

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

JÉSSICA LETÍCIA ABREU MARTINS

FITOFAGIA EM CHRYSOPIDAE

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021

JÉSSICA LETÍCIA ABREU MARTINS

FITOFAGIA EM CHRYSOPIDAE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia para obtenção do título *Magister Scientiae*

Orientadora: Madelaine Venzon

Coorientadores: Fernando Hercos Valicente
Gustavo Júnior de Araújo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M386f
2021 Martins, Jéssica Leticia Abreu, 1995-
Fitofagia em Chrysopidae / Jéssica Leticia Abreu Martins. –
Viçosa, MG, 2021.
66 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Madelaine Venzon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Insetos fitófagos. 2. Chrysopidae. 3. Insetos predadores.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 632.74

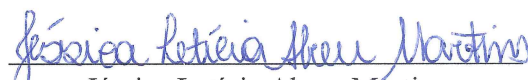
JÉSSICA LETÍCIA ABREU MARTINS

FITOFAGIA EM CHRYSOPIDAE


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia para obtenção do título *Magister Scientiae*

APROVADA: 26 de fevereiro de 2021.

Assentimento:


Jéssica Letícia Abreu Martins

Autora


Madelaine Venzon
Orientadora

Aos meus pais Mauro e Simone, dedico

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado a vida e com ela a oportunidade de viver os meus sonhos da melhor maneira possível. Sou extremamente grata aos meus pais, Mauro e Simone, por acreditarem em meu potencial e fazerem de tudo para me auxiliar a alcançar os meus objetivos. O amor e dedicação por vocês dispensado é único, e eu não seria absolutamente nada sem vocês. Agradeço também a minha irmã Larissa por sempre me apoiar em minhas decisões e à minha avó Inhá pelo amor incondicional.

Ao meu companheiro Vinícius, sou grata por estar ao meu lado neste árduo caminho em busca do conhecimento, e por fazer dos meus sonhos os dele. Aos meus amigos da Embrapa Milho e Sorgo, em especial Karine e Tatiane, por todo o apoio presencial e à distância ao longo não só da graduação mas também do meu mestrado.

Sou extremamente grata ao meu co-orientador Dr. Fernando Valicente por sempre confiar em mim, por acatar todas as minhas ideias com muito entusiasmo e pelas inúmeras oportunidades de mostrar o meu valor como cientista. Sem o seu apoio a minha jornada acadêmica jamais seria a mesma.

Ao meu co-orientador e amigo Gustavo Araújo, que ao longo destes anos sempre se mostrou disposto a me ajudar e contribuir para a minha formação profissional. Sou grata também pela paciência em me ajudar a entender que todos os processos pelos quais passamos na vida são necessários e únicos.

À minha orientadora Madelaine Venzon por todo apoio emocional e intelectual a mim oferecidos. Agradeço por ser um exemplo de profissional emponderada e com uma ética impecável e, especialmente, por me aceitar como sua orientada. A sua postura, seus princípios como pesquisadora e a garra com que você defende seus posicionamentos me inspiram muito.

Agradeço também ao professor Marcelo Picanço por todas as oportunidades de crescimento profissional a mim ofertadas ao longo do meu mestrado.

Aos meus amigos de Viçosa, Daiane, Carolina, Júlia, Thayna, Carlos, Otávio e Jose, que se tornaram minhas pessoas favoritas nesta etapa da minha vida, agradeço por compartilharem comigo experiências de grande valor, e por serem abrigo nos melhores e piores momentos. Às minhas colegas de república Bruna e Fernanda pelo companheirismo e alegria contagiantes.

Agradeço também a todos os colegas do Laboratório de Controle Biológico da EPAMIG Sudeste, em especial à Mayara que, desde a graduação, sempre me incentivou a

nunca desistir dos meus objetivos. Aos funcionários da mesma instituição, sou grata por toda a atenção a mim, e pelo profissionalismo sempre presente.

Aos meus amigos Roger, Rafael, Julie, Gilma, Caren, Fernanda, Pedro, Júlia, Luciane, Cleidiane e Cassia, por me fazerem ter certeza de que a distância não compromete boas amizades.

Aos amigos do grupo de estudos Insectum sou grata por me permitir conhecer pessoas incríveis, que acreditam que a ciência deve ser compartilhada de maneira acessível a todos os que a ela buscam.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Sem a contribuição de todos aqui mencionados, acredito que não seria possível ter chegado até aqui. A todos vocês, muito obrigada!

“Não tenho medo de errar, só medo de desistir, mas tenho vinte e poucos anos e não vou
parar aqui”

Zani

BIOGRAFIA

JÉSSICA LETÍCIA ABREU MARTINS, filha de Mauro Moisés Martins e Simone Nazaré Abreu Teixeira Martins, nasceu em Sete Lagoas – MG, no dia 6 de setembro de 1995. Em 2014 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de São João del Rei, graduando-se em janeiro de 2019. Durante a graduação, foi estagiária na Embrapa Milho e Sorgo, no Laboratório de Controle Biológico, sob orientação do Doutor Fernando Hercos Valicente. Em março de 2019 ingressou no mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, onde foi orientada pela Doutora Madelaine Venzon.

RESUMO

MARTINS, Jéssica Letícia Abreu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. **Fitofagia em Chrysopidae**. Orientadora: Madelaine Venzon. Coorientadores: Fernando Hercos Valicente e Gustavo Júnior de Araújo.

O controle biológico é uma das alternativas mais sustentáveis de manejo de pragas. No qual se usa um organismo vivo para controle de outro organismo que tenha o status de praga. Dentre os agentes de controle biológico, temos os predadores, que utilizam como fonte de alimentação tanto as presas quanto os recursos alternativos oferecidos pelas plantas, como o pólen e o néctar. As espécies de plantas espontâneas *Ageratum conyzoides*, *Bidens pilosa* e *Sonchus oleraceus* são ricas nestes recursos alternativos e podem coexistir com plantas cultivadas de bastante expressão, como o milho e a soja. Estas culturas passaram por programas de melhoramento genético, surgindo plantas transgênicas que está relacionada a defesa das plantas contra o ataque de pragas, mais especialmente os insetos. Esta estratégia de defesa é majoritariamente explorada com a inserção de genes de bactérias entomopatogênicas como *Bacillus thuringiensis* com altas concentrações de proteínas Cry tóxicas aos insetos. Neste contexto, avaliamos a sobrevivência de um predador da família Chrysopidae, a espécie *Ceraeochrysa cubana*, que possui uma fase larval bastante voraz e onívora, com adultos que necessitam de aporte nutricional oferecido pelo pólen e néctar de plantas, além de testarmos a hipótese que sugere a efetiva alimentação da espécie via tecido foliar. Assim, nossos experimentos visaram compreender: i) sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas com plantas espontâneas com e sem recursos florais, ii) sobrevivência da adultos de *C. cubana* alimentados com plantas espontâneas com e sem recursos florais, iii) sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas apenas com recursos foliares de *A. conyzoides*, iv) entomofauna associada a plantas de *A. conizoydes*, v) sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas com plantas convencionais e transgênicas de milho e soja e vi) a presença de proteínas Cry 1Ac e Cry 2Ab em larvas de *C. cubana* após se alimentaram com plantas convencionais e transgênicas de milho e soja. Nossos resultados demonstram que as larvas de *C. cubana* sobrevivem quando alimentadas com flores de *B. pilosa* e *S. oleraceus*, além de se desenvolverem apenas com recursos foliares de *A. conizoydes*. Em relação aos adultos, as espécies de plantas selecionadas não forneceram aporte nutricional de qualidade necessária para o desenvolvimento dos mesmos. Além disso, *A. conyzoides* abrigou presas comumente utilizadas na alimentação do predador *C. cubana*. Em relação à alimentação por plantas

transgênicas, corroboramos a hipótese de que as larvas de *C. cubana* efetivamente se alimentam de tecido foliar, verificada pela presença de proteínas Cry 1Ac e Cry 2Ab nas larvas. Além disso, não observamos diferença na sobrevivência entre as larvas que se alimentaram de plantas transgênicas com aquelas que consumiram plantas convencionais. No entanto, houve diferença na sobrevivência de insetos que tinham como recurso as folhas das plantas de milho e soja em relação ao controle negativo (i. e água). Este trabalho contribui para o entendimento do comportamento alimentar de *C. cubana*, tanto na sua fase adulta quanto na fase jovem, e comprova a alimentação via conteúdo celular do tecido foliar utilizada por esta espécie na ausência de suas presas principais.

Palavras-chave: Fitofagia. Chrysopidae. Predador.

ABSTRACT

MARTINS, Jéssica Letícia Abreu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February-, 2021. **Phytophagy in Chrysopidae**. Adviser: Madelaine Venzon. Co-advisers: Fernando Hercos Valicente and Gustavo Júnior de Araújo.

Biological control is one of the most sustainable alternatives for pest management, in which is used a living organism to control another pest status organism. Predators are biological control agents that feed on both prey and alternative resources offered by plants, such as pollen and nectar. The spontaneous plant species *Ageratum conizoydes*, *Bidens pilosa* and *Sonchus oleraceus* are rich in these alternative resources and can coexist with cultivated plants of great expression, such as corn and soy. These crops have undergone genetic improvement programs, with the emergence of transgenic plants. This defense strategy is mostly explored with the insertion of genes from an entomopathogenic bacteria such as *Bacillus thuringiensis* with Cry proteins. In this context, we evaluated the survival of a Chrysopidae predator, *Ceraeochrysa cubana*. The larva of this species is omnivorous and voracious, and the adults need nutritional support offered by pollen and plant nectar. Thus, our experiments aim to understand: i) survival of *C. cubana* larvae fed with spontaneous plants with and without floral resources, ii) survival of *C. cubana* adults fed with spontaneous plants with and without floral resources, iii) survival of *C. cubana* larvae fed only with *A. conizoydes* leaf resources, iv) entomofauna associated with *A. conizoydes* plants, v) survival of *C. cubana* larvae fed with conventional and transgenic corn and soybean plants and vi) the presence of proteins Cry 1Ac and Cry 2Ab in *C. cubana* larvae after fed with conventional and transgenic corn and soybean plants. Our results demonstrate that *C. cubana* larvae survive longer when fed with flowers of *B. pilosa* and *S. oleraceus*, in addition to developing only with *A. conizoydes* leaf resources. The selected plant species did not provide the nutritional support of the necessary quality for the development of adults but *A. conizoydes* was able to house prey commonly used as *C. cubana* food source. Regarding the feeding by transgenic plants, we corroborate to the hypothesis that the larvae of *C. cubana* effectively feed on leaf tissue, verified by the presence of proteins Cry 1Ac and Cry 2Ab in the dead larvae. We observed no difference in survival between the larvae that fed on transgenic plants and those that consumed conventional plants. However, there was a difference in the survival of insects using the leaves of the corn and soybean plants as compared to the negative control (i.e., water). This work contributes to the understanding of the feeding behavior of *C. cubana*, both

in its adult and larvae stages, in addition to proving the feeding via cell content of the leaf tissue used by this species in the absence of its main prey.

Keywords: Phytophagy. Chrysopidae. Predator.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	14
CAPÍTULO 1	
Sobrevivência de <i>Ceraeochrysa cubana</i> em recursos fornecidos por plantas espontâneas...	18
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Criação de <i>Ceraeochrysa cubana</i>	22
2.2 Plantas espontâneas	24
2.3 Sobrevivência de larvas de <i>C. cubana</i> em plantas espontâneas com e sem flores	24
2.4 Sobrevivência de adultos de <i>C. cubana</i> em plantas espontâneas com e sem flores	25
2.5 Sobrevivência de larvas de <i>C. cubana</i> em plântulas de mentrasto	25
2.6 Entomofauna associada às plantas de mentrasto.....	26
2.7 Análise estatística	27
3. RESULTADOS	28
3.1 Sobrevivência de larvas de <i>C. cubana</i> em plantas de mentrasto com e sem flores	28
3.2 Sobrevivência de larvas de <i>C. cubana</i> em plantas de serralha com e sem flores	30
3.3 Sobrevivência de larvas de <i>C. cubana</i> em plantas de picão com e sem flores	32
3.4 Sobrevivência de adultos de <i>C. cubana</i> em plantas espontâneas com e sem flores	34
3.5 Sobrevivência de larvas de <i>C. cubana</i> com plantas de mentrasto sem flores após remoção de possíveis fontes de alimento	36
3.6 Entomofauna associada às plantas de mentrasto.....	38
4. DISCUSSÃO	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPÍTULO 2.....	47

Sobrevivência de larvas de <i>Ceraeochrysa cubana</i> alimentadas com conteúdo celular de tecido foliar de plantas de milho e soja convencionais e transgênicos	45
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 Cultivo das plantas	49
2.2 Criação de <i>C. cubana</i>	52
2.3 Sobrevivência de <i>C. cubana</i> em milho e soja convencionais e transgênicos.....	53
2.4 Identificação de proteína Cry em soja e milho transgênicos	54
2.5 Análise estatística	55
3. RESULTADOS.....	55
3.1 Sobrevivência de larvas de <i>C. cubana</i> alimentadas com milho e soja convencionais e transgênicos	54
3.2 Presença de proteínas Cry1Ac em larvas de <i>C. cubana</i> alimentadas com soja transgênica	58
3.3 Quantificação de proteínas Cry2Ab em larvas de <i>C. cubana</i> alimentadas com milho transgênico	59
4. DISCUSSÃO	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CONCLUSÕES GERAIS	65

INTRODUÇÃO GERAL

O controle de pragas na agricultura sempre foi alvo de estudos, e a busca por alternativas que sejam sustentáveis e não prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente ganham espaço continuamente. Dentre as estratégias utilizadas neste contexto, o controle biológico conservativo é aquela que busca prover, por meio da manipulação da paisagem, recursos nutricionais, abrigo e microclimas atrativos para a manutenção de insetos que desempenham importantes serviços ecossistêmicos (YU; LI; WU, 2011; LANDIS, 2017). Uma das formas de favorecer a atração e permanência de insetos benéficos é realizar a manutenção de plantas espontâneas em campo, uma vez que estas oferecem recursos alternativos como pólen, néctar, presas e hospedeiros alternativos que são importantes fontes alimentares para insetos predadores (GONTIJO, 2019; POLLIER et al., 2018).

Os insetos predadores podem ser favorecidos pela diversificação vegetal promovida pelo controle biológico conservativo, pois eles encontram nas plantas associadas alimentos que podem ser consumidos diante da escassez de presas, além de abrigo contra seus próprios inimigos naturais e microclimas favoráveis ao seu desenvolvimento (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000; GONTIJO, 2019). Estes insetos se alimentam de recursos florais de muitas espécies vegetais, sejam elas cultivadas ou espontâneas. Em um agroecossistema com a paisagem diversificada, nós encontramos muitas espécies vegetais e de artrópodes que convivem no mesmo ambiente. Além dos predadores anteriormente citados, também é comum encontrar populações de insetos pragas que necessitam ser mantidas abaixo do nível de dano econômico, e para tal, faz-se necessário selecionar as melhores estratégias de controle que sejam eficientes e específicas para as pragas-alvo (ANDOW; HILBECK, 2004; YU; LI; WU, 2011).

Dentre as estratégias de controle de insetos-praga, uma das tecnologias utilizadas é a transgenia. Esta alternativa utiliza a inserção de genes inseticidas no material genético da planta de interesse, fazendo com que ela se torne resistente ao ataque dos insetos praga. De modo geral, esta tecnologia apresenta alta especificidade de ação sobre os insetos de interesse, ou seja, aqueles que causam danos à planta (BETZ; HAMMOND; FUCHS, 2000; NARANJO, 2009). No entanto, muitos estudos sobre a amplitude do aspecto de ação desses transgênicos são realizados, de modo a se compreender as rotas de absorção de proteínas pelos insetos considerados benéficos (i.e predadores) e que ocasionalmente se alimentam dos recursos oferecidos por essas espécies geneticamente modificadas. (LY et al., 2014; FREDERICI, 2016)

Uma das preocupações constantes quanto ao uso da transgenia está relacionada aos insetos não-alvo (NARANJO; HEAD; DIVELY, 2005, CARSTENS et al., 2014). De modo geral, os estudos afirmam sobre a segurança de implementação desta estratégia com relação ao seu espectro de ação, o qual não afeta negativamente os organismos que prestam serviços ecossistêmicos importantes, como por exemplo, o de predação (GUO et al., 2020; LIU et al., 2021). Os insetos predadores, por sua vez, podem ingerir as proteínas inseticidas por meio de alimentação direta via pólen e néctar ou por vias indiretas, com a predação de herbívoros alimentados com recursos de plantas transgênicas (LI et al., 2014). Considerando a busca constante do controle biológico conservativo em atrair e manter os insetos predadores em campo, é desejável que ambas as estratégias de controle de pragas – transgenia e controle biológico conservativo – possam coexistir.

