**COMPORTAMENTO DE ESPÉCIES INTEGRANTES DO TERCEIRO NÍVEL
TRÓFICO EM VARIEDADES TRANSGÊNICAS-Bt (*Bacillus thuringiensis*) DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp.)**

CÁSSIA REGINA DEMARCHI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **EVONEO BERTI FILHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: Entomologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Setembro - 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Demarchi, Cássia Regina

Comportamento de espécies integrantes do terceiro nível trófico em variedades transgênicas-Bt (*Bacillus thuringiensis*) de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) / Cássia Regina Demarchi. - - Piracicaba, 2002.

54 p. : il.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Bactéria entomopatogênica 2. Brocas (insetos-nocivos) 3. Cana-de-açúcar – Transgênica 4. Controle biológico 5. Crisopídeo – Predador 6. Inseto-parasitóide 7. Pulgão I. Título

CDD 633.61

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ao inesquecível Dennis Leandro Sinisgalli (In memoriam)
que fez parte desta trajetória, com grande carinho

DEDICO.

A meus pais,

Maria Augusta e

José Sergio

OFEREÇO.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Evoneo Berti Filho pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência por toda esta jornada.

Ao Dr. Enrico de Beni Arrigoni, pela co-orientação e ensinamentos transmitidos no decurso deste trabalho.

Ao grande companheiro de estudos, Dr. Luciano José Ribeiro pelo imenso apoio, amizade e disposição em me auxiliar neste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Edilene, João, pela ajuda e amizade estabelecida.

Aos técnicos do laboratório da COPERSUCAR, Sueli, Maria Inês, Cássia, Tatiana e Genoveva pelo imenso apoio e amizade.

Aos funcionários de campo da COPERSUCAR Tuca e Totó, pela imensa ajuda e apoio nos experimentos de campo.

Às estagiárias Milene, Keila e Adriana pela ajuda, dedicação e amizade estabelecida.

Às minhas amigas que tanto me apoiaram nesta jornada, Milene, Camila, Vanessa, Roberta, Raquel, Luciane e Cleide, pela intensa amizade e paciência.

Ao querido Kleber que tão rapidamente pôde me transmitir carinho e apoio nas horas mais difíceis.

Ao eterno amigo Fernando, que esteve sempre presente nas decisões e pelo apoio em uma grande fase da minha vida.

À ESALQ - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola pela oportunidade oferecida para a realização de mais uma etapa da minha vida profissional.

À FAPESP – Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - pela bolsa de estudos concedida.

À COPERSUCAR – Cooperativa dos produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo – pelo apoio nas pesquisas.

À todos que tiveram a participação direta ou indireta para a realização deste trabalho, agradeço imensamente.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Plantas transgênicas	3
2.2 Biologia de <i>Trichospilus diatraeae</i> (Cherian & Margabandhu, 1942) (Hymenoptera: Eulophidae)	6
2.3 Aspectos biológicos de Chrysopidae	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Teste ELISA	9
3.2 Plantio em telado	10
3.3 Plantio em vasos	12
3.4 Criação do parasitóide <i>Trichospilus diatraeae</i>	12
3.5 Criação do predador <i>Chrysoperla externa</i>	13
3.6 Criação do pulgão <i>Melanaphis sacchari</i>	15
3.7 Broca da cana-de-açúcar <i>Diatraea saccharalis</i>	17
3.8 Testes com <i>Trichospilus diatraeae</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	17
3.8.1 Teste nos telados	17
3.8.2 Testes em laboratório	19
3.9 Testes com <i>Chrysoperla externa</i> e <i>Melanaphis sacchari</i>	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22

4.1 Teste prévio em laboratório com lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i>	22
4.2 Testes com <i>Trichospilus diatraeae</i> em laboratório	25
4.2.1 Longevidade das fêmeas de <i>Trichospilus diatraeae</i>	25
4.2.2 Longevidade da progênie de <i>Trichospilus diatraeae</i>	26
4.2.3 Porcentagem de parasitismo de <i>Trichospilus diatraeae</i> sobre pupas de <i>Diatraea saccharalis</i>	28
4.2.4 Número de descendentes e razão sexual de <i>Trichospilus diatraeae</i>	29
4.3 Testes com <i>Trichospilus diatraeae</i> nos telados	31
4.3.1. Parasitismo de <i>Trichospilus diatraeae</i> em pupas oriundas de plantas transgênicas dos telados	31
4.3.2 Parasitismo da primeira geração de <i>Trichospilus diatraeae</i> originários de fêmeas que emergiram de pupas de <i>Diatraea saccharalis</i> parasitadas nos telados	34
4.4 Ciclo biológico de <i>Chrysoperla externa</i>	37
5 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Croquis dos telados com plantas de cana-de-açúcar	11
2 Copo descartável em vista lateral	13
3 Gaiola de criação de adultos de <i>Chrysoperla externa</i>	14
4 Recipiente plástico para larvas de <i>Chrysoperla externa</i>	15
5 <i>Chrysoperla externa</i> predando massa de ovos de <i>Diatraea saccharalis</i>	15
6 Pulgões <i>Melanaphis sacchari</i> em folha de cana-de-açúcar	16
7 Copos com pedaço de folha de cana-de-açúcar para infestação de pulgões em laboratório. A. Copo demonstrando a disposição das folhas; B. Copo tampado para evitar a fuga dos pulgões	16
8 Teste prévio para escolha de lagartas inoculadas nas plantas dos telados. Em cada placa de petri são colocadas folhas de cana-de-açúcar dos respectivos tratamentos e 5 lagartas de broca, em diferentes ínstares	18
9 Croquis do telado mostrando a disposição dos copos contendo parasitóides	19
10 Número médio de descendentes fêmeas de <i>Trichospilus diatraeae</i>	30
11 Número médio de descendentes machos de <i>Trichospilus diatraeae</i>	30

