatraea* sp. (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane crop in Brazil. *Entomotropica* 26(3): 135–138.
- Vineela, V., Nataraj, T., Reddy, G., Devi, P.S.V. 2017. Enhanced bioefficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) through particle size reduction and formulation as a suspension concentrate. *Biocontrol Science and Technology* 27(1): 58–69.
- Vojtech, E., Meissle, M., Poppy, G. M. 2005. Effects of *Bt* maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Transgenic Research* 14(2): 133–144.

- Wright, M.S., Cornelius, M. 2012. Mortality and repellent effects of microbial pathogens on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). BMC Microbiology 12: 291.
- 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.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bacillus thuringiensis, var. *kurstaki*, linhagem HD-1, causa efeitos colaterais em *P. elaeisis* e *T. howardi*, causando uma redução na produção de imaturos e desempenho reprodutivo ao longo das gerações desses parasitoides. Esse bioinseticida pode afetar o estabelecimento e a taxa de parasitismo desses agentes de controle biológico.

Os resultados deste estudo são úteis para desenvolver estratégias de manejo integrado de pragas apropriadas para o emprego seguro dessa bactéria em campo, pois a exposição do hospedeiro ao *Bt* representa riscos no estabelecimento e desempenho desses inimigos naturais, devido a efeitos na reprodução e parâmetros comportamentais de *P. elaeisis* e *T. howardi*.