Tendo em vista a importância dos insetos predadores nos agroecossistemas, elencamos a espécie *Ceraeochrysa cubana*, um predador potencial para o controle de pragas, como modelo de estudo dos efeitos do uso simultâneo do controle biológico conservativo e da transgenia. Este, por sua vez, utiliza recursos florais de diversas plantas, sejam elas espontâneas ou cultivadas, como fonte de nutrição complementar para o fornecimento de energia (BORTOLI et al., 2006). No entanto, a alimentação desta espécie utilizando outros recursos vegetais como folhas, ainda não foi comprovada. Nesta dissertação, buscamos compreender o efeito da fitofagia em Chrysopidae para a sua sobrevivência. Como fonte de recursos, nós testamos os recursos florais de mentrasto (*Ageratum conyzoides*), picão (*Bidens pilosa*) e serralha (*Sonchus oleraceus*) e também testamos a hipótese de consumo de conteúdo celular de tecido foliar destas espécies por parte das larvas de *C. cubana*. Além disso, nós selecionamos duas espécies cultivadas de grande expressão no Brasil, a soja (*Glycine max*) e o milho (*Zea mays*), ambos com cultivares transgênicas, com intuito de avaliarmos a possível interferência das proteínas Cry encontradas nestas espécies na sobrevivência de larvas de *C. cubana*, após consumirem essas plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOW, D. A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, v. 54, n. 7, p. 637–649, 2004.

BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 156–173, 2000.

BORTOLI, S. A. DE et al. Desenvolvimento e Capacidade Predatória de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera : Chrysopidae) em Diferentes Presas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 145–152, 2006.

CARSTENS, K. et al. Surrogate species selection for assessing potential adverse environmental impacts of genetically engineered insect-resistant plants on non-target organisms. **GM crops & food**, v. 5, n. 1, p. 11–15, 2014.

GONTIJO, L. M. Engineering natural enemy shelters to enhance conservation biological control in field crops. **Biological Control**, v. 130, p. 155–163, 2019.

GUO, M. et al. Safety assessment of transgenic Cry2Aa rice to a generalist predator, *Paederus fuscipes* curtis (Coleoptera: Staphylinidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, n. May, p. 110719, 2020.

LANDIS, D. A. Designing agricultural landscapes for biodiversity-based ecosystem services. **Basic and Applied Ecology**, v. 18, p. 1–12, 2017.

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. HABITAT MANAGEMENT TO CONSERVE NATURAL ENEMIES OF ARTHROPOD PESTS. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 175–201, 2000.

LI, Y. et al. Bt rice producing Cry1C protein does not have direct detrimental effects on the green lacewing *Chrysoperla sinica* (Tjeder). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1391–1397, 2014.

LIU, F. et al. Transgenic Cry1Ac/CpTI cotton assessment finds no detrimental effects on the insect predator *Chrysoperla sinica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111680, 2021.

NARANJO, S. E. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. June 2009, p. 1–23, 2009.

NARANJO, S. E.; HEAD, G.; DIVELY, G. P. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: Introduction. **Environmental Entomology**, v. 34, n. 5, p. 1178–1180, 2005.

POLLIER, A. et al. Effects of spontaneous field margin vegetation on the regulation of herbivores in two winter crops. **Basic and Applied Ecology**, v. 27, p. 71–82, 2018.

RAYBOULD, A.; QUEMADA, H. Bt crops and food security in developing countries: Realised benefits, sustainable use and lowering barriers to adoption. **Food Security**, v. 2, n. 3, p. 247–259, 2010.

YU, H. L.; LI, Y. H.; WU, K. M. Risk Assessment and Ecological Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Crops on Non-Target Organisms. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 7, p. 520–538, 2011.

CAPÍTULO 1

Sobrevivência de *Ceraochrysa cubana* em recursos fornecidos por plantas espontâneas

RESUMO: A diversificação vegetal em agrossistemas é uma estratégia utilizada no controle biológico conservativo. Essa consiste na manutenção ou inserção de espécies vegetais atrativas para inimigos naturais, os quais podem usufruir de recursos alimentares ou até mesmo do refúgio oferecido pelas plantas. O manejo de plantas espontâneas é uma alternativa que propicia a oferta de recursos nutricionais como pólen e néctar, abrigo para presas alternativas e formação de microclimas no ambiente agrícola. Todas estas características favorecem a atração e manutenção de inimigos naturais como os insetos predadores, que oferecem como principal serviço ecossistêmico a redução de populações de insetos praga no ambiente. Neste trabalho, nós avaliamos o papel de três espécies de plantas espontâneas, *Ageratum conyzoides* (mentrasto), *Bidens pilosa* (picão) e *Sonchus oleraceus* (serralha), na sobrevivência de larvas e adultos do predador *Ceraeochrysa cubana* (Chrysopidae). As plantas espontâneas foram oferecidas com e sem as inflorescências. As larvas avaliadas conseguiram sobreviver utilizando apenas os recursos vegetais de mentrasto, picão e serralha como fonte de alimento, embora os adultos da espécie não tenham demonstrado o mesmo comportamento. Além disso, encontramos resultados que sugerem a alimentação direta de larvas de *C. cubana* em tecido vegetal de *A. conyzoides*, um comportamento até então não comprovado. Nossos resultados sugerem que a manutenção das plantas espontâneas mencionadas neste trabalho pode favorecer a sobrevivência de *C. cubana* em período de escassez de presas.

CHAPTER 1

Survival of *Ceraochrysa cubana* in resources provided by spontaneous plants

ABSTRACT: Plant diversification in agrosystems is a strategy used in conservation biological control. It consists of the maintenance or insertion of plant species attractive to natural enemies. The enemies can take advantage of food resources or refuge offered by these plants. The management of spontaneous plants is an alternative that provides the supply of nutritional resources such as pollen and nectar, shelter for alternative prey and formation of microclimates in the agricultural environment. All these characteristics benefits the attraction and maintenance of natural enemies such as predatory insects, which offer the reduction of pests insect populations in the environment as a main ecosystem service. In this work, we evaluated the role of three species of spontaneous plants, *Ageratum conyzoides*, *Bidens pilosa* and *Sonchus oleraceus*, in the survival of larvae and adults of the predator *Ceraeochrysa cubana* (Chrysopidae). Spontaneous plants were offered with and without inflorescences. The evaluated larvae survived using only the plant resources of mints, mincemeat and milkweed as a food source, although adults of this species did not demonstrate the same behavior. In addition, we also found results that suggest the direct feeding of *C. cubana* larvae in *A. conyzoides* plant tissue, a behavior not previously proven. Our results suggest that the maintenance of spontaneous plants mentioned in this work may favor the survival of *C. cubana* in a period of prey scarcity.

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos é uma das estratégias mais comuns no controle de insetos pragas nos cultivos (NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016; SIVITER, 2020). Entretanto, os efeitos nocivos desses produtos não se restringem apenas às espécies-alvos (FOSTER; MOURATO, 2000; GODFRAY et al., 2017; WILSON; TISDELL, 2001). Todos os anos, os desserviços ecossistêmicos causados pela extinção local de espécies pelo uso intensivo de pesticidas acarretam prejuízos econômicos à agricultura em virtude da redução ou até mesmo a perda da biodiversidade local (CHAPIN et al., 2000). Impactos do uso indiscriminado desse método de controle também são sentidos na saúde humana, pois esses produtos podem causar intoxicações severas (ECOBICHON, 2001). Além disso, o uso constante de agrotóxicos promove a seleção de indivíduos resistentes aos seus efeitos, sendo necessário o constante desenvolvimento de novas substâncias para o combate dessas pragas (BALABANIDOU; GRIGORAKI; VONTAS, 2018; GUTIRREZ-MORENO et al., 2019)

Em busca de métodos menos agressivos e manutenção contínua no controle de pragas, o controle biológico é um dos métodos mais promissores. Este consiste, em termos gerais, no uso de espécies consideradas benéficas para a redução da população de um organismo com status de praga (VAN LENTEREN et al., 2018). Dentre as estratégias de controle biológico, o controle biológico conservativo tem se mostrado uma técnica promissora (BAKER; GREEN; LOKER, 2020). Essa estratégia visa a conservação e ao aumento das populações de inimigos naturais já existentes nas áreas, através da manipulação do habitat para o fornecimento de recursos a esses organismos (LANDIS et al., 2000; VENZON et al. 2019; GONTIJO, 2019). Isso pode ser obtido através da diversificação da vegetação nas áreas cultivadas, com a inserção ou manutenção de plantas que ofereçam alimento e abrigo para os inimigos naturais (JONSSON et al., 2008). A manutenção de plantas espontâneas em campo é uma estratégia a ser considerada (BEGG et al., 2017; VENZON et al. 2019). Os recursos providos pelas flores dessas plantas (pólen e néctar) são capazes de aumentar a longevidade e fecundidade dos inimigos naturais (LEE; HEIMPEL, 2008; AMARAL et. al, 2013; VAN RIJN; WÄCKERS, 2016; FONSECA et. al, 2017). Além de alimento, a diversificação vegetal dos cultivos aumenta a disponibilidade de abrigos, atrai presas alternativas e reduz as variações climáticas provocadas pelas adversidades ambientais (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000; GONTIJO, 2019). A combinação desses fatores resulta em uma maior diversidade e abundância de organismos, uma vez que a oferta de recursos nutricionais atrai presas alternativas que buscam alimentos alternativos à cultura principal e são consumidos por predadores que as utilizam como fonte principal de alimento (GURR; WRATTEN; LUNA, 2003).

Espécies predadores de artrópodes-pragas comumente acrescentam outras fontes alimentares as suas dietas, como os recursos provenientes de plantas (pólen, néctar e conteúdo celular do tecido foliar) (COLL, 1996; COLL; IZRAYLEVICH, 1997; ROBINSON et al., 2008). Esse incremento nas opções de recursos alimentares é vantajoso aos predadores, podendo favorecer a sua sobrevivência quando suas presas estão escassas. Como exemplos desse grupo, estão os insetos do gênero *Podisus* (Heteroptera: Pentatomidae) (LE MOS et al., 2010; MATOS NETO et al., 2002), representantes de Miridae (Hemiptera: Heteroptera) (FERREIRA; SILVA; COELHO, 2001; MOHD; FAUZIAH; I. & WAN MOHAMAD, 2009), Coccinelidae (AMARAL et al., 2013; FONSECA, 2017), Anthocoridae (SUALICH; MUSSOLIN, 2009) e crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae).

Com 1416 espécies descritas (OSWALD, 2017), os crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae) apresentam grande importância no controle de pragas, isso porque suas larvas são predadoras sendo esse comportamento também reportado para adultos de algumas espécies (BROOKS; BARNARD, 1990). Dada essa característica, diversas espécies de crisopídeos são potenciais para utilização no controle biológico em cultivos agrícolas (BOREGAS; CARVALHO; SOUZA, 2003; DUELLI, 2001; PAPPAS; BROUFAS; KOVEOS, 2011). Algumas espécies de crisopídeos do gênero *Ceraeochrysa* destacam-se pela sua abundância nos agroecossistemas e com potencial de uso como agentes de controle biológico, como *Ceraeochrysa cubana* (Hagen) (ALBUQUERQUE; TAUBER; TAUBER, 2001). A ampla gama de presas utilizadas por larvas de *C. cubana* (i.e. afídeos, ovos de Lepidoptera, cochonilhas, ácaros e larvas de insetos das mais variadas ordens) torna *C. cubana* potencial predador a ser considerado em programas de controle biológico de pragas (VENZON; CARVALHO, 1993; DUELLI, 2001; BORTOLI et al., 2006; TAUBER; TAUBER; ALBUQUERQUE, 2009)

O comportamento predatório na fase larval dos crisopídeos é facilitado pela morfologia do seu aparelho bucal, composto por maxilas alongadas e com ponto de interligação em forma de tubo, dando origem a um aparato especializado em romper e posteriormente absorver os fluidos das presas (CANARD, 2001). Essa conformação do aparelho bucal também permite as larvas pinçarem o tecido foliar de plantas, e possivelmente, utilizá-los como fonte de alimento, embora isso não tenha sido estudado detalhadamente (LIMBURG; ROSENHEIM, 2001). Essas características morfológicas lhes permitem explorar uma ampla variedade de recursos alimentares, podendo essa ser uma vantagem competitiva em agrossistemas altamente mutáveis em relação à disponibilidade de presas (LIMBURG; ROSENHEIM, 2001). Dessa forma, além de presas e recursos florais (pólen e

néctar), há indícios de que larvas de *C. cubana* são capazes de se alimentarem do conteúdo celular dos tecidos da planta em situações de ausência de presas (COSTA et al., 2017).

Apesar das observações sobre o hábito “fitófago” de larvas de crisópideos (LIMBURG; ROSENHEIM, 2001; COSTA et al., 2017; DIAZ, 2014) pouco se sabe sobre a capacidade de sobrevivência desses organismos quando alimentados apenas com recurso derivado da planta. Para investigar o potencial de plantas espontâneas como fonte de recurso alimentar para crisópideos, neste trabalho nós avaliamos a sobrevivência de *C. cubana* na presença das plantas espontâneas *Ageratum conyzoides*, *Bidens pilosa* e *Sonchus oleraceus*, com e sem flores. Posteriormente, nós avaliamos quais as possíveis fontes de alimento que essas plantas poderiam estar fornecendo ao predador. Para isso, selecionamos uma das espécies onde houve sobrevivência de larvas na ausência de flores, como forma de confirmar que as larvas também utilizam o conteúdo celular dos tecidos vegetais foliares como fonte de alimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Criação de *C. cubana*

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma criação de *C. cubana* mantida no Laboratório de Controle Biológico da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, localizada em Viçosa (EPAMIG Sudeste). A manutenção da criação segue a metodologia de Venzon et al. (2006). Os adultos foram mantidos em gaiolas de cano PVC (8 x 11cm) recobertas por tecido de nylon, com a extremidade inferior apoiada em uma placa plástica de 15 cm de diâmetro. Os adultos foram alimentados com dieta composta de levedo e mel, na proporção 1:1 oferecidas em uma faixa de Parafilm. A oferta de água foi realizada em um pedaço de algodão inserido em um recipiente de vidro com volume de 10ml, e as fontes de água e alimento foram repostas 2 vezes por semana. A coleta dos ovos de *C. cubana* foi feita cortando-se os seus pedicelos e os mesmos eram transferidos para potes plásticos com ovos de *Anagasta kuehniella* como fonte de alimento para as larvas que emergissem. Durante todo o seu ciclo de vida, os insetos permaneceram em ambiente climatizado a 25°C, fotofase de 12/12h e umidade em torno de 60% (Figura 1).



Figura 1: Estrutura utilizada para criação dos insetos

Nós coletamos os ovos obtidos na criação e os individualizamos em tubos de ensaio com volume de 50ml. Após a sua eclosão, nós mantivemos os ovos no mesmo recipiente até que as larvas de *C. cubana* completassem seu ciclo de vida (VENZON; CARVALHO, 1993). Durante a fase larval dos crisopídeos, utilizamos como alimento ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) obtidos da empresa Ecotrix®. Nós disponibilizamos alimento para as larvas de *C. cubana* a cada dois dias, removendo todos os resíduos alimentares existentes para não haver proliferação de fungos. Após a fase de pupa, de aproximadamente 14 dias (VENZON; CARVALHO, 1993), nós transferimos os adultos emergidos para as gaiolas citadas anteriormente. Em cada gaiola, mantivemos cerca de 10 indivíduos de cada sexo. Ao longo do experimento, nós transferimos os ovos de *C. cubana* depositados no interior da gaiola para potes de polietileno de dimensões 11,7 x 9,4 x 8,0 cm e novamente individualizamos as larvas emergidas de modo a manter a criação do inseto.