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> de 1º instar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	22
2 Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> de 2º instar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	23
3 Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> de 3º instar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	24
4 Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> de 4º instar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ$ C, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	25

5 Longevidade média (dias) das fêmeas de <i>Trichospilus diatraeae</i> utilizadas para o parasitismo de 25 pupas fêmeas e 25 pupas machos de <i>Diatraea saccharalis</i> . Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	26
6 Longevidade média e longevidade total da progênie das fêmeas de <i>Trichospilus diatraeae</i> sobre 25 pupas machos e 25 pupas fêmeas de <i>Diatraea saccharalis</i> cujas lagartas se alimentaram de cana-de-açúcar transgênica. Temperatura de $25 \pm 1,0^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10 \%$ e Fotofase 14 h	27
7 Porcentagem de parasitismo de <i>Trichospilus diatraeae</i> em 50 pupas de broca da cana-de-açúcar <i>Diatraea saccharalis</i> (25 pupas fêmeas e 25 pupas machos). Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	28
8 Número médio de descendentes fêmeas e machos e razão sexual total do número de descendentes avaliados em 25 pupas fêmeas e 25 pupas machos de <i>Diatraea saccharalis</i> . Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	29
9 Porcentagem de pupas recolhidas do telado e de pupas parasitadas	32
10 Longevidade de <i>Trichospilus diatraeae</i> do período de ovo a emergência dos adultos sobre pupas parasitadas recolhidas do telado	32
11 Número de fêmeas e machos oriundos de pupas parasitadas no telado e razão sexual	33
12 Longevidade (dias) dos adultos de <i>Trichospilus diatraeae</i> oriundos de pupas parasitadas no telado	33

13	Número médio de fêmeas e machos e razão sexual da primeira geração do parasitóide <i>Trichospilus diatraeae</i> oriundos de fêmeas que emergiram de pupas de <i>Diatraea saccharalis</i> parasitadas e recolhidas do telado. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	35
14	Longevidade média (dias) do período de ovo a adulto dos parasitóides de primeira geração e longevidade dos adultos de <i>Trichospilus diatraeae</i>	36
15	Porcentagem de parasitismo da primeira geração de <i>Trichospilus diatraeae</i> oriunda das pupas parasitadas por fêmeas que parasitaram pupas de broca da cana-de-açúcar nos telados. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	37
16	Longevidade média (dias) das fases imaturas de <i>Chrysoperla externa</i> . Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	38
17	Longevidade (dias) dos adultos de <i>Chrysoperla externa</i> . Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	39
18	Longevidade média (dias) das fases imaturas da primeira geração de <i>Chrysoperla externa</i> . Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	39
19	Longevidade (dias) dos adultos de primeira geração de <i>Chrysoperla externa</i> . Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	40
20	Viabilidade do período de ovo a adulto de primeira geração de <i>Chrysoperla externa</i> . Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	41

21 Comparação da longevidade de <i>Chrysoperla externa</i> e seus descendentes de primeira geração. 1: Geração paternal; 2: Geração F1 (Progenie)	41
22 Comparação da longevidade de <i>Chrysoperla externa</i> e seus descendentes de primeira geração. 1: Geração paternal; 2: Geração F1 (Progenie)	42
23 Comparação da longevidade de <i>Chrysoperla externa</i> e seus descendentes de primeira geração. 1: Geração Paternal; 2: Geração F1 (Progenie)	42
24 Média do número de ovos/fêmea de <i>Chrysoperla externa</i> . Temperatura de $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h	43

**COMPORTAMENTO DE ESPÉCIES INTEGRANTES DO TERCEIRO NÍVEL
TRÓFICO EM VARIEDADES TRANSGÊNICAS-Bt (*Bacillus thuringiensis*) DE
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp.)**

Autor: CÁSSIA REGINA DEMARCHI

Orientador: Prof. Dr. EVONEO BERTI FILHO

RESUMO

Neste trabalho, foram realizados estudos envolvendo a relação tritrófica onde as plantas de cana-de-açúcar transgênica fazem parte do primeiro nível trófico, que alimenta o segundo nível, formado pelos insetos-alvo (neste caso, a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*), os quais possuem inimigos naturais (o parasitóide *Trichospilus diatraeae*), caracterizando o terceiro nível trófico, sendo analisada a longevidade, a fertilidade, a porcentagem de parasitismo e a atratividade da planta transgênica ao parasitóide. Outro teste envolveu o pulgão da cana-de-açúcar *Melanaphis sacchari* (segundo nível trófico), e o predador *Chrysoperla externa* (terceiro nível trófico) sendo que os parâmetros avaliados foram a longevidade, a fertilidade, o período de desenvolvimento e a viabilidade. As pesquisas foram desenvolvidas no Departamento de Entomologia da Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo Ltda (COPERSUCAR), de Piracicaba-SP, que possui o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) – nº 0006-96. Os resultados demonstraram que a

longevidade da progênie de *T. diatraeae* foi maior quando comparada com a longevidade das fêmeas de *T. diatraeae* utilizadas para o parasitismo de pupas da broca da cana-de-açúcar. O número de descendentes de *T. diatraeae* foi semelhante quando comparado com as plantas transgênicas e a testemunha. Nos testes realizados em telado envolvendo o mesma praga e o parasitóide *T. diatraeae* não ocorreram diferenças significativas nos diferentes tratamentos. Experimentos com o predador *C. externa* demonstraram algumas diferenças significativas, na longevidade das larvas de 2^o instar e na fase pupal, enquanto que na primeira geração a diferença significativa foi maior apenas na fase pupal. O número de ovos foi semelhante em todos os tratamentos, e a razão sexual de *C. externa* foi de uma fêmea para um macho.

BEHAVIOR OF THE THIRD TROPHIC LEVEL SPECIES ON TRANSGENIC-Bt (*Bacillus thuringiensis*) SUGARCANE VARIETIES (*Saccharum* sp.)

Author: CÁSSIA REGINA DEMARCHI

Adviser: Prof. Dr. EVONEO BERTI FILHO

SUMMARY

This research deals with the tritrophic relationship involving the transgenic sugarcane plants (*Saccharum* sp.), 1st trophic level, the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*), 2nd trophic level and its pupal parasitoid *Trichospilus diatraeae*, 3rd trophic level. The following parameters of the parasitoid were analyzed: longevity, fertility, percentage of parasitism and attraction to the transgenic plant. Another experiment included the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (2nd trophic level) and its predator, *Chrysoperla externa* (3rd trophic level) for which the following parameters were evaluated: longevity, fertility, period of development and viability. The experiments were set in the Laboratory of Entomology, Cooperative of the Sugarcane, Sugar and Alcohol Producers of the State of São Paulo (“Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo – COPERSEUCAR”), in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil. This Laboratory has the Certificate of Quality in Biosafety (CQB) – number 0006-96. The results have indicated that the longevity of the progenie was longer than that of the female mothers. However the numbers of progenies was similar when transgenic and non transgenic plants were compared. No significant differences

were observed in the different treatments set in the greenhouse. Concerning the predator *C. externa* one observed some significant differences in the longevity of the 2nd instar larvae and in the pupal stage, while in the 1st generation such differences were only observed in the pupal stage. The number of eggs was similar in all the treatments, and the sex ratio was 1:1.

1 INTRODUÇÃO

Plantas como algodão, milho, batata, arroz, cana-de-açúcar, bem como frutíferas e forrageiras, têm sido geneticamente transformadas para diminuir ou impedir a ação de insetos fitófagos e são denominadas plantas transgênicas, porque no seu genoma foram incluídos genes com propriedades inseticidas. No mínimo 18 tipos de plantas transgênicas vêm sendo testadas, destacando-se milho, algodão e batata (Andow & Hutchison, 1998; Federici, 1998; Gould, 1998 e US Department of Agriculture (USDA), 1999).

As plantas transgênicas apresentam resistência a insetos herbívoros e têm grande importância econômica mundial. Mais de 2,8 milhões de hectares de milho-Bt foram plantados nos Estados Unidos em 1998 (Andow & Hutchison, 1998), e em 1999 foram plantados 9,7 milhões, declinando em 2000 para 6,2 milhões de hectares (Obrycki et al., 2001).

Estima-se que, neste ano, a área plantada com produtos transgênicos seja superior a 50 milhões de hectares. Os Estados Unidos e a Argentina detêm 90% dessa área. No Brasil, estão sendo desenvolvidas pesquisas em algumas empresas, destacando-se o trabalho realizado pela COPERSUCAR para obter plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificada.

Como o controle natural destes insetos fitófagos é feito pelos inimigos naturais (parasitos, predadores e patógenos), surge a questão da influência das plantas transgênicas nestes organismos.