2.2 Plantas espontâneas

Nós avaliamos a sobrevivência das larvas e dos adultos *C. cubana* na presença das plantas espontâneas, mentrasto (*A. conizoides*), picão-preto (*B. pilosa*) e serralha (*S. oleraceus*). As coletas das plantas espontâneas foram realizadas no *campus* da Universidade Federal de Viçosa. Essas plantas foram escolhidas pois, além de se tratarem de espécies de plantas com incidência constante em cultivos agrícolas, foram reportadas como hospedeiras de larvas e adultos de *C. cubana* (AMARAL et al., 2013). Após a coleta em campo, as plantas foram mantidas em casa de vegetação, onde foram transferidas para vasos de 2L, com substrato e solo misturados na proporção de (1:1), com irrigação duas vezes por semana, onde permaneceram até a montagem dos experimentos.

Para as plantas de mentrasto utilizadas no experimento de sobrevivência de larvas de *C. cubana* em plantas limpas (i. e. isoladas e submetidas a triagem em lupa), nós cortamos 50 fragmentos de aproximadamente 5cm de plantas da espécie e as inserimos em bandejas preenchidas com substrato vegetal (MecPlant®). Para seu desenvolvimento realizamos três irrigações por semana, não realizamos nenhuma adubação. Estas plantas permaneceram durante toda a condução dos experimentos isoladas em gaiolas de 1x1 m de dimensão, previamente esterilizadas com álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio a 1% e recobertas por tecido voal, propiciando um isolamento total das mesmas. Nessas estruturas, não era possível que as plantas tivessem contato com organismos que ocasionalmente pudessem existir na casa de vegetação (i.e insetos, ácaros, fungos) o que manteve a integridade, sanidade e limpeza das plantas.

2.3 Sobrevivência de larvas de *C. cubana* em plantas espontâneas com e sem flores

Nós utilizamos os ovos de *C. cubana* individualizados em tubos de ensaio com fundo achatado (5x3 cm) para obter as larvas para a avaliação da sobrevivência. Sob essas condições, nós mantivemos indivíduos até alcançarem o segundo instar, período durante o qual receberam como fonte de alimento apenas ovos de *A. kuehniella*. Nós utilizamos indivíduos de *C. cubana* no segundo instar por serem considerados ideais em análises de sobrevivência, uma vez que é reconhecido um alto índice de mortalidade natural em larvas do primeiro instar (COSTA et al., 2017).

Nós transferimos individualmente 270 larvas (30 larvas para cada uma das fontes de alimento) para potes de plástico PVC com dimensões de 20x10 cm. Para o primeiro experimento, as fontes de alimento testadas foram: (a) mentrasto com flores + água; (b)

mentrasto sem flores + água e (c) água. Para o segundo experimento, avaliamos as fontes de alimento (a) serralha com flores+ água; (b) serralha sem flores+ água e (c) água. No terceiro experimento, testamos as fontes de alimento (a) picão com flores + água; (b) picão sem flores+ água e (c) água. Todo o experimento foi conduzido em sala climatizada, com temperatura controlada a $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12:12h (luz e escuro).

Para manter a turgescência das plantas, nós mantivemos os seu caulículos inseridos em uma placa de 5 cm de diâmetro contendo água, vedada com plástico Parafilm®. Como fonte de água para o consumo das larvas, nós alojamos algodão umedecido na lateral dos potes. Por fim, nós vedamos os potes com plástico filme e avaliamos a sobrevivência das larvas diariamente.

2.4 Sobrevivência de adultos de *C. cubana* em plantas espontâneas com e sem flores

Nós alojamos um casal de adultos de *C. cubana* recém-emergidos em cada gaiola de cano PVC com 10 cm de diâmetro e 10 cm de altura com as paredes internas recobertas por papel toalha. A esses insetos, nós ofertamos as seguintes fontes de alimento: (a) mentrasto com flores + água; (b) mentrasto sem flores + água; (c) picão com flores + água; (d) picão sem flores + água; (e) serralha com flores + água; (f) serralha sem flores + água; (g) dieta de mel+levedo (1:1) (controle positivo) + água; (h) água (controle negativo). Todo o experimento foi conduzido em ambiente climatizado, com temperatura controlada a $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12:12h (luz e escuro).

Para esse teste, nós realizamos 12 repetições para cada tratamento, definidas como uma gaiola de PVC com um casal de *C. cubana*. Nós mantivemos os ramos das plantas em frascos de vidro com volume de 10 ml repletos de água, substituindo-as a cada três dias. A dieta de mel e levedo de cerveja (1:1) foi oferecida junto a uma tira de Parafilm® fixada na extremidade superior da gaiola, a qual foi substituída a cada dois dias. Nós avaliamos a sobrevivência dos adultos diariamente, considerando-se a sobrevivência individual de machos e fêmeas, até a morte de todos os indivíduos.

2.5 Sobrevivência de larvas de *C. cubana* em plântulas de mentrasto

Para testarmos a hipótese de que as larvas de *C. cubana* se beneficiam da alimentação do conteúdo celular do tecido foliar, nós conduzimos um segundo experimento para investigar as repostas obtidas no experimento anterior. Nós utilizamos as plântulas de mentrasto mantidas em gaiolas, as quais se encontravam isoladas do ambiente externo e de possíveis

insetos e ácaros. Antes do experimento, nós avaliamos minuciosamente e de maneira individual cada plântula com o auxílio de uma lupa. O objetivo deste processo foi remover quaisquer possíveis fontes de alimento para as larvas de crisopídeos (pólen, fungos, ovos de insetos e ácaros) que poderiam estar presentes nas plântulas.

Após este processo, colocamos as plântulas em recipientes plásticos com 5 cm de volume, com 2/3 do seu volume preenchidos com água destilada. Com objetivo de não permitir que as larvas transitassem ou acidentalmente caíssem na água que circundava a raiz, colocamos uma película de plástico PVC que impediu o contato da larva com esta zona da planta. Dessa forma, o único recurso alimentar disponível para as larvas foi a parte aérea da planta. Por fim, nós colocamos uma larva em cada recipiente plástico, com dimensão de 20x10 cm. Além disso, alocamos no fundo dos potes, tampas plásticas de 2 cm de diâmetro contendo algodão embebido em água destilada. Nós definimos os tratamentos da seguinte forma: (a) plântula de mentrasto + água destilada; (b) ovos de *A. kuehniella* + água destilada (controle positivo); (c) água (controle negativo). Todo o experimento foi conduzido em ambiente climatizado, com temperatura controlada a $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12:12h (luz e escuro).

Tanto o desenvolvimento quanto a sobrevivência das larvas foram monitoradas diariamente no período da manhã, nos horários de 10 às 12h. Foram realizadas 25 repetições para cada tratamento e a unidade experimental foi definida por uma larva de crisopídeo, mantida em recipiente vedado contendo um dos tratamentos.

2.6 Entomofauna associada às plantas de mentrasto

Para verificar se a sobrevivência das larvas de *C. cubana* em plantas limpas poderia estar associada a presença de artrópodes não percebidos no primeiro experimento, nós fizemos coletas de plantas de mentrasto (*A. conizoydes*) com flores em áreas de campo da Universidade Federal de Viçosa. Nessa coleta, buscamos encontrar quais os artrópodes (i.e insetos, ácaros) associados que poderiam servir como recurso alimentar para as larvas de crisopídeos. As coletas foram feitas mensalmente, entre agosto e dezembro de 2020. Para amostragem dos artrópodes presentes no mentrasto, selecionamos 20 plantas ao acaso nas áreas de coleta, onde retiramos aleatoriamente 20 folhas, 20 flores e três segmentos de 5cm do caulículo de cada planta. Em laboratório nós triamos as amostras coletadas com auxílio de lupa, logo após as coletas de campo (Figura 2).



Figura 2: Área de coleta de plantas de mentrasto, Vale da Agronomia, Viçosa – MG, 20/11/2020

Os artrópodes encontrados foram armazenados individualmente em tubos do tipo *Eppendorf* e conservados em álcool 70%. Todos os indivíduos foram submetidos a identificação, utilizando como base os caracteres morfológicos externos, e as chaves de identificação taxonômica utilizadas como base de identificação para cada espécie coletada encontravam-se no livro *Insetos do Brasil* (RAFAEL et al., 2012)

2.7 Análise estatística

Nós realizamos as representações gráficas das curvas de sobrevivência de *C. cubana* para os diferentes tratamentos utilizando a função *survfit* do pacote “*survival*”, com base no modelo de sobrevivência proposto por Kaplan-Meier (THERNEUAU et al., 2009). Nós calculamos os modelos de sobrevivência através da função *survreg* do pacote “*survival*”. Para a escolha do modelo com a distribuição que melhor se ajustasse aos nossos dados, nós fizemos a seleção de modelos através do AIC (Akaike’s Information Criterion). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Development Core Team, 2012) na versão 3.5.2 (CRAWLEY, 2012).

3. Resultados

3.1 Sobrevivência de larvas de *C. cubana* em plantas de mentrasto com e sem de flores

Para o mentrasto, as fontes de alimento testadas interferiram na sobrevivência das larvas de *C. cubana* ($X^2=7,61$, $gl=2$, $p<0,05$). A sobrevivência foi significativamente maior para as larvas na presença de plântulas de mentrasto do que quando somente água foi ofertada ($p=0,042$). Não houve diferença significativa entre a sobrevivência das larvas que se alimentaram de mentrasto com flor ou sem flor ($p= 0,9871$), nem entre as alimentadas com mentrastos com flor e água ($p= 0,0637$) (Figura 3).

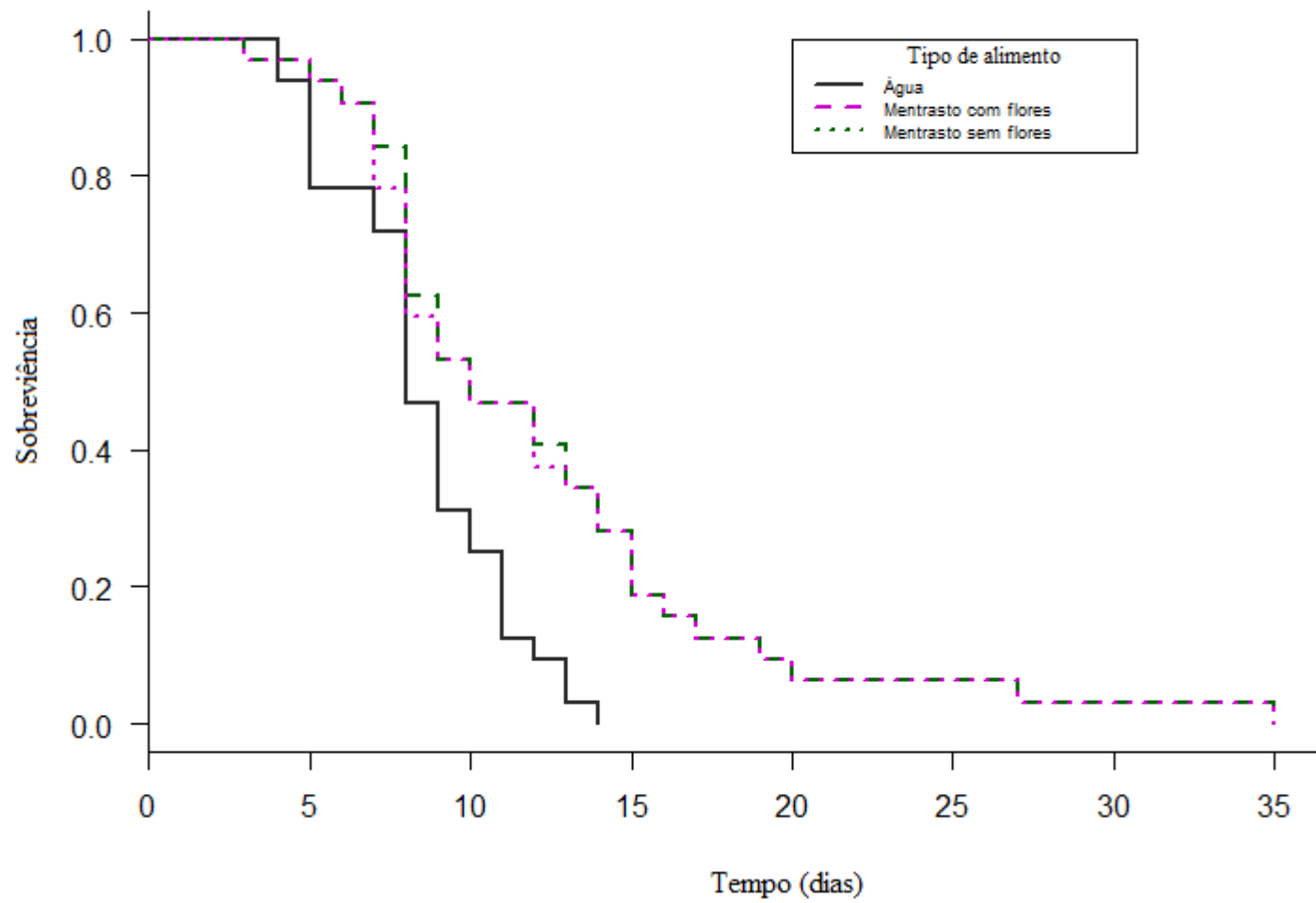


Figura 3: Sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas com plantas de mentrasto com e sem flores estimada por Kaplan Meier ($p < 0,05$).

3.2 Sobrevivência de larvas de *C. cubana* em plantas de serralha com e sem de flores

As fontes de alimento testadas interferiram na sobrevivência das larvas de *C. cubana* ($X^2=9,03$, $gl=2$, $p<0,01$). Quando comparadas as fontes de alimento serralha com flores e água, observamos que houve diferença na sobrevivência das larvas que se alimentaram da serralha com flor ($p=0,0076$). No entanto, não foi observada diferença na sobrevivência das larvas que se alimentaram de serralha sem flor, quando comparadas com água ($p=0,2197$) e serralha com flor ($p= 0,3565$) (Figura 4).