Em termos ecológicos, ocorrem três níveis tróficos: a planta (1º nível trófico), o inseto praga (2º nível trófico) e os inimigos naturais (3º nível trófico) (Powell et al.,

1996). Assim destaca-se a importância da planta para o 3º nível trófico e seu potencial de influenciar o controle biológico (Price et al., 1980).

Neste trabalho foi estudada a influência de plantas transgênicas de cana-de-açúcar no 3º nível trófico do agroecossistema canavieiro, usando-se o parasitóide pupal *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) atuando sobre a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* criada em cana-de-açúcar transgênica, analisando a longevidade, a fertilidade, a porcentagem de parasitismo e a atratividade da planta transgênica ao parasitóide e o comportamento do predador *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) predando o pulgão da cana-de-açúcar *Melanaphis sacchari* também criado em cana-de-açúcar transgênica. Os parâmetros avaliados foram a longevidade, a fertilidade, o período de desenvolvimento e a viabilidade.

No Brasil, não há relatos de trabalhos com predação de *C. externa* em pulgões em plantas transgênicas, por isso este trabalho pioneiro foi de extrema importância, para avaliar os efeitos da cana-de-açúcar transgênica na capacidade de predação do crisopídeo. Também foi de grande importância o estudo do comportamento de *T. diatraeae* parasitando pupas de *D. saccharalis*, cujas lagartas se alimentaram de cana-de-açúcar transgênica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Transgênicas

Todas as plantas transgênicas resistentes a insetos, expressam genes derivados da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Schuler et al., 1998). Bt é uma bactéria de solo que produz cristais de proteína, também chamados de δ -endotoxinas, e tem sido utilizada como inseticida microbiano desde 1950 (Feitelson et al., 1992).

Durante este tempo, os efeitos de Bt sobre inimigos naturais têm sido investigados (Flexner et al., 1986; Melin & Cozzi, 1989; Croft & Flexner, 1990). Alguns resultados indicam que estas pesquisas são inconsistentes. Enquanto em alguns experimentos não há ocorrência de efeitos adversos do uso de Bt, em outros há efeitos subletais para alguns inimigos naturais (Melin & Cozzi, 1989; Croft & Flexner, 1990; Giroux et al., 1994). Fungos entomopatogênicos e parasitóides, com diferentes ciclos de vida, podem ser afetados por plantas resistentes a pragas e portanto interações interespecíficas podem sofrer influências do primeiro nível trófico (Price et al., 1990; Dickson & Whitham, 1996). Segundo Obrycki et al. (2001) podem ocorrer efeitos diretos, na relação planta e inimigo natural, onde a relação direta com a bactéria *B. thuringiensis* pode trazer danos ao inimigo natural, como por exemplo o caso de inimigos naturais que se alimentam de pólen e néctar de plantas transgênicas. Podem ocorrer também efeitos indiretos, onde a relação envolve o inseto praga, - alimentado com planta transgênica - alvo do inimigo natural. A presa quando se alimenta de planta transgênica e sobrevive geralmente tem peso ou tamanho menor, e conseqüentemente poderia afetar o inimigo natural.

Há diferentes δ -endotoxinas, com distintos espectros inseticidas. Por exemplo, as proteínas Cry1A e Cry1C são específicas para larvas da ordem Lepidoptera, já a proteína

Cry3A é tóxica para a ordem Coleoptera, (Koziel et al., 1993) particularmente para crisomelídeos (Herrnstadt et al., 1986; MacIntosh et al., 1990; Bauer, 1990). As δ -endotoxinas são protoxinas produzidas pelas bactérias, que são solubilizadas e ativadas por proteinases nos insetos, causando danos severos ao epitélio do mesêntero (Gill et al., 1992). Comumente plantas com Bt podem apresentar altos níveis de resistência às pragas das ordens Lepidoptera e Coleoptera (Peferoen, 1997). As protoxinas de Bt usadas em inseticidas microbianos, em geral, não foram consideradas tóxicas para parasitóides, apesar de algumas exceções (Flexner et al., 1986; Croft & Flexner, 1990).

Alguns aspectos fisiológicos, ecológicos e de comportamento são governados pela interação com organismos de outros níveis tróficos (planta hospedeira - presa - predador ou parasitóide) (Francis et al., 2001). A influência das plantas hospedeiras na eficiência de agentes de controle biológico, como os predadores, tem sido muito investigada. Os aleloquímicos produzidos pelas plantas hospedeiras podem influenciar a sobrevivência e o desenvolvimento larval, bem como o peso de adultos de coccinelídeos predadores (Hauge et al., 1998). Estudos indicam que as plantas com genótipos resistentes, afetam negativamente o terceiro nível trófico (Powell & Lambert, 1984; Orr & Boethel, 1985; El-Heneidy et al., 1988; Isenhour & Wiseman, 1989; Rice & Wilde, 1989). Toxinas de plantas, podem ser transmitidas aos insetos pragas e aos predadores dos insetos (Price et al., 1980). O ichneumonídeo, *Hyposoter exiguae* (Viereck), parasitóide de *Heliothis zea* (Boddie), é intoxicado por um antibiótico do tomateiro, a alpha-tomatina, resultando em um aumento significativo da duração larval, redução da emergência e peso dos adultos (Campbell & Duffey, 1979b). A resistência em plantas de soja resultou em redução na emergência de parasitóides adultos (Herzog & Funderburk, 1985). A resistência em cultivares de trigo causou 5% de redução no afídeo *Metopolophium dirhodum* e resultou em 34% de redução do peso e 26% de redução da fecundidade do parasitóide braconídeo *Aphidius rhopalosiphi* (van Emden, 1995). Após um número de gerações, parasitóides adultos emergiram dos hospedeiros decrescendo de 90% para 70% com o uso de plantas resistentes e a proporção de fêmeas diminuiu de 54% para 44% (Campbell & Duffey, 1979a; Barbosa & Saunders, 1995). Chapman & Hoy (1991) relataram aumento da mortalidade de ácaros predadores quando ácaros fitófagos foram tratados com Bt. A

presença da proteína de Bt varia em relação ao inseticida comercial Bt. Segundo Perlak et al. (1990); Fujimoto et al. (1993) e Koziel et al. (1993) as proteínas de Bt são produzidas em altos níveis por todo o tecido verde da planta transgênica e, dependendo do promotor, também em pólen, sementes, raízes e outras partes da planta. Em dois anos de estudo, Pilcher (1999) encontrou uma grande quantidade do parasitóide *Macrocentris cingulum* em milho-Bt e livre de Bt. Após uma diminuição da praga alvo, ocorreu redução de 30 a 60% no número de adultos em campos transgênicos. No estudo realizado por Losey et al. (1999) com a borboleta monarca (*Danaus plexippus*) observou-se que após 96 horas as lagartas apresentaram alta mortalidade (44%) quando alimentadas com pólen de milho-Bt. Após 48 horas, a mortalidade foi de 20%, comparado a 0% quando a lagarta não foi exposta ao pólen de milho-Bt. Jesse & Obrycki (2001) afirmaram que a mortalidade de lagartas de *D. plexippus* quando expostas a 135 gramas de pólen/cm² por 48 horas foi de 60 a 70%. Nenhum efeito subletal foi observado nos adultos de *D. plexippus* oriundos das lagartas que sobreviveram 48 horas após a exposição a três concentrações diferentes de pólen de milho-Bt.

Hilbeck et al. (1998) demonstraram que Cry1A(b) foi tóxico a *Chrysoperla carnea* a 100 µmg/ml de dieta artificial encapsulada e a mortalidade foi alta, cerca de 43 a 57 % para larvas de primeiro ínstar até a pupação e emergência do adulto, respectivamente. Segundo New (1975) as larvas de *C. carnea* são importantes inimigos naturais em alguns sistemas de agricultura por todo o mundo além de serem citadas por Croft & Flexner (1990) como a espécie mais comumente utilizada em testes com inseticidas. Croft (1990) notou que os impactos letais e subletais de Bt em inimigos naturais não ocorreu apenas pelo efeito da proteína, mas também pelo efeito da qualidade nutricional da presa.

Um trabalho desenvolvido, por Sims (1995) demonstra que a proteína CryIA(c) na proporção de 20 µg/ml, concentrada em dieta, não têm efeito tóxico para insetos benéficos como *Apis mellifera*, *C. carnea*, *Hippodamia convergens* e *Nasonia vitripennis*. Estes insetos apresentaram comportamento normal durante os testes. Porém, a pesquisa desenvolvida por Vandenberg (1990) demonstrou que um evento de milho-Bt

(var. *tenebrionis*), específico para insetos da ordem Coleoptera, causou mortalidade significativa em abelhas. Outro estudo indicou que proteínas de milho-Bt encontradas no pólen da planta e específicas para insetos da ordem Coleoptera e Lepidoptera, interferiram na ação das abelhas (Picard-Nioi et al., 1997). Giroux et al. (1994) demonstraram que o Bt de inseticidas não causou efeitos tóxicos ao predador *Coleomegilla maculata*. Segundo Warren et al. (1992) a atividade de parasitismo sobre larvas de *Heliothis* aumentou em plantas de fumo transgênicas, mas a diferença não foi significativa.

Zwahlen et al. (2000) demonstraram que não há diferença significativa na mortalidade de ninfas do predador *Orius majusculus* quando alimentadas com larvas de *Ostrinia nubilalis* livres de *Bacillus thuringiensis* e quando alimentadas com larvas que consumiram milho Bt.