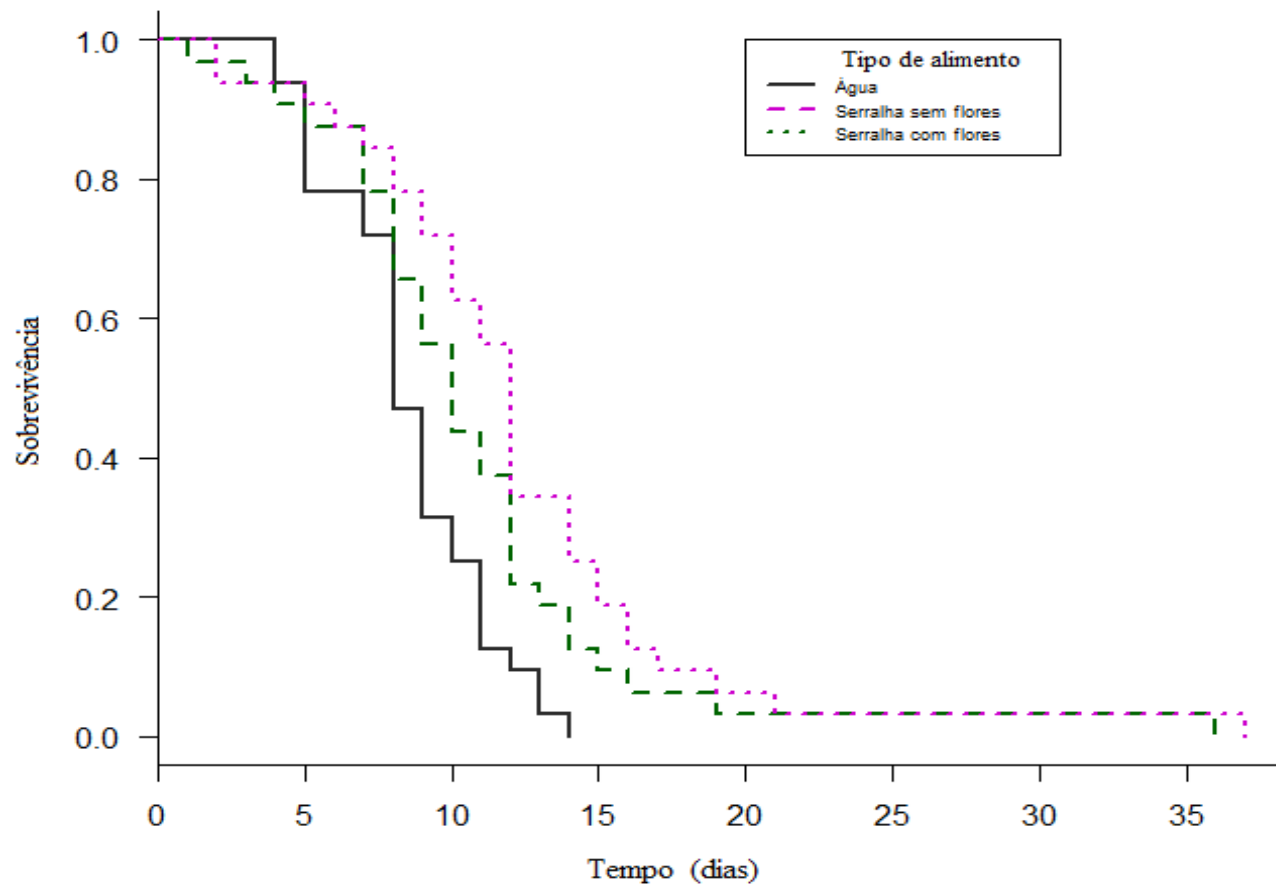


Figura 4: Sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas com plantas de serralha com e sem flores estimada por Kaplan Meier ($p < 0,05$)

3.3 Sobrevivência de larvas de *C. cubana* em plantas de picão com e sem de flores

As fontes de alimento testadas interferiram na sobrevivência das larvas de *C. cubana* ($X^2=46,87$, $gl=2$, $p<0,01$). Quando comparadas as fontes de alimento picão com flores e água, observamos que houve diferença na sobrevivência das larvas que se alimentaram de picão ($p<0,01$). Além disso, também foi observada diferença na sobrevivência de larvas que se alimentaram de picão com flor, quando comparadas às que se alimentaram de picão sem flor ($p<0,01$). No entanto, não foi observada diferença na sobrevivência das larvas que se alimentaram de picão sem flor, quando comparadas com água ($p=0,9657$) (Figura 5).

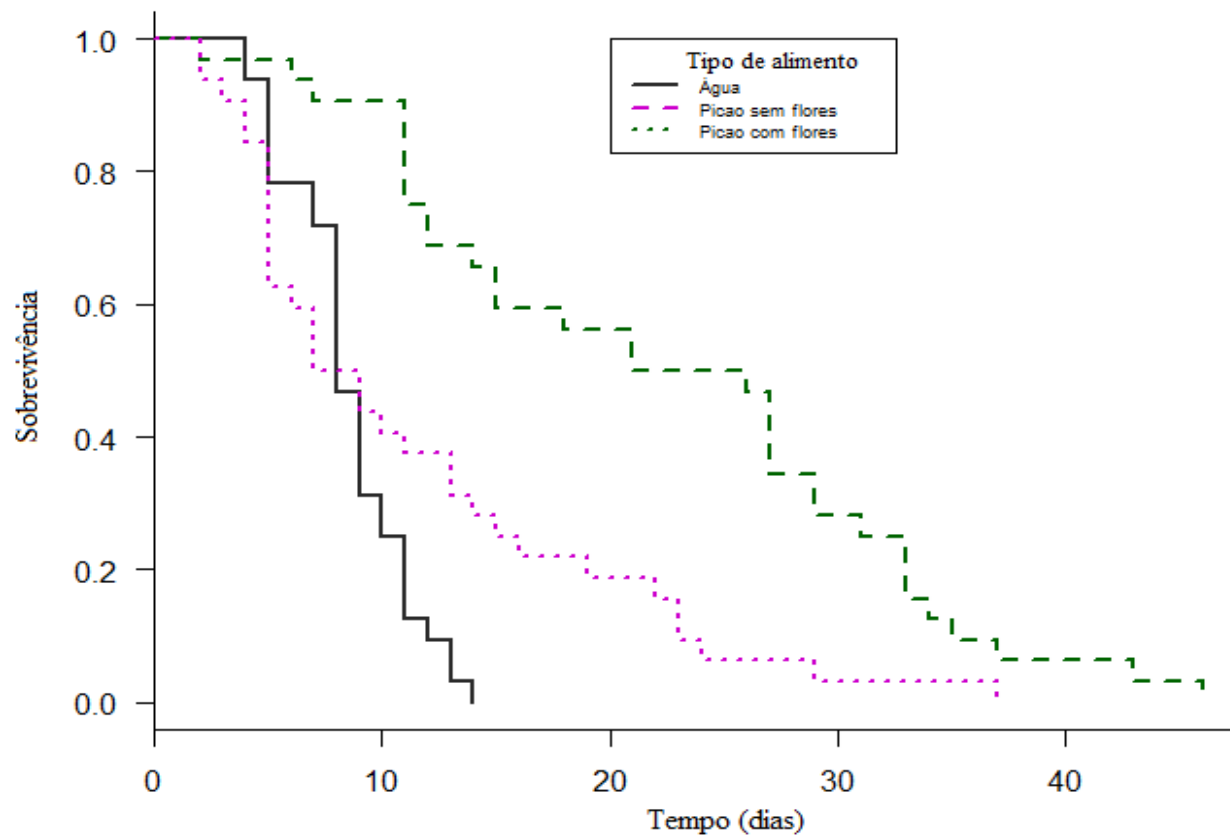


Figura 5: Sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas com plantas de picão com e sem flores estimada por Kaplan Meier ($p < 0,05$)

3.4 Sobrevivência de adultos de *C. cubana* em plantas espontâneas com e sem de flores

As fontes de alimentos influenciaram a sobrevivência de adultos de *C. cubana* ($X^2=340.66$, $gl=7$, $p<0,01$) e macho e fêmeas diferiram em suas respostas ($X^2=573$, $gl=8$, $p<0,01$). O melhor modelo selecionado foi o modelo sem interação, o que demonstra que o padrão de variação entre os sexos não diferiu entre os tratamentos. Quando alimentados com picão sem flores os adultos de *C. cubana* apresentaram mortalidade diária de 25%. No entanto, ao serem alimentadas com mentrasto sem flores, mentrasto com flores, e picão com flores e com água (controle) a probabilidade de morte diária foi de 24%. Seguido de serralha sem flores (22%), serralha com flores (20%). Ao comparar os resultados obtidos, percebemos que serralha com flores e serralha sem flores ($p=0,99$), mentrasto com flores e mentrasto sem flores ($p=1,00$) e picão com flores e picão sem flores ($p=0,98$) não diferiram estatisticamente entre si. Além disso, com exceção de serralha com flores, todas as plantas espontâneas restantes não diferiram do controle negativo representado pelo tratamento somente com água ($p=0,03$) (Figura 6).

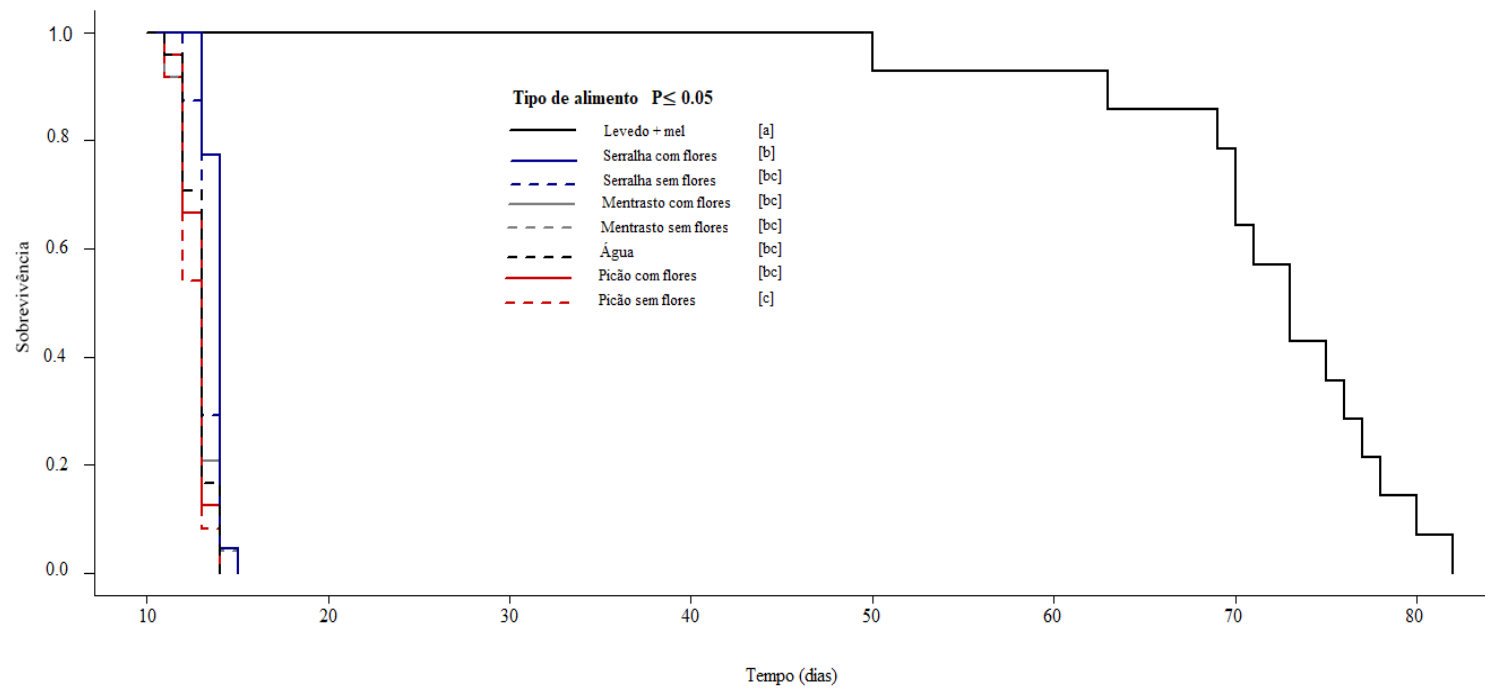


Figura 6: Sobrevivência de adulto de *C. cubana* quando alimentados com diferentes dietas estimada por Kaplan Meier. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.5 Sobrevivência de larvas de *C. cubana* com plantas de mentrasto sem flores após remoção de possíveis fontes de alimento

A sobrevivência das larvas de *C. cubana* diferiu com o tipo de dieta provida (i.e. água, plântulas de mentrasto e ovos de *A. kuehniella*) ($X^2=341.52$, $gl=7$, $p < 0,01$). Na presença de ovos de *A. kuehniella*, as larvas apresentaram maior sobrevivência do que com mentrasto ($p < 0,01$) e com água ($p < 0,01$) (Figura 7). No entanto, a sobrevivência das larvas foi significativamente maior na presença do mentrasto do que somente com água ($p < 0,01$). A menor probabilidade de morte por dia foi encontrada para as larvas que utilizaram os ovos de *A. kuehniella* como recurso alimentar ($\cong 0\%$), seguidas das larvas que consumiram folhas de mentrasto (0,06%) e água (0,04%). Nesta análise, 25% das larvas que utilizaram o mentrasto como alimento sobreviveram por 8 dias, enquanto 44% das larvas que só tinham água disponível para o consumo conseguiram viver por apenas 5 dias. Já ao considerarmos os ovos de *A. kuehniella*, todas as larvas atingiram o estágio de adulto e 40% delas chegaram à maturidade com 32 dias. Nenhuma larva dos tratamentos com plântulas de mentrasto conseguiu sobreviver tempo suficiente para se tornarem adultas.

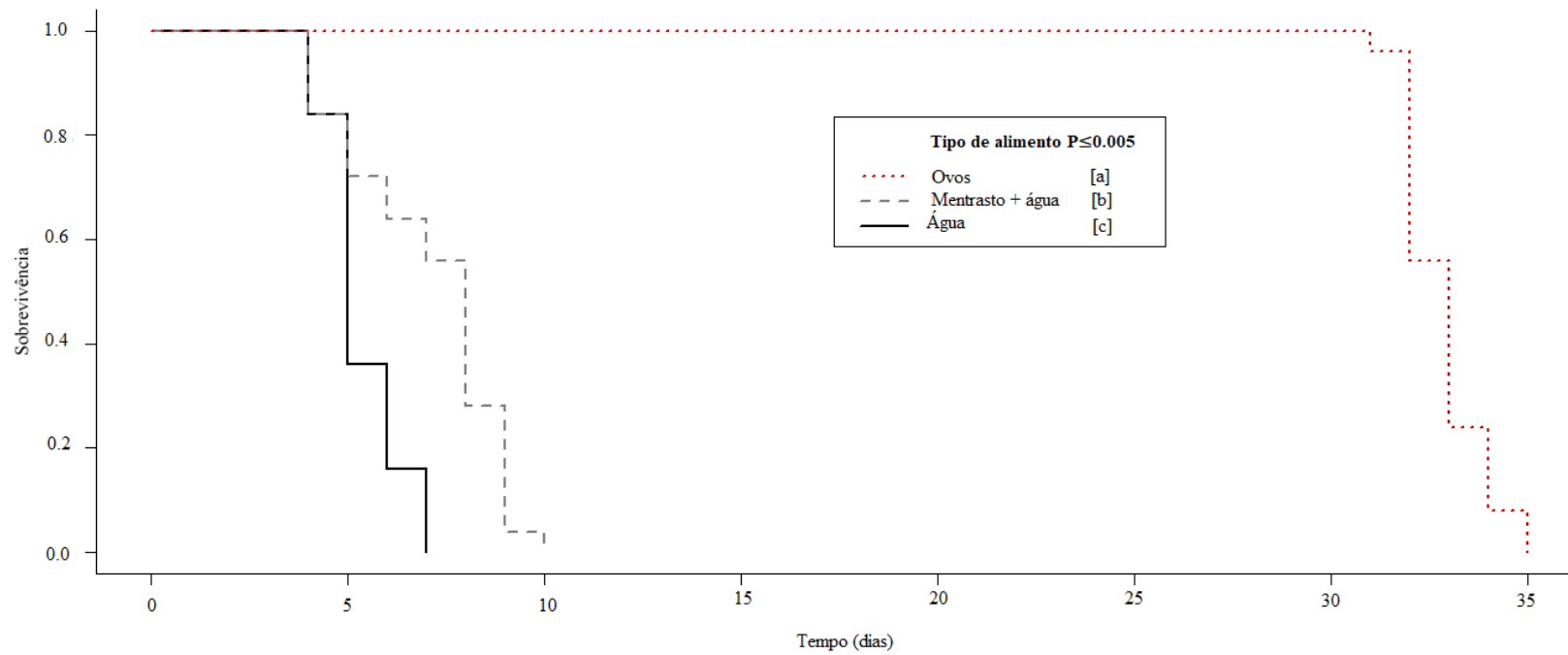


Figura 7: Curvas de Kaplan Meira para sobrevivência de larvas de *C. cubana* quando alimentadas com plantas limpas de *A. conizoydes*. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.6 Entomofauna associada às plantas de mentrasto

Após a coleta em campo e triagem das plantas mentrasto, encontramos 165 indivíduos alojados em 100 plantas de mentrasto, subdivididos em seis famílias. Dentre os organismos amostrados, 95% deles encontravam-se nas flores das plantas de mentrasto, enquanto os outros 5% estavam alojados nas folhas. No processo de triagem e identificação, encontramos a família que apresentou maior quantidade de indivíduos foi Aleyrodidae, seguida por Aphididae e Thripidae (Tabela 1).