2.2 Biologia de *Trichospilus diatraeae* (Cherian & Margabandhu, 1942) (Hymenoptera: Eulophidae)

A espécie *T. diatraeae*, originária da Ásia, é um endoparasitóide de pupas de Lepidoptera e tem sido importante no controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, algodão e milho, em países da Ásia, África e das Américas (Boucek, 1976). *T. diatraeae* é considerado polífago (Bournier, 1975). O acasalamento ocorre imediatamente após a emergência dos adultos, e o macho acasala com várias fêmeas. Logo após a cópula, a fêmea realiza a oviposição, movimentando-se sobre a pupa, tocando-a com as antenas, e finalmente perfurando-a com o ovipositor. A produção de progênie é extremamente alta, resultando em média, 114 indivíduos/fêmea em apenas 5 dias (Paron, 1999).

Bordat et al. (1977) determinaram que a duração do período de ovo a adulto de *T. diatraeae* foi de 17 a 18 dias em pupas de broca das gramíneas, *Chilo suppressalis*, na África. Segundo Paron (1999), o período de desenvolvimento de *T. diatraeae* de ovo até a emergência do adulto é de 19 dias nas condições experimentais a 25° C, com 70 ± 10% de umidade relativa e 14 horas de fotofase.

2.3 Aspectos biológicos de Chrysopidae

Os neurópteros da família Chrysopidae constituem importantes agentes de controle biológico em diferentes culturas anuais, perenes e em casas de vegetação (New, 1975; Ridgway & Murphy, 1984). Os crisopídeos são predadores polífagos e cosmopolitas. Seu potencial de predação pode estar relacionado à fase larval e/ou adulta, sendo mais comum na maioria das espécies, a predação durante a fase larval. Os adultos alimentam-se de pólen e “honeydew” excretado por pulgões (Moraes, 1989).

Segundo Ridgway & Murphy (1984), os crisopídeos atuam em diversos agroecossistemas, sendo eficientes tanto no controle biológico natural, como em liberações inundativas. Segundo Nunez (1998) e Daane et al. (1996) os crisopídeos apresentam uma vasta distribuição geográfica, habitats variados, ampla diversidade de presas, grande capacidade de busca, alta voracidade e um elevado potencial reprodutivo, aliadas à facilidade com que podem ser criados em laboratório e à seletividade que muitas espécies apresentam a certos produtos fitossanitários, o que favorece sua utilização em programas de controle biológico aplicado. Segundo Ridgway & Kinzer (1974) para que um programa de controle biológico seja eficiente, estudos prévios envolvendo aspectos relacionados à dinâmica predador-presa são necessários. Nos EUA, Ridgway & Jones (1969) obtiveram resultados satisfatórios com liberações inundativas de *Chrysopa carnea*, em algodoeiro, no controle de *Heliothis* spp. Na URSS as liberações têm sido prioritárias para o controle de afídeos no campo e em casas de vegetação, de acordo com Ridgway & Murphy (1984) e Tulisalo (1984). Entre os crisopídeos, a espécie *Chrysoperla externa* é encontrada no Brasil nas mais diversas culturas. Populações desta espécie foram relatadas como abundantes em culturas de trigo e em pastagens de gramíneas no Brasil, exercendo importante papel no controle biológico de pragas (Gassen, 1986). Esta espécie destaca-se por ter um desenvolvimento mais rápido quando comparada com outras espécies, como por exemplo, *C. carnea*. Conseqüentemente, a produção tende a ser maior, sendo a melhor espécie utilizada para

criação massal devido ao alto potencial reprodutivo. Além de todos os fatores que viabilizam a criação massal de *C. externa*, os adultos se alimentam de “honeydew” e pólen (Tauber and Tauber, 1974; Adams & Penny, 1985). Isto permite o uso de dieta artificial e reduz o custo de produção (Hagen, 1987).

New (1975) descreveu como presas potenciais para crisopídeos, insetos de cutícula fina e facilmente perfurável por sua mandíbula, bem como as presas relativamente pequenas, lentas ou sésseis. Segundo Ridgway & Kinzer, (1974) e Freitas & Fernandes, (1996) a dieta natural de crisopídeos é composta de pulgões, cochonilhas, ácaros, ovos e lagartas de lepidópteros, entre outras presas.

Ridgway & Jones (1969) afirmaram que duas liberações totalizando 730.000 larvas de *C. carnea* por hectare, reduziram em 96% a população de *Heliothis* spp., em algodão. Segundo Nuñez (1988) o potencial de predação de uma larva de *C. externa*, em condições laboratoriais, sem necessidade de busca pela presa, foi de aproximadamente 8.000 ovos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) atingindo seu completo desenvolvimento larval. Adams & Penny (1985) relataram o consumo de 2.000 pulgões, 3.780 cochonilhas ou 6.487 ovos de cochonilha, por larva de crisopídeo, em 14 dias. Segundo Hagley (1989), a liberação de 335.000 ovos/ha de *Chrysopa sinica* foi suficiente para reduzir significativamente o número de adultos ápteros e ninfas de *Aphis pomi* em árvores de maçã anã.