Tabela 1: Insetos e ácaros identificados em plantas de mentrasto coletadas em campo

Nome comum	Família	Número de indivíduos coletados	Local encontrado na planta
Mosca-branca	Aleyrodidae	96	Folha
Pulgão	Aphididae	31	Folha
Tripes	Thripidae	9	Flor
Percevejo	Rhopalidae	7	Folha
Besouro	Chrysomelidae	2	Folha
Ácaro	Acaroidea	5	Folha
Ninfa de percevejo	-	15	Folha/Flor

Tabela 1: Organismos amostrados em plantas de mentrasto coletadas de Julho a Novembro/2021 no campus da UFV

4. DISCUSSÃO

Quando alimentadas com serralha com flores, picão com flores e mentrasto sem flores as larvas de *C. cubana* conseguiram aumentar a sua sobrevivência, se contrastadas com a ausência de alimento. Essas plantas em questão são comumente encontradas em campo, devido a sua maior rusticidade (i.e. apresentam adaptabilidade em sistemas de condições adversas) e considerável resistência a pragas e patógenos e, por estes motivos, permanecem por longos períodos de tempo e em diversos cultivos (BRIGHENTHI, A. M.; OLIVEIRA, 2011). Devido à constante disponibilidade destas plantas em campo, os inimigos naturais podem utilizá-las como fonte de recurso nutricional em períodos de escassez de presas (VENZON et al, 2005). Diversos estudos avaliaram a importância da oferta de recursos florais para os insetos benéficos, e os resultados demonstram que eles são capazes de favorecer sobrevivência e longevidade de diversas espécies (LU et al., 2014; WÄCKERS; VAN RIJN, 2012).

Quando analisadas as quantidades de carboidratos presentes no pólen das plantas essas são consideradas fatores cruciais para a determinação do saldo energético obtido pelo inseto que dele se alimenta. Além disso, já foi relatado que os níveis de proteína encontrados no pólen também podem interferir neste balanço nutricional para espécies do Chrysopidae (TODD; BRETHERICK, 1942; VENZON et al., 2006). Possivelmente as flores de picão e serralha ofereceram uma qualidade nutricional considerável para a manutenção dos parâmetros fisiológicos das larvas de *C. cubana* em virtude da composição de seu pólen (AMARAL et al., 2013). Em adição, ao realizarmos a triagem das plantas de mentrasto coletadas em campo, percebemos a presença de algumas famílias de herbívoros comumente utilizadas como fonte alimentar para crisopídeos. A maior quantidade de organismos relatados eram ninfas da família Aleyrodidae, na qual se incluem os insetos comumente denominados moscas-brancas que já foram reportados como fontes de alimentos para neuropteros (TRINDADE; DE LIMA, 2012). Apesar do número de indivíduos superior às outras famílias, ao se considerar o total de coletas realizadas no experimento e o número total de plantas amostradas, este índice é considerado baixo, o que não infere riscos de ataque às culturas. Ainda assim, a possível presença de insetos e ácaros nas plantas de mentrasto podem ter influenciado nos resultados de sobrevivência das larvas.

Para os adultos de *C. cubana*, considerando-se tanto os machos quanto as fêmeas, o aporte nutricional fornecido pelas espécies de plantas espontâneas avaliadas, aparentemente, não foi suficiente para garantir a sua sobrevivência. A sobrevivência de crisopídeos, de

maneira geral, está extremamente associada a composição do pólen oferecido para a alimentação destes insetos (VENZON et al., 2006). Os adultos de Chrysopidae não possuem aparelho bucal adaptado para captura de presas, o que restringe a sua alimentação ao pólen e néctar das plantas. Desta forma, a fisiologia dos adultos pode ter sido prejudicada pela composição nutricional dos alimentos oferecidos.

Outros trabalhos que avaliaram a importância do pólen e néctar florais para predadores demonstraram que espécies como *Chrysoperla externa* utilizam diversas espécies vegetais para obtenção de pólen e néctar, os quais são comumente usados para obtenção de energia (MEDEIROS et al., 2010). Neste contexto, é razoável considerar que os adultos de *C. cubana* testados poderiam apresentar melhores resultados de sobrevivência caso fossem disponibilizadas fontes de pólen e néctar diversificadas, que apresentem qualidade e quantidade superiores às das espécies aqui testadas. Em situações de campo, o forrageamento desta espécie é comum, o que o possibilitaria buscar recursos alimentares obtidos em plantas de outras famílias.

A sobrevivência das larvas no primeiro experimento em plantas de mentrasto sem recursos florais nos levou a um segundo teste, com intuito de investigarmos melhor como era realizada a absorção de nutrientes pelo inseto quando apenas esta planta estava disponível. Nossos resultados demonstraram uma probabilidade de morte de 0,06% para as larvas que se alimentaram somente de folhas desta planta, além de confirmarem que a sobrevivência dos insetos é superior quando utilizam conteúdo celular vegetal foliar do mentrasto quando contrastada com a ausência de recursos. Apesar de pouco explorada, a alimentação direta de larvas de crisopídeos em tecido foliar de plantas já foi reportada na espécie *Chrysoperla plorabunda*, e estes insetos aparentemente utilizaram as suas mandíbulas para pinçar e tentar acessar os conteúdos internos de folhas de algodão (LIMBURG; ROSENHEIM, 2001).

Desta forma, acreditamos que na ausência de outras fontes de alimento, as larvas aqui testadas utilizaram o conteúdo foliar de plantas de *A. conyzoides* para obterem recursos nutricionais, embora estas não sejam as fontes primárias de uso alimentar da espécie. Além disso, embora o inseto utilize uma pequena quantidade de material vegetal da planta, acreditamos que tal percentual não cause efeito deletério ao desenvolvimento da espécie, isso porque, conforme observado por Batista et al. (2017) e Limburg e Rosenheim (2001) as larvas de Chrysopidae só são capazes de pinçar superficialmente as folhas das plantas a elas oferecidas, tornando o seu efeito sobre a planta praticamente imperceptível.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A. A.; KLEIN, C. N. What omnivores eat: Direct effects of induced plant resistance on herbivores and indirect consequences for diet selection by omnivores. **Journal of Animal Ecology**, v. 69, n. 3, p. 525–535, 2000.
- ALBUQUERQUE, G. S.; TAUBER, C. A.; TAUBER, M. J. *Chrysoperla externa* and *Ceraeochrysa* spp.: potential for biological control in the New World tropics and subtropics. In: MCEWEN, P. K.; NEW, T. R.; WHITTINGTON, A. E. (Eds.). **Lacewings in the Crop Environment**. 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 408–423.
- AMARAL, D. S. S. L. et al. Non-crop vegetation associated with chili pepper agroecosystems promote the abundance and survival of aphid predators. **Biological Control**, v. 64, n. 3, p. 338–346, 2013.
- BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, n. February 2019, p. 104095, 2020.
- BALABANIDOU, V.; GRIGORAKI, L.; VONTAS, J. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. **Insect Science**, v. 27, p. 68–74, 2018.
- BATISTA, M. C. et al. Basil (*Ocimum basilicum* L.) attracts and benefits the green lacewing *Ceraeochrysa cubana* Hagen. **Biological Control**, v. 110, n. December 2016, p. 98–106, 2017.
- BEGG, G. S. et al. A functional overview of conservation biological control. **Crop Protection**, v. 97, p. 1–14, 2017.
- BOREGAS, K. G. B.; CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Chrysoperla externa* (Hagen , 1861) (Neuroptera : Chrysopidae) EM CASA-DE-VEGETAÇÃO. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 7–16, 2003.
- BORTOLI, S. A. DE et al. Desenvolvimento e Capacidade Predatória de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera : Chrysopidae) em Diferentes Presas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 145–152, 2006.
- BRIGHENTHI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. Biologia de Plantas Daninhas. In: OLIVEIRA JR, R. S. (Ed.). **Biologia e Manejos de Plantas Daninhas**. [s.l: s.n.]. p. 1–36.
- BROOKS, S. J.; BARNARD, P. C. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera : Chrysopidae). v. 5, n. 2, p. 117–286, 1990.
- CANARD, M. Natural food and feeding habits of lacewings. In: MCEWEN, P. K.; NEW, T. R.; WHITTINGTON, A. E. (Eds.). **Lacewings in the Crop Environment**. 1. ed. Cambridge University Press, 2001. p. 116–129.
- CHAPIN, F. S. et al. Three-Dimensional Imaging of the Face: A Comparison between Three Different Imaging Modalities. **Nature**, v. 405, p. 234–242, 2000.
- COCK, M.J.W et al. Do new access and benefit sharing procedures under the convention on

biological diversity threaten the future of biological control? **BioControl**, v. 55, p. 199-218, 2010.

COLL, M. Feeding and ovipositing on plants by an omnivorous insect predator. **Oecologia**, v. 105, n. 2, p. 214–220, 1996.

COLL, M.; IZRAYLEVICH, S. When predators also feed on plants: Effects of competition and plant quality on omnivore-prey population dynamics. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 90, n. 2, p. 155–161, 1997.

COSTA, M. B. et al. Development and reproduction of *Chrysoperla externa* (Neuroptera : Chrysopidae) fed with *Neotoxoptera formosana* (Hemiptera : Aphididae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 38, n. 2, p. 187–190, 2012.

COSTA, M. B. et al. Basil (*Ocimum basilicum* L.) attracts and benefits the green lacewing *Ceraeochrysa cubana* Hagen. **Biological Control**, v. 110, n. December 2016, p. 98–106, 2017.

CRAWLEY, M. J. Statistical modelling. **The R Book**, Second Edition, p. 388-448, 2012.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193–199, 2001.

DIAZ, N. S. **Plantas espontâneas favorecem crisopídeos em plantio de pimenta malagueta**. Universidade Federal de Viçosa, 2014.

DUELLI, P. Lacewings in field crops. In: MCEWEN, P. B.; NEW, T. R.; WHITTINGTON, A. E. (Eds.). **Lacewings in the Crop Environment**. [s.l: s.n.]. p. 158–171.

ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v. 160, n. 1–3, p. 27–33, 2001.

FEDERICI, B. A. Effects of Bt on Non-Target Organisms Effects of Bt on Non-Target Organisms. v. 9025, n. January, p. 10–30, 2016.

FERREIRA, P. S. F.; SILVA, E. R. DA; COELHO, L. B. N. Miridae (Heteroptera) fitófagos e predadores de Minas Gerais, Brasil, com ênfase em espécies com potencial econômico. **Iheringia. Série Zoologia**, n. 91, p. 159–169, 2001.

FOSTER, V.; MOURATO, S. Valuing the Multiple Impacts of Pesticide Use in the UK: A Contingent Ranking Approach. **Journal of Agricultural Economics**, v. 51, n. 1, p. 1–21, 2000.

FONSECA, M. M. et al. Non-crop plant to attract and conserve an aphid predator (Coleoptera : Coccinellidae) in tomato. **Biological Control**, v. 115, n. October, p. 129–134, 2017.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Proceedings - 12th International Conference on Computational Intelligence and**

- Security, CIS 2016**, v. 327, n. February, p. 194–197, 2017.
- GONTIJO, L. M. Engineering natural enemy shelters to enhance conservation biological control in field crops. **Biological Control**, v. 130, p. 155-163, 2019.
- GURR, G. M.; WRATTEN, S. D.; LUNA, J. M. Multi-function agricultural biodiversity : pest management and other benefits. **Basic and Applied Ecology**, v. 116, p. 107–116, 2003.
- GUTIRREZ-MORENO, R. et al. Field-Evolved Resistance of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Synthetic Insecticides in Puerto Rico and Mexico. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 2, p. 792–802, 2019.
- JONSSON, M. et al. Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods. **Biological Control**, v. 45, n. 2, p. 172–175, 2008.
- LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. HABITAT MANAGEMENT TO CONSERVE NATURAL ENEMIES OF ARTHROPOD PESTS. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 175–201, 2000.
- LAVANDERO, B. et al. Enhancing the effectiveness of the parasitoid *Diadegma semiclausum* (Helen): movement after use of nectar in the field. **Biological control**, v. 34, p. 152-158.
- LEE, J. C.; HEIMPEL, G. E. Effect of floral nectar, water, and feeding frequency on *Cotesia glomerata* longevity. **BioControl**, v. 53, n. 2, p. 289–294, 2008.
- LEMOS, W. P. et al. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **International Journal of Pest Management**, v. 47, n. 2, p. 89–93, 2010.
- LI, Y. et al. Bt rice producing Cry1C protein does not have direct detrimental effects on the green lacewing *Chrysoperla sinica* (Tjeder). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1391–1397, 2014.
- LI, Y. et al. Consumption of Bt maize pollen containing Cry1Ie does not negatively affect *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). **Toxins**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2017.
- LI, Y.; MEISSLE, M.; ROMEIS, J. Consumption of Bt Maize Pollen Expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 Does Not Harm Adult Green Lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. 1–8, 2008.
- LIMBURG, D. D.; ROSENHEIM, J. A. Extrafloral nectar consumption and its influence on survival and development of an omnivorous predator, larval *Chrysoperla plorabunda* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, v. 30, n. 3, p. 595–604, 2001.
- LU, Z. X. et al. Mechanisms for flowering plants to benefit arthropod natural enemies of insect pests: Prospects for enhanced use in agriculture. **Insect Science**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2014.
- LUNDGREN, J. G. Nutritional aspects of non-prey foods in the life story of predaceous Coccinellidae. **Biological Control**, v. 51, 294-305.

MATOS NETO, F. D. C. et al. Reproductive characteristics of the predator *Podisus nigrispinus* fed with an insect resistant soybean variety. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 917–924, 2002.

MEDEIROS, M. A. et al. Identification of plant families associated with the predators *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (Coleoptera: Coccinellidae) using pollen grain as a natural marker. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 293–300, 2010.

MOHD, R. Z.; FAUZIAH, I.; I. & WAN MOHAMAD, W. A. . Biology of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) Predator of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). **International Journal of Biology**, v. 1, n. 2, p. 63–70, 2009.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P. et al. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Frontiers in Public Health**, v. 4, n. July, p. 1–8, 2016.

OLIVEIRA, S. A. DE et al. Can larval lacewings *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera , Chrysopidae) be reared on pollen ? **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 4, p. 697–700, 2010.

OSWALD, J. D. (2017). **Lacewing Digital Library**. URL: <http://lacewing.tamu.edu/> (acesso em 19 fevereiro 2021)

PAPPAS, M. L.; BROUFAS, G. D.; KOVEOS, D. S. Chrysopid Predators and their Role in Biological Control. **Journal of Entomology**, v. 8, n. 3, p. 301–326, 2011.

QAIM, M. The Economics of Genetically Modified Crops. 2009.

RAFAEL, J. A.; MELO, G.A.R.; DE CARVALHO, C.J.B.; CASARI, S.A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 810p.

RAYMOND, B. et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189–194, 2010.

RESENDE, D. C. et al. Does Bt maize cultivation affect the non-target insect community in the agro ecosystem? **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 82–93, 2016.

ROBINSON, K. A. et al. Implications of floral resources for predation by an omnivorous lacewing. **Basic and Applied Ecology**, v. 9, n. 2, p. 172–181, 2008.

RODRIGO-SIMÓN, A. et al. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: A toxicological, histopathological, and biochemical analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1595–1603, 2006.

ROMEIS, R. G. et al. Using Resistant Prey Demonstrates That Bt Plants Producing Cry1Ac , Cry2Ab , and Cry1F Have No Negative Effects on *Geocoris punctipes* and *Orius insidiosus*. p. 242–251, 2014.

SAULICH, A. K.; MUSSOLIN, D. L. Seasonal development and ecology of anthocorids (Heteroptera, Anthocoridae). **Entomological Review**, v. 89, n. 5, p. 501-528, 2009.

SIVITER, H.; MUTH, F. Do novel insecticides pose a threat to beneficial insects?: Novel insecticides harm insects. *Proceedings of the Royal Society*, v. 287, n. 1935, 2020.

TAUBER, C. A.; TAUBER, M. J.; ALBURQUERQUE, G. S. Neuroptera (Lacewings, Antlions). In: RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. (Eds.). **Encyclopedia of Insects**. 2. ed. Academic Press, 2009. p. 695–707.

THERNEUAU, T. M. et al. **Package ‘ survival ’**, 2009.

TIAN, J. C. et al. Bt Crops Producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F Do Not Harm the Green Lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 4–9, 2013.

TODD, F. E.; BREATHERICK, O. The Composition of Pollens¹. **Journal of Economic Entomology**, v. 35, n. 3, p. 312–317, 1942.

TRINDADE, T.; DE LIMA, A. F. Predação de espécies de moscas brancas (hemiptera: Aleyrodidae) por *Chrysoperla steinmann* (neuroptera: Chrysopidae) no estado do rio de janeiro-Brasil. **Entomotopica**, v. 27, n. 2, p. 71–75, 2012.

VAN LENTEREN, J. C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 39-59, 2018.

VAN RIJN, P. C. J.; WÄCKERS, F. L. Nectar accessibility determines fitness, flower choice and abundance of hoverflies that provide natural pest control. **Journal of Applied Ecology**, v. 53, n. 3, p. 925–933, 2016.

VENZON, M. et al. Suitability of leguminous cover crop pollens as food source for the green lacewing *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 3, p. 371–376, 2006.

VENZON, M.; CARVALHO, C. F. **Desenvolvimento larval, pré-pupal e pupal de *Ceraeochrysa cubana* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) em diferentes dietas e temperaturas**. ANAIS DA SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL. **Anais...**1993

VENZON, M.; CARVALHO, C. F.; SILVA, R. L. X. **Effects of various diets and temperature on larval development in the Neotropical green lacewing *Ceraeochrysa cubana* (Hagen)(Insecta: Neuroptera: Chrysopidae)**. Pure and Applied Research in Neuropterology (Proceedings of the Fifth International Symposium on Neuropterology, Cairo, 1994). **Anais...**Toulouse: 1996

VENZON et al., **Interactions of Natural Enemies with Non-cultivated Plants**. In: Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems. 1ed.: Springer International Publishing, 2019, v. , p. 15-26.

WÄCKERS, F. L.; VAN RIJN, P. C. J. Pick and Mix: Selecting Flowering Plants to Meet the

Requirements of Target Biological Control Insects. **Biodiversity and Insect Pests: Key Issues for Sustainable Management**, n. April 2015, p. 139–165, 2012.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics**, v. 39, n. 3, p. 449–462, 2001.

CAPÍTULO 2

Sobrevivência de larvas de *Ceraeochrysa cubana* alimentadas com conteúdo celular de tecido foliar de plantas convencionais e transgênicas de milho e soja

RESUMO: O controle biológico conservativo é uma das estratégias de controle de pragas que visa a diversificação da paisagem agrícola objetivando atrair e manter insetos benéficos em campo. Esta estratégia busca manter plantas espontâneas que ofereçam recursos nutricionais como pólen e néctar, constantemente utilizados por insetos benéficos como os predadores, que realizam serviços ecossistêmicos como o controle de pragas. Além desta estratégia, também é reportado o uso de transgênicos para auxiliar na redução de populações de insetos-praga que se alimentam de plantas cultivadas. No entanto, são necessários estudos para avaliar os possíveis efeitos das plantas transgênicas sobre os organismos não-alvo, que podem utilizar a planta como fonte de recurso alimentar. Nosso estudo buscou investigar os possíveis efeitos de proteínas inseticidas Cry 1Ab e Cry2Ab de *B. thuringiensis* na sobrevivência do predador generalista *Ceraeochrysa cubana*. Inicialmente verificamos a possibilidade do predador se alimentar de conteúdo celular de plantas de milho e de soja convencionais e transgênicas. Posteriormente, verificamos se a sobrevivência do predador era influenciada pela presença das proteínas inseticidas Cry 1Ac e Cry 2Ab. Além disso, quantificamos as proteínas Cry2Ab absorvidas pelas larvas de *C. cubana* alimentadas com o milho transgênico. Nossos resultados demonstram que não houve diferença na sobrevivência das larvas alimentadas com plantas transgênicas, quando comparadas às plantas convencionais. Ademais, encontramos proteínas Cry em todas as larvas alimentadas com plantas transgênicas, o que corrobora com a hipótese de que estas larvas, em situações de escassez de alimento, são capazes de consumir conteúdo celular de tecido foliar de plantas.

CHAPTER 2

Survival of larvae of *Ceraochrysa cubana* fed with cellular tissue content of conventional and transgenic corn and soybean plants

ABSTRACT: Conservation biological control is one of the pest control strategies that aims to diversify the agricultural landscape to attract and maintain beneficial insects in the field. This strategy seeks to maintain spontaneous plants that offer nutritional resources such as pollen and nectar. The resources are constantly used by predators, which perform ecosystem services such as pest control. In addition to this strategy, the use of transgenics also helps to reduce pest insects populations that feed on plants with this technology. However, more studies are needed to assess the possible effects of transgenic plants on non-target organisms, which can use the plant as food source. Our study aims to investigate the possible effects of insecticidal proteins Cry 1Ab and Cry2Ab from *B. thuringiensis* on the survival of the generalist predator *Ceraeochrysa cubana*. Initially, we verified if the predator feeds on cellular content of conventional and transgenic corn and soybean plants. Subsequently, we checked whether the predator's survival was influenced by the presence of the insecticidal proteins Cry 1Ac and Cry 2Ab. We also quantified the Cry2Ab proteins absorbed by *C. cubana* larvae fed with transgenic corn. Our results demonstrate that there was no difference in the survival of larvae fed with transgenic plants, when compared to conventional plants. In addition, we found Cry proteins in all larvae fed with transgenic plants, which corroborates the hypothesis that these larvae are able to consume cellular content of plant leaf tissue in situations of food scarcity.

1. INTRODUÇÃO

Em um ambiente agrícola, podemos observar um grande número de espécies de insetos que interagem entre si e também com o ambiente em seu entorno. Dentre os insetos encontrados nos agroecossistemas podemos observar diferentes hábitos alimentares, sendo o mais amplo deles a onivoria (i.e. alimentação que utiliza recursos animais e vegetais) (EUBANKS; STYRSKY; DENNO, 2003; VAN LENTEREN, 2018). Muitos insetos predadores se inserem neste último grupo, visto que podem utilizar além de presas, recursos vegetais com alto valor nutritivo, como aqueles encontrados nos grãos de pólen e no néctar (COLL; GUERSHON, 2002; AMARAL et al., 2013). Considerando-se o hábito alimentar diversificado apresentado por alguns predadores, as fontes de recursos vegetais são constantemente estudadas, objetivando-se compreender como estas fontes são capazes de favorecer a sobrevivência de insetos predadores generalistas (BORGES et al., 2011). No entanto, em decorrência da expansão das áreas monocultoras, surgiu a importância de se investigar não somente os recursos oferecidos pelas plantas espontâneas abundantes nos sistemas agrícolas, mas também as plantas cultivadas (LI et al., 2014). Essa última categoria, por sua vez, pode ser representada pelas plantas denominadas convencionais e também pelas transgênicas.

O uso da transgenia nos cultivos agrícolas é uma das estratégias de controle de insetos capaz de controlar inúmeros insetos-praga que causam perdas econômicas aos agricultores (RESENDE et al., 2016). Após a expansão do seu uso na agricultura, em alguns casos, houve um declínio no uso de alguns inseticidas comumente utilizados, um fator favorável ao meio ambiente (FEDERICI, 2016; QAIM, 2009). De acordo com o levantamento de dados do ISAA (2021), o Brasil conta com 111 eventos transgênicos registrados, dentre os quais se destacam duas culturas: o milho (*Zea mays L.*) com 64 eventos e a soja (*Glycine max L.*) com 19 eventos registrados.

No âmbito da defesa de plantas, de forma geral, a transgenia é utilizada majoritariamente através da inserção de genes inseticidas provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* no genoma de plantas de interesse comercial (GLASER; MATTEN, 2003). Essa bactéria é considerada entomopatogênica, gram positiva e encontrada naturalmente no solo. Seu diferencial é a capacidade de produzir cristais e esporos com proteínas Cry, as quais são conhecidas pela sua ação inseticida para diversas ordens de inseto, e possuem ação específica em receptores do intestino médio dos insetos que ingerem a bactéria, causando a sua septicemia (RAYMOND et al., 2010; RODRIGO-SIMÓN et al., 2006). Em virtude da

inserção de genes inseticidas nas plantas, ao consumirem o tecido foliar das espécies geneticamente modificadas, os insetos fitófagos já têm contato com as proteínas em sua forma tóxica. Caso o herbívoro apresente as condições adequadas de pH alcalino e os receptores específicos de ação com as proteínas Cry, o efeito de controle será facilmente realizado (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

Compreendendo o mecanismo de ação de *B. thuringiensis*, surgiram-se dúvidas acerca de seu efeito sobre organismos não-alvo. Dentre os organismos que são objetos de estudos de interferência da transgenia, tem-se os representantes de Coccinellidae (LI et al., 2017), Anthocoridae (ROMEIS et al., 2014) e Chrysopidae (RODRIGO-SIMÓN et al., 2006). Estudos acerca dos efeitos das proteínas de *B. thuringiensis* sobre Neuroptera são realizados buscando-se encontrar possíveis interferências negativas das proteínas Cry na biologia e ciclo de vida destes insetos, a qual pode ser adquirida via alimentação direta (i.e. pólen, néctar) e indireta (i.e. herbívoros) (LI et al., 2014; RODRIGO-SIMÓN et al., 2006; TIAN et al., 2013). De maneira mais específica, as proteínas Cry1Ab e Cry2Ab tiveram como alvo de investigação os possíveis efeitos deletérios sobre as espécies de Chrysopidae, quando absorvidas via pólen e por predação de herbívoros (LI; MEISSLE; ROMEIS, 2008; TIAN et al., 2013).

A maior parte dos estudos de interferência de transgenia em predadores se baseia no efeito da alimentação de néctar e pólen dessas plantas e no geral, como resultados destes estudos, o que se observa é a não interferência das proteínas inseticidas encontradas em *B. thuringiensis* em organismos benéficos (LI et al., 2004, 2017; RESENDE et al., 2016; RODRIGO-SIMÓN et al., 2006). Entretanto, algumas larvas de algumas espécies de crisopídeos já foram reportadas se alimentando em tecido foliar das plantas, na ausência de presas, mas ainda não se sabe o efeito da ingestão destes tecidos no predador (LIMBURG; ROSENHEIM, 2001; BATISTA et al., 2017). No capítulo 1 deste trabalho, encontramos resultados que comprovam a alimentação e sobrevivência de larvas de *C. cubana* utilizando conteúdo celular de folhas de plantas espontâneas, como o mentrasto *A. conizoydes*.

Considerando o hábito alimentar de larvas de *C. cubana* com conteúdo celular do tecido foliar de plantas, na ausência de presas, é importante investigar a possibilidade destas larvas adquiram as proteínas Cry absorvidas por essa via, e o mais importante, se essas proteínas são capazes de influenciar na sobrevivência do predador. Dessa forma, nossos objetivos foram: i) avaliar se existem diferenças na sobrevivência de *C. cubana* quando alimentadas com plantas convencionais e plantas contendo proteínas Cry 1Ac e Cry2Ab2 ii) avaliar a presença da proteína Cry 1Ac em larvas alimentadas por soja transgênica e iii)

quantificar a proteína Cry2Ab presente nas larvas alimentadas com folhas de milho transgênico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo das plantas

Obtivemos as sementes de soja e milho, convencionais e transgênicas, do Depósito de Sementes do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, localizado no município de Sete Lagoas (MG), onde estavam armazenadas em câmara fria a 4°C, com UR de 35%. Selecionamos as sementes morfológicamente viáveis em uma amostra removida ao acaso das seguintes cultivares: a) Milho transgênico (DBK 390 Pro, Yeldgard); b) Milho Convencional: DKB 390; c) Soja Transgênica: M5917 IPRO; e d) Soja Convencional: BRS MG 715 A. A semeadura foi realizada em bandejas de 200 células, preenchidas com substrato vegetal (MecPlant®). Não foram utilizados agrotóxicos, adubos químicos ou orgânicos durante o cultivo, e a irrigação foi realizada 4 vezes por semana, com auxílio de pulverizador manual.

As plântulas foram mantidas em casa de vegetação da EPAMIG Sudeste até que atingissem cerca de 10 cm de altura, momento no qual foram colhidas para os experimentos posteriores. Durante todo o período de crescimento das plântulas, as mesmas foram mantidas totalmente isoladas do ambiente externo com a sua manutenção em gaiolas de madeira recobertas por tecido *voil*. Este tecido possui uma malha extremamente fina, que impede que insetos e ácaros tenham acesso às plântulas (Figura 1).



Figura 1: Plântulas de soja e milho após remoção das bandejas de germinação.

2.2 Criação de *Ceraeochrysa cubana*

Os insetos utilizados nos experimentos foram provenientes de uma criação de *C. cubana* mantida no Laboratório de Controle Biológico da EPAMIG Sudeste. A manutenção da criação segue a metodologia de Venzon et al. (2006). Os adultos foram mantidos em gaiolas de cano PVC (8 x 11cm) recobertas por tecido de nylon, com a extremidade inferior apoiada em uma placa plástica de 15 cm de diâmetro. Os adultos foram alimentados com dieta composta de levedo e mel, na proporção 1:1 oferecidas em uma faixa de Parafilm. A oferta de água foi feita em um pedaço de algodão inserido em um recipiente de vidro com volume de 10ml, e as fontes de água e alimento foram repostas 2 vezes por semana. A coleta dos ovos de *C. cubana* era feita cortando-se os seus pedicelos e os mesmos foram transferidos para potes plásticos com ovos de *A.kuehniella* como fonte de alimento para as larvas emergidas. Durante todo o seu ciclo de vida, os insetos permaneceram em ambiente climatizado a 25°C, fotofase de 12/12h e umidade em torno de 60%.

Nós coletamos os ovos obtidos na criação e os individualizamos em tubos de ensaio com volume de 50ml. Após a sua eclosão, nós mantivemos os ovos no mesmo recipiente até que as larvas de *C. cubana* completassem seu ciclo de vida (VENZON; CARVALHO, 1993).

Durante a fase larval dos crisopídeos, utilizamos como alimento ovos de *A. kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) obtidos da empresa Ecotrix®. Nós disponibilizamos alimento para as larvas de *C. cubana* a cada dois dias, removendo todos os resíduos alimentares existentes para não haver proliferação de fungos. Após a fase de pupa, aproximadamente 14 dias (VENZON; CARVALHO, 1993), nós transferimos os adultos emergidos para as gaiolas citadas anteriormente. Em cada gaiola, mantivemos cerca de 10 indivíduos de cada sexo. Ao longo do experimento, nós transferimos os ovos de *C. cubana* depositados no interior da gaiola para potes de polietileno de dimensões 11,7 x 9,4 x 8,0 cm e novamente individualizamos as larvas emergidas de modo a manter a criação do inseto.

2.3 Sobrevivência de *C. cubana* em milho e soja convencionais e transgênicos

Neste teste, avaliamos a sobrevivência de larvas de *C. cubana* de segundo instar confinadas em recipientes com plântulas de milho ou de soja, convencionais e transgênicas, como única fonte de alimento. Antes de oferecer as plântulas às larvas, nós submetemos as plântulas um minucioso processo de triagem em lupa, removendo qualquer possível fonte de recurso alimentar existente no material (i.e. insetos, ácaros, fungos, pólen) de maneira a garantir que os insetos só pudessem utilizar a plântula com fonte de recurso alimentar. As plântulas triadas foram inseridas em potes plásticos (5x2 cm) preenchidos com água destilada em 2/3 do seu volume e vedados com plástico filme, o qual envolvia parte do caulículo e a base da raiz das plântulas. Esta estrutura foi montada para impedir que a larva acidentalmente caísse na água, ou que tivesse acesso ao sistema radicular das plantas.