As durações dos estágios dos 1º, 2º, 3º ínstar e do período larval total de *C. carnea* foram de 3,57; 2,45; 7,46 e 14,18 dias, respectivamente, quando alimentadas com *Thrips tabaci* e de 3,10; 3,00; 3,87 e 10,48 dias, respectivamente, quando alimentadas com *Gynaikothrips ficorum* (Awadallah et al., 1975). Paine (1992) verificou que uma larva de terceiro ínstar de *C. carnea* (Stevens) consumiu, em 24 horas, 17,91 e 9,64 adultos de *G. ficorum* Marchal (Thysanoptera: Phlaeothripidae), em média, quando lhes foram oferecidos 100 e 30 indivíduos, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes com a cana-de-açúcar transgênica foram realizados no laboratório de Entomologia da COPERSUCAR, de Piracicaba-SP, que possui o CQB nº 0006-96. A variedade utilizada foi a SP80-3280, sendo testados os tratamentos (Teste ELISA): SP80-3280 tradicional; SP80-3280 transgênica expressando dose baixa da endotoxina Bt (evento 228) ; SP80-3280 transgênica expressando dose alta da endotoxina Bt (evento 220); SP80-3280 transgênica expressando dose intermediária da endotoxina Bt (evento 219), e para o experimento com pulgões foi acrescentada a variedade NA 56-79, resistente aos pulgões para comparar com as plantas transgênicas. Todas as plantas transgênicas são codificadas pelo gene Cry1A(b).

Além disso, a COPERSUCAR forneceu as pupas e ovos de *Diatraea saccharalis* para manutenção de *Trichospilus diatraeae* e de larvas de *Chrysoperla externa*, respectivamente. A criação do pulgão *Melanaphis sacchari* foi mantida em estufa.

As criações dos insetos (incluindo *T. diatraeae* e *C. externa*) foram mantidas em laboratório do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP.

3.1 Teste ELISA

Foi realizada uma infestação artificial das plantas de cana-de-açúcar com 5 brocas (*D. saccharalis*) neonatas a cada 15 dias, até os 10 meses e foram realizados dois testes ELISA demonstrando as diferentes dosagens de endotoxina Bt (nanogramas de toxina Bt

em cada k/mg de proteína total) encontradas nas variedades transgênicas de cana-de-açúcar. No teste ELISA 1 as plantas estavam com 10 meses de idade no campo e no teste ELISA 2, com 22 meses de idade no campo. Os resultados da intensidade de infestação, foram de 4,7 % (Teste ELISA 1) e 3,1 % (Teste ELISA 2) no evento 219; no evento 220 a intensidade de infestação foi zero; no evento 228 a porcentagem foi de 11,1% (Teste ELISA 1) e 7,8 % (Teste ELISA 2); e na planta testemunha a porcentagem foi de 16,1 % (Teste ELISA 1) e 12,7 % (Teste ELISA 2) (Braga, 2001).

3.2 Plantio em telado

Os telados, instalados na COPERSUCAR, foram destinados ao experimento de inoculação de brocas de cana-de-açúcar e liberação do parasitóide *T. diatraeae*, para avaliar a atratividade das plantas transgênicas aos parasitóides.

Foram utilizados dois telados de 6 x 12m, onde as plantas foram distribuídas ao acaso, sendo cada repetição composta de três plantas de cada variedade (amostra na Figura 1), totalizando 60 plantas por telado. As plantas utilizadas tinham, aproximadamente, 50 cm de altura e foram devidamente adubadas e irrigadas.

Figura 1 - Primeiro valor seguido do "T": Tratamentos utilizados nos experimentos.
 Segundo valor seguido dos tratamentos: Repetições localizadas em lotes de três plantas cada, plantadas ao acaso.

3.3 Plantio em vasos

Os pulgões *M. sacchari* foram inoculados em plantas transgênicas, plantas resistentes a pulgões (NA 56-79) e plantas testemunha (SP 80-3280) e foram utilizados para a alimentação de crisopídeos para posterior avaliação da influência na biologia desse inimigo natural. O plantio foi realizado em vasos com capacidade para 2,5 litros de terra adubada onde as plantas de cana-de-açúcar foram plantadas com uma altura de aproximadamente 30 cm. Os vasos foram colocados em gaiolas com armação de ferro (1 x 0,8 x 0,5 m), revestidas com tecido “voil”, com uma abertura frontal para manipular as plantas e os pulgões; assim, os pulgões ficavam livres de qualquer tipo de parasitismo ou predação que pudesse interferir no experimento.