Cada plântula foi acondicionada em potes estéreis e transparentes de PVC (20x10 cm), e posteriormente, adicionamos uma larva de *C. cubana*. Posteriormente, o pote foi fechado com uma película de filme PVC transparente com 10 microfuros que permitissem a troca de ar com o meio externo, e para evitar o processo de exsudação das plantas. Além disso, também oferecemos uma fonte de água para as larvas, através de chumaços de algodão embebidos em água destilada colocados no fundo do pote. As larvas utilizadas encontravam-se no segundo instar, e esta escolha foi baseada na mortalidade natural observada em larvas de estágios anteriores (AMARAL, 2013). As larvas selecionadas foram alimentadas com ovos de *A. kuehniella* durante o período anterior aos testes. Ao serem selecionadas para os testes, elas permaneciam sem alimentação por 24h anteriores à montagem dos testes.

Os tratamentos foram definidos da seguinte forma: (a) plântulas de milho convencional DKB 390 + água; (b) plântulas de milho transgênico DKB 390 Pro Yeldgard® +

água; (c) plântulas de soja convencional BRS MG917 + água; (d) plântulas de soja transgênicas M5917 IPRO® + água; (e) ovos de *A. kuehniella* + água destilada (controle positivo); (f) água (controle negativo). A sobrevivência das larvas foi monitorada diariamente no período da manhã, nos horários de 10 às 12h. Foram realizadas 25 repetições em cada um dos tratamentos descritos e a unidade experimental foi definida por uma larva de *C. cubana*, mantida em recipiente fechado com uma das plântulas ou com um dos controles.

2.4 Identificação de proteína Cry em soja e milho transgênicos

Após a realização das análises de sobrevivência previamente realizadas com oferta de plantas convencionais e transgênicas, nós coletamos as larvas mortas de *C. cubana* e armazenamos individualmente em tubos do tipo *Eppendorf*, onde permaneceram congeladas em freezer a -20°C. Posteriormente, as larvas foram pesadas e suas massas registradas.

As análises de proteínas foram divididas em duas etapas: na primeira, utilizamos as larvas mortas para avaliarmos a presença da proteína Cry1Ac, presentes na soja transgênica, utilizadas no experimento de sobrevivência. Para esta análise, utilizamos o kit de identificação QualiPlate para detecção de proteína Cry1Ab/Cry1Ac. Na segunda etapa, realizamos a identificação e quantificação da proteína Cry2Ab, referente ao milho transgênico utilizado na análise de sobrevivência. Para esta, utilizamos o kit Quanti-Plate de Detecção de proteínas Cry2A. Ambos os kits utilizados foram adquiridos na empresa Enviroligix®. A diferença de análise entre os kits utilizados para milho e soja se deram em virtude da disponibilidade dos produtos no mercado: para Cry 1Ac, apenas estão disponíveis reagentes que funcionam de maneira qualitativa para detecção desta proteína em questão, ao passo que para Cry 2Ab foi possível encontrar opções quantitativas.

Para a identificação da proteína Cry1Ac, maceramos com auxílio de um pistilo estéril, a larva alimentada com soja transgênica dentro do seu próprio tubo *Eppendorf* com adição de 150µl de *Leaf Extraction Buffer (Wash Buffer+Tween20)*. Submetemos cada amostra do material a 10 segundos no *Vortex* para homogeneizar a mistura. Posteriormente, utilizamos uma placa de reação, acrescentamos a cada poço 50µl de *Cry1Ab/Cry1Ac Enzyme Conjugate* + 50µl de *Extraction Buffer Blank* + 50µl de *Cry1Ab Positive Control* e 50µl da amostra preparada com as larvas. Repetimos este protocolo para as 25 amostras obtidas após maceração. Em sequência, vedamos todos os poços com *Parafilm*® e utilizamos um shaker orbital para agitar o conteúdo da placa por 2 horas, a 200rpm.

Após o período de incubação, descartamos o conteúdo dos poços e realizamos a lavagem com água destilada de cada poço, por quatro vezes. Em seguida, acrescentamos

100µl de Substrate em cada célula da placa e aguardamos 30 minutos, e para finalizar o processo adicionamos 100µl de Stop Solution. Nesta última etapa, o material contido na placa apresentou coloração amarelada, indicando a finalização da reação. Esta mesma placa foi imediatamente levada para leitura em Espectrofotômetro, com leitura ajustada para a placa Costar e submetida a leitura a 450nm.

Para identificarmos a presença da proteína Cry2Ab, realizamos uma maceração semelhante das larvas, com adição 150µl de 1XExtraction/Dilution Buffer em cada tubo. Levamos as amostras ao Vortex[®] por 10s para homogeneizar a mistura. Sequencialmente, aplicamos em cada célula da placa de reação 100µl do Negative Control + 100µl de cada calibrador (1.0 ppb Cry2Ab calibrator, 5.0 ppb Cry2Ab calibrator, 10 ppb Cry2Ab calibrator) e 100µl da amostra obtida com a maceração. Repetimos o mesmo protocolo para as 25 amostras submetidas a análise.

2.5 Análise estatística

Nós realizamos as representações gráficas das curvas de sobrevivência de *C. cubana* para os diferentes tratamentos utilizando a função `survfit` do pacote “survival”, com base no modelo de sobrevivência proposto por Kaplan-Meier (THERNEUAU et al., 2009). Os modelos de sobrevivência foram calculados através da função `survreg` do pacote “survival”. Para a escolha do modelo com a distribuição que melhor se ajustasse aos nossos dados, nós fizemos a seleção de modelos através do AIC (Akaike’s Information Criterion). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Development Core Team, 2012) na versão 3.5.2 (CRAWLEY, 2012).

3. RESULTADOS

3.1 Sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas com milho e soja convencionais e transgênicos

Houve diferença na sobrevivência das larvas de *C. cubana* quando contrastadas as diferentes fontes de alimento ($X^2= 530,24$, $gl= 7$, $p<0,01$). A fonte de alimento que proporcionou a maior sobrevivência das larvas foram os ovos de *A. kuehniella*, ao passo que ‘água’ propiciou o menor tempo de sobrevivência. Não houve diferença significativa entre os valores encontrados para a sobrevivência de larvas de *C. cubana* quando comparados milho convencional, milho transgênico, soja convencional e soja transgênica. No entanto, todos os tratamentos que expuseram as larvas de *C. cubana* à alimentação com plantas de milho e soja

resultaram em diferenças significativas de sobrevivência em relação à ausência de alimento (água, controle negativo) (Figura 2) ($p < 0,01$)

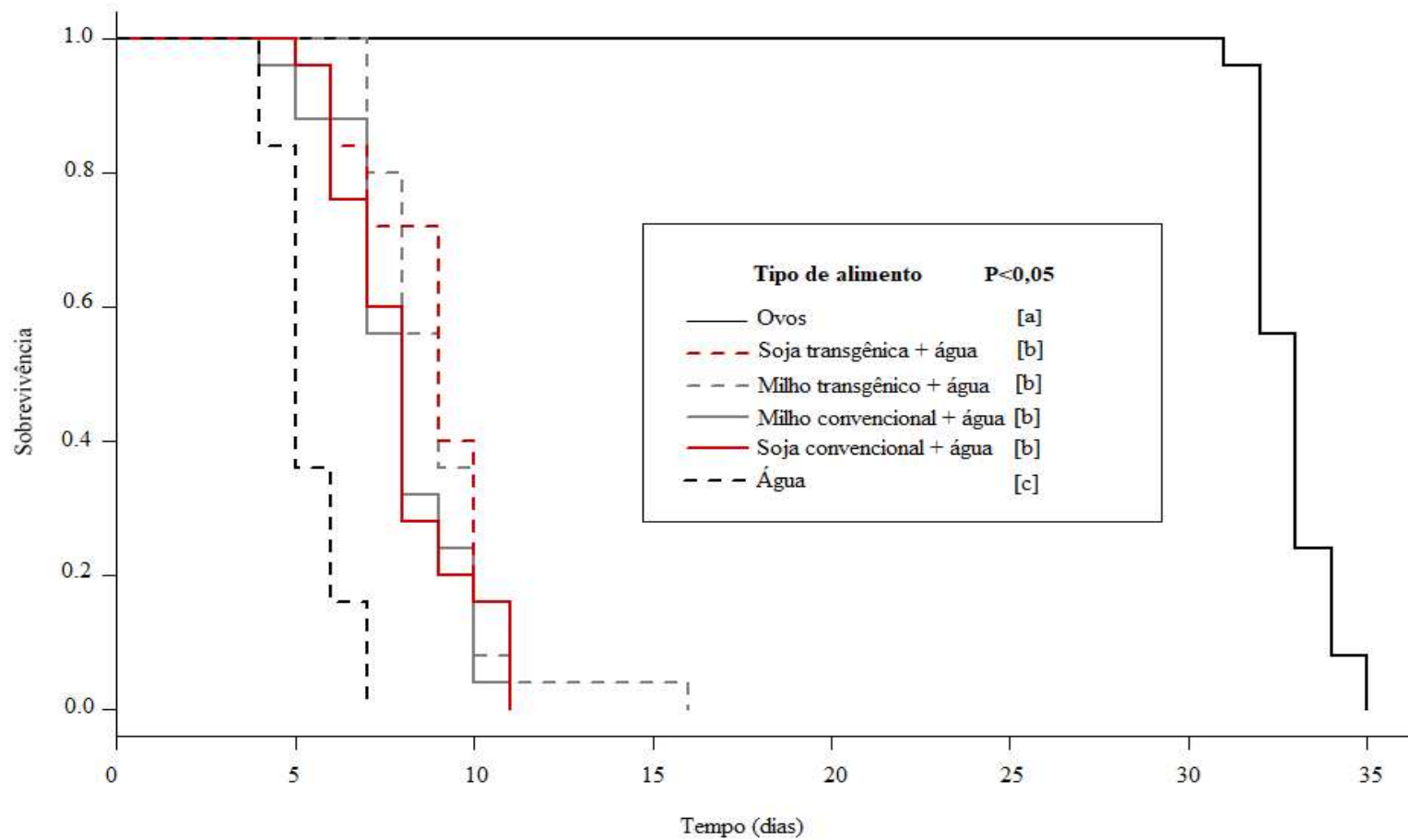


Figura 2: Sobrevivência de larvas de *C. cubana* alimentadas com diferentes fontes de alimento com base em modelo de Kaplan Meier. Categorias seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,01$ pela análise de contraste (método Tukey))

3.2 Presença de proteínas Cry 1Ac em larvas de *C. cubana* alimentadas com soja transgênica

Ao realizar o protocolo de identificação de proteínas proposto pelo kit, nós observamos que as larvas que se alimentaram de plantas transgênicas de soja foram reativas no teste qualitativo. Este teste proporciona a detecção visual da presença da proteína Cry 1Ac, percebida pela coloração amarela observada ao final da avaliação. Por se tratar de um teste qualitativo, não é possível quantificar a proteína absorvida pelo inseto. No entanto, ao se comparar com as larvas que se alimentaram de plantas convencionais, observamos que estas não apresentaram mudança de cor, sugerindo a ausência de absorção da proteína (Figura 3).

Na Figura 3, os 25 primeiros poços referem-se às larvas alimentadas por soja convencional, enquanto os 24 seguintes são relativos às larvas alimentadas por soja transgênica. O penúltimo poço, destacado pela cor azul, representa o controle positivo do teste (composto pela enzima Cry1Ac conjugada), enquanto o último poço representa o controle negativo (ausência de proteína Cry1Ac) (Figura 3).

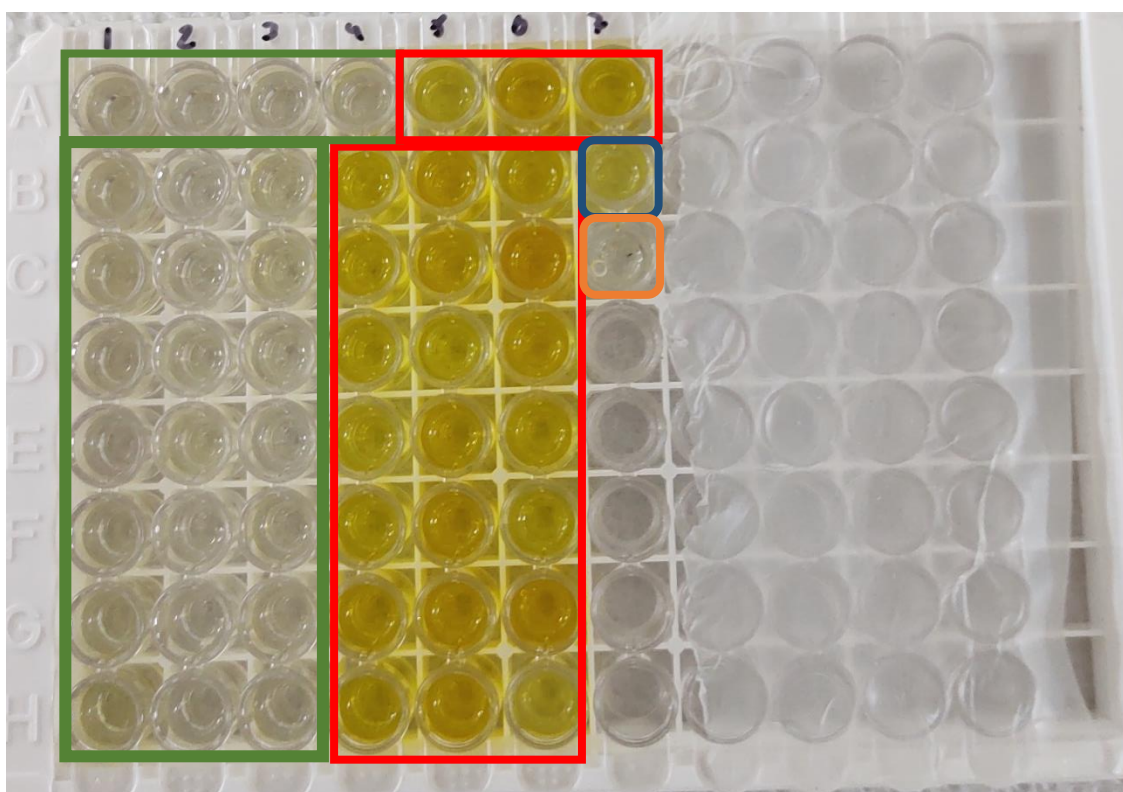


Figura 3: Resultado de teste para identificação de proteína Cry1Ac em larvas após consumirem folhas de soja transgênica e soja convencional. O grupo de poços marcados pela cor verde representa o grupo de insetos que se alimentaram de plantas convencionais, enquanto o grupo vermelho, os insetos que consumiram material transgênico. O grupo de cor azul representa o controle positivo, enquanto o alaranjado o controle negativo.

3.3 Quantificação de proteínas Cry2Ab em larvas de *C. cubana* alimentadas com milho transgênico

Para quantificar a concentração de proteínas absorvida por larvas de *C. cubana* ao se alimentarem com plântulas de milho, nós criamos uma curva padrão de concentração com base nos valores observados pela OD (absorbância) do espectrofotômetro e os padrões provenientes do kit de análise (Figura 4).

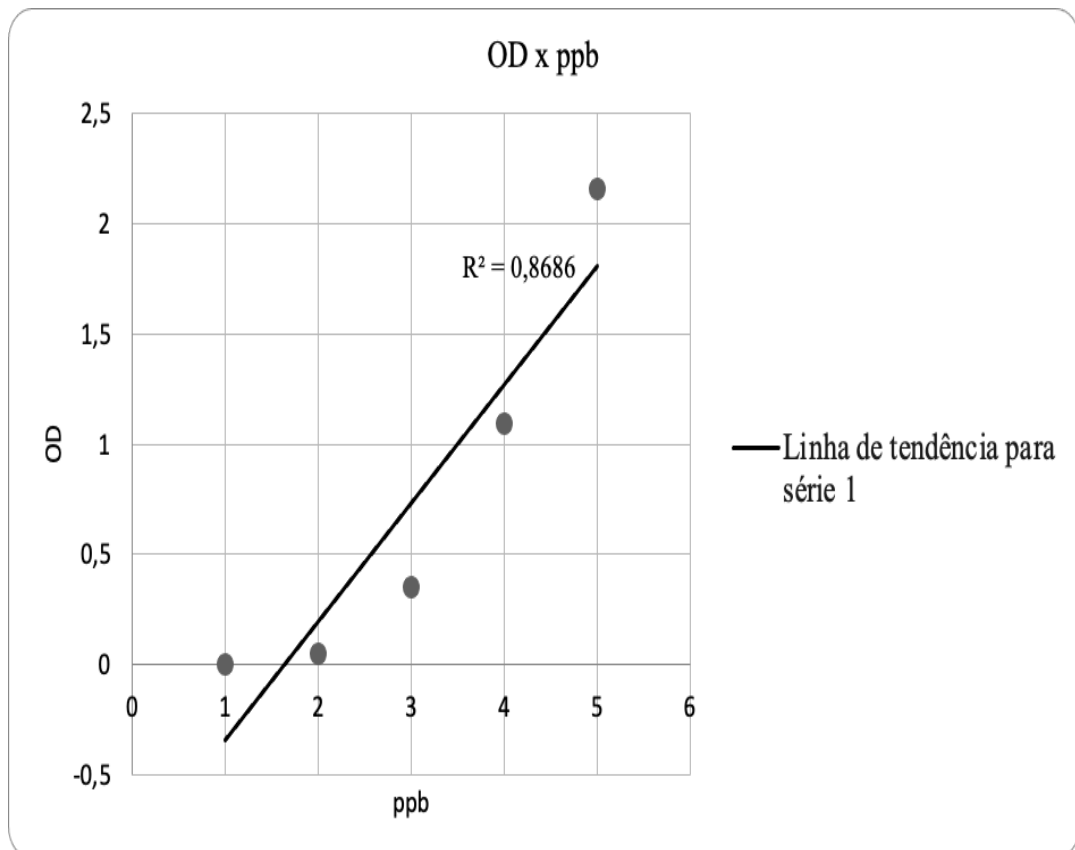


Figura 4: Curva padrão de absorção criada para parâmetro de quantificação de proteína Cry2Ab presente em larvas de *C. cubana* alimentadas com milho transgênico. Em X, temos a absorbância apresentada no espectrofotômetro e em Y o valor correspondente a concentração de proteína em ppb (partes por bilhão)

Com base nestes resultados, foi possível quantificar a proteína Cry 2Ab presente individualmente em cada larva (Figura 5). A média de absorção observada foi de 120,18 ppb por larva, com desvio padrão de 78,78.

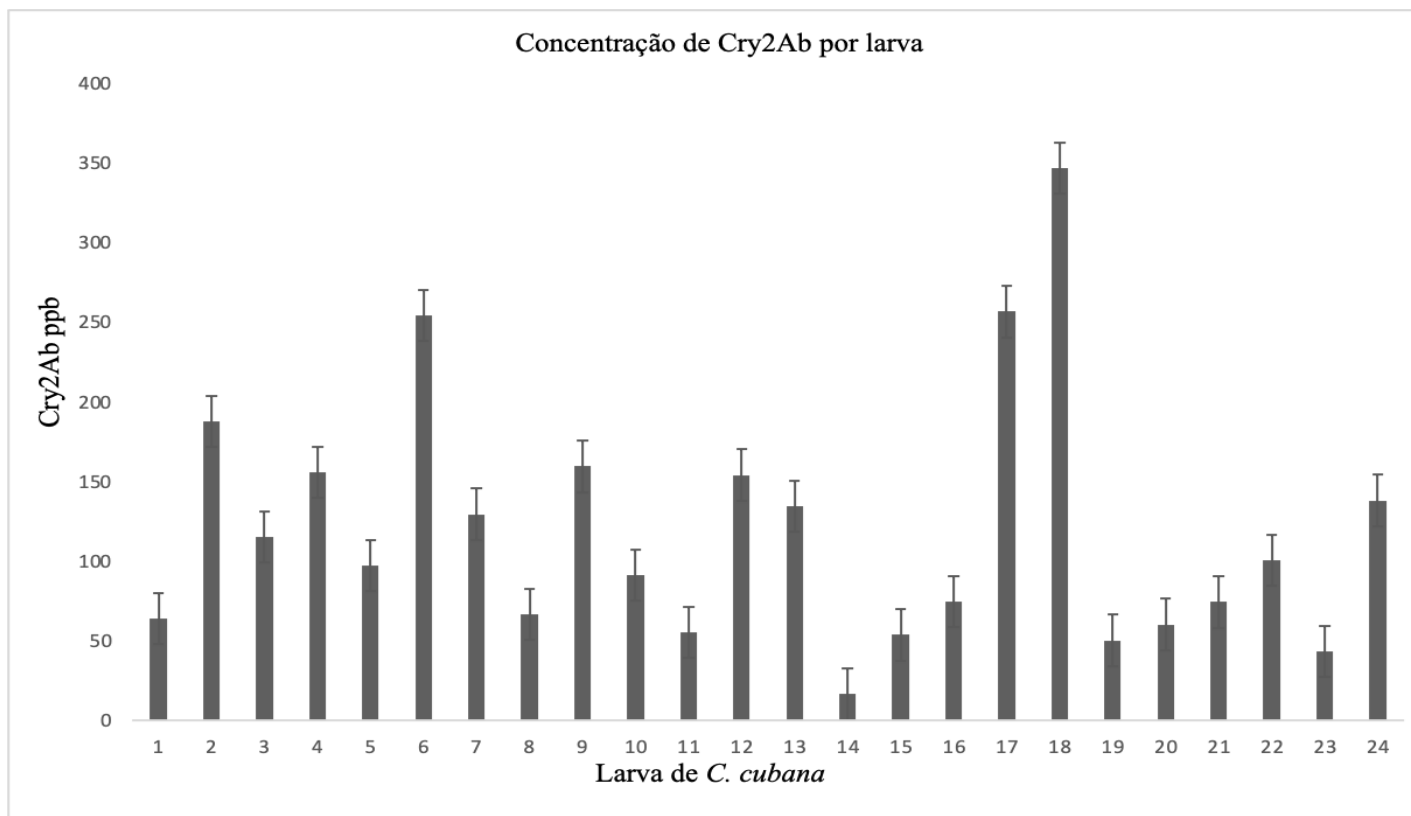


Figura 5: Concentração de proteína Cry2Ab em ppb por larva de *C. cubana* após alimentação com folhas de milho transgênico.

4. DISCUSSÃO

De acordo com resultados dos nossos experimentos de sobrevivência larval de *C. cubana*, nós observamos que os insetos que se alimentaram de plantas transgênicas apresentaram sobrevivência equivalente aos que consumiram plantas convencionais (i.e. sem a presença de transgenia). Uma das prováveis causas deste resultado pode estar relacionada a alta especificidade de ação da bactéria *B. thuringensis* em insetos alvo, tais como pH mesentérico e a necessidade de presença de receptores para proteínas Cry no intestino dos insetos. Assim, sugere-se que este conjunto de condições fisiológicas não é observado no predador *C. cubana*. Por conseguinte, estudos acerca da interferência de proteínas de *B. thuringiensis* em organismos não-alvo normalmente demonstram altos índices de segurança com relação a organismos polívoros que se alimentam tanto de pólen quanto de outros herbívoros, como o caso dos predadores (FEDERICI, 2016; RODRIGO-SIMÓN et al., 2006).

Neste trabalho, identificamos a alimentação de *C. cubana* direta sobre tecido foliar de plantas de milho e de soja, fato antes desconhecido. Sendo assim, constatamos que, na ausência de alimentos, as larvas utilizam este recurso não convencional como alternativa alimentar. Além disso, é importante ressaltar que não houve recusa alimentar por parte das larvas em virtude da transgenia das espécies de plantas ofertadas: tanto as plantas convencionais quanto as transgênicas foram consumidas. Apesar deste comportamento ter sido observado por Limburg et al (2001) e por Batista (2017) não havia comprovações de que o tecido foliar havia sido efetivamente absorvido por larvas de crisopídeos (LIMBURG; ROSENHEIM, 2001). Como indício de alimentação por parte dos insetos, nós utilizamos os testes de detecção de proteínas como prova. Tanto para a soja como para o milho, que apresentam em seu genoma as proteínas Cry, observamos resultados positivos para ingestão de substâncias foliares.

Em virtude dos resultados de sobrevivência encontrados para as larvas de *C. cubana*, os quais demonstram equivalência na sobrevivência de larvas alimentadas com transgênicos e plantas convencionais de soja e milho, certamente houve consumo foliar por parte dos insetos em ambos os tipos de plantas. Assim sendo, é importante considerar que o predador pode fazer uso de recursos foliares de plantas que expressam as proteínas do tipo Cry avaliadas. Embora o uso de recursos foliares na alimentação de *C. cubana* tenha sido confirmada por testes moleculares e estatísticos, as evidências visuais desta alimentação são dificilmente observadas, isto porque não ocorre redução da área foliar após a alimentação, nem danos na

mesma. Este fato pode ser explicado pelo aparelho bucal em formato de pinça encontrado na fase larval do predador, o qual não é considerado o mais propício para consumo de material vegetal, mas sim para predação e absorver o conteúdo interno de suas presas.

Neste contexto, também surge um ponto de discussão interessante acerca da segurança de implementação de transgênicos no controle biológico de pragas: mesmo que larvas de *C. cubana* façam uso de recursos foliares para sua alimentação, a presença de endotoxinas Cry1Ac e Cry2Ab2 não interfere na sua sobrevivência, como mostram os resultados dos nossos testes de sobrevivência com plantas transgênicas e convencionais como fonte alimentar. Em relação à quantidade de proteína absorvida pelas larvas de *C. cubana*, não existem trabalhos registrados que avaliem a concentração desta toxina absorvida diretamente pelas folhas de milho com a proteína Cry2Ab, no entanto, nossos resultados apontam que em média, cada larva consegue absorver 78,78 ppb de proteínas.

5.0 REFERÊNCIAS

AMARAL, D. S. S. L. et al. Non-crop vegetation associated with chili pepper agroecosystems promote the abundance and survival of aphid predators. **Biological Control**, v. 64, n. 3, p. 338–346, 2013.

BATISTA, M. C. et al. Basil (*Ocimum basilicum* L.) attracts and benefits the green lacewing *Ceraeochrysa cubana* Hagen. **Biological Control**, v. 110, n. December 2016, p. 98–106, 2017.

BANCO DE DADOS ISAAA (2021). Banco de dados de aprovação de GM recuperados em 29 de janeiro de 2021. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/approvedeventsin/default.asp?CountryID=BR&Country=Brazil>

BORGES, I. et al. Prey availability in time and space is a driving force in life history Evolution of predatory insects. **Evolutionary Ecology**, v. 47, p. 1307-1319, 2011.

COOL, M.; GUERSHIN, M. Omnivory in terrestrial arthropods: Mixing plant and prey diets. *Annual Review of Entomology*

CRAWLEY, M. J. Statistical modelling. **The R Book**, Second Edition, p. 388-448, 2012.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193–199, 2001.

EUBANKS, M. D.; STYRSKY, J. D.; DENNO, R. F. The evolution of omnivory in heteropteran insects. *Ecology Society of America*, v. 84, n. 10, p. 2549-2556, 2003.

FEDERICI, B. A. Effects of Bt on Non-Target Organisms Effects of Bt on Non-Target Organisms. v. 9025, n. January, p. 10–30, 2016.

GLASER, J. A.; MATTEN, S. R. Sustainability of insect resistance management strategies for transgenic Bt corn. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1-2, p. 45-49, 2003.

LI, Y. et al. Bt rice producing Cry1C protein does not have direct detrimental effects on the green lacewing *Chrysoperla sinica* (Tjeder). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1391–1397, 2014.

LI, Y. et al. Consumption of Bt maize pollen containing CryIIe does not negatively affect *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). **Toxins**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2017.

LI, Y.; MEISSLE, M.; ROMEIS, J. Consumption of Bt Maize Pollen Expressing Cry1Ab or

Cry3Bb1 Does Not Harm Adult Green Lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. 1–8, 2008.

LIMBURG, D. D.; ROSENHEIM, J. A. Extrafloral nectar consumption and its influence on survival and development of an omnivorous predator, larval *Chrysoperla plorabunda* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, v. 30, n. 3, p. 595–604, 2001.

NODARI, R. O.; GUERRA, M.P. Transgenic plantas and their products: Effects, risks and food safety (Biosafety of transgenic plants). **Revista de nutrição**, v. 16, n. 1, p. 105-116, 2003.

QAIM, M. The Economics of Genetically Modified Crops. 2009.

RAYMOND, B. et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189–194, 2010.

RESENDE, D. C. et al. Does Bt maize cultivation affect the non-target insect community in the agro ecosystem? **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 82–93, 2016.

RODRIGO-SIMÓN, A. et al. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: A toxicological, histopathological, and biochemical analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1595–1603, 2006.

ROMEIS, R. G. et al. Using Resistant Prey Demonstrates That Bt Plants Producing Cry1Ac , Cry2Ab , and Cry1F Have No Negative Effects on *Geocoris punctipes* and *Orius insidiosus*. p. 242–251, 2014.

TIAN, J. C. et al. Bt Crops Producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F Do Not Harm the Green Lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 4–9, 2013.

CONCLUSÕES GERAIS

Nossos resultados demonstram que a presença das plantas espontâneas testadas favorece a sobrevivência e conseqüente permanência do predador *C. cubana* em campo. Apesar das espécies de plantas avaliadas não serem consideradas ideais para atenderem as exigências nutricionais das fases adultas, as larvas sobrevivem utilizando somente os recursos oferecidos pelas plantas (pólen, néctar) das espécies *B. pilosa* (picão) e *S. oleraceus* (serralha).

Além disso, o mentrasto sem flores (*A. conizoydes*) foi uma fonte de alimento utilizada pelas larvas de *C. cubana*, as quais se alimentaram do conteúdo celular vegetal desta planta. Apesar do seu aparato bucal não permitir o consumo de tecido foliar, constatamos que as larvas do predador *C. cubana* foram capazes de pinçar as folhas e absorver os recursos nutricionais ali presentes. Esta constatação contribui para um maior entendimento dos hábitos alimentares deste crisopídeo quando a disponibilidade de presas é reduzida, uma vez que os ambientes agrícolas são bastante mutáveis.

Além disso, outro fator importante acerca de *A. conizoydes* está na sua capacidade de hospedar insetos-praga que são comumente consumidos pelas larvas de crisopídeos em ambiente natural, como por exemplo os insetos da família Aleyrodidae, Aphididae e Thripidae. Esta característica favorece a diversificação alimentar dos predadores, favorecendo seu desenvolvimento durante o estágio larval. Assim, a manutenção de plantas espontâneas em campo, em especial *Bidens pilosa*, *A. conyzoides* e *S. oleraceus* é uma estratégia de diversificação bastante favorável ao desenvolvimento do inseto predador *C. cubana*, pois elas por si só são capazes de nutrir as larvas do predador, seja por alimentação direta realizada nas flores e o tecido foliar ou por captura de presas que nelas se refugiam.

Além de plantas espontâneas, as larvas de *C. cubana* também são capazes de utilizarem o conteúdo celular do tecido foliar de milho e soja em situações de escassez de alimento. Nosso estudo também demonstrou que as proteínas Cry1Ab e Cry2Ab2, expressas em soja e milho transgênicos, respectivamente, não alteram a sobrevivência das larvas de *C. cubana*. Além disso, o conteúdo celular de tecido foliar vegetal utilizado pelo predador *C. cubana* também é uma via possível de ingestão de proteínas. Assim com os crisopídeos, outros predadores podem fazer uso desse recurso. O efeito das proteínas inseticidas, no entanto, deve ser investigado para cada espécie de predador, uma vez estas apresentam grande diversidade, bem como os seus mecanismos de ação igual variados. Além disso, dada a

grande diversidade de proteínas Cry inseticidas conhecidas, também é válida a avaliação dos possíveis efeitos deletérios destas sobre os predadores.