3.4 Criação do Parasitóide *Trichospilus diatraeae*

O parasitóide *T. diatraeae* foi criado nos laboratórios do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP e da COPERSUCAR. Para início da criação foram obtidos exemplares da espécie oriundos de uma criação da ESALQ/USP. A sala de criação foi mantida a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, fotofase de 14 h e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar; a gaiola de criação era retangular (90 x 50 x 40 cm), com a parte superior de vidro, as partes laterais envoltas com tela de nylon e na parte frontal duas aberturas com tecido para manuseio no interior da gaiola. Os parasitóides foram alimentados com solução de mel a 10%, em algodão colocado em recipientes plásticos pequenos, tomando o cuidado de trocar o alimento a cada dois dias para evitar a fermentação da solução.

As pupas de broca da cana-de-açúcar, com no máximo 4 dias, foram oferecidas aos parasitóides e substituídas a cada 48 horas, sendo retiradas das gaiolas com auxílio de uma peneira para que as fêmeas de *T. diatraeae* não saíssem junto com as pupas, que posteriormente foram colocadas em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm com fundo chato),

fechados com algodão hidrófugo envolvido em tecido “voil”, etiquetados e mantidos em BOD até a emergência dos parasitóides, que foram imediatamente transferidos para as gaiolas.

Para liberação dos parasitóides nos telados foram utilizados copos descartáveis com 20 pupas de broca parasitadas por copo. Na boca do copo foi colado um pedaço de papel sulfite, para evitar o escape dos parasitóides emergidos (Figura 2).

Figura 2 - Copo descartável em vista lateral

3.5 Criação do predador *Chrysoperla externa*

A criação de crisopídeos foi realizada no laboratório do Departamento de Entomologia, Fitopatia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, (temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 10 h e $75 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar). As gaiolas de criação de adultos eram segmentos de 21 cm de comprimento serrados de um tubo de PVC de 10 cm de diâmetro, fechadas com tecido “voil”, com auxílio de elásticos (Figura 3). Na parte superior, o tecido “voil” foi perfurado para que fosse encaixado um pequeno tubo de vidro (3,6 cm de altura e diâmetros superior e inferior, de 0,7 e 1,6 cm respectivamente), com água destilada e uma espuma na parte superior do tubo de vidro,

umedecida em dieta para adultos, segundo Ribeiro (1998) [pasta de mel, levedura de cerveja (2:1) e pólen (10%)]. Este alimento foi trocado a cada 48 horas, para que não ocorresse fermentação do material. Na parte interna do tubo de PVC, foi utilizado papel sulfite para a oviposição, trocado a cada 48 horas para coletar as novas posturas.

Foram utilizados recipientes plásticos de 18 x 13 x 6 cm (Figura 4) para acondicionar os ovos dos crisopídeos, onde eclodiram as larvas que foram alimentadas com posturas de *D. saccharalis* (Figura 5) fornecidas pela COPERSUCAR. Quando as larvas passaram ao estágio pupal, foram retiradas, colocadas em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm com fundo chato), fechados com algodão hidrófugo, etiquetados, e mantidos em BOD até a emergência dos adultos.

Figura 3 - Gaiola de criação de adultos de *Chrysoperla externa*

Etiqueta de identificação das mudanças das fases larvais

Figura 4 - Recipiente plástico para larvas de *Chrysoperla externa*

Figura 5 - *Chrysoperla externa* predando massa de ovos de *Diatraea saccharalis*

3.6 Criação do pulgão *Melanaphis sacchari*

Os pulgões da espécie *M. sacchari* (Figura 6) foram colocados nas folhas de cana-de-açúcar plantadas nos vasos, onde se multiplicaram naturalmente. Quando utilizados para os experimentos, algumas folhas com alta infestação foram cortadas e levadas ao laboratório para fornecer pulgões aos crisopídeos. As folhas infestadas foram colocadas em copos plásticos com água, encaixadas em um isopor, acima da água para manter as folhas eretas e evitar queda dos pulgões, identificados com os diferentes eventos transgênicos e a testemunha. Sobre o copo foi colocado outro copo para que não houvesse fuga dos insetos (fig 7 A e B).

Figura 6 - Pulgões *Melanaphis sacchari* em folha de cana-de-açúcar

Figura 7 - Copos com pedaço de folha de cana-de-açúcar para infestação de pulgões em laboratório. A. Copo demonstrando a disposição das folhas; B. Copo tampado para evitar a fuga dos pulgões.

3.7 Broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*

As pupas de broca da cana usadas na criação de *T. diatraeae* e os ovos utilizados na criação de *C. externa*, em laboratório, foram fornecidos pela COPERSUCAR.

3.8 Testes com *Trichospilus diatraeae* e *Diatraea saccharalis*

3.8.1 Testes nos telados

Observou-se que em lagartas de primeiro ínstar de *D. saccharalis* inoculadas por planta nos telados, os efeitos foram letais, ou seja, as lagartas não se desenvolveram até o estágio pupal, necessário ao parasitismo. Foi realizado um teste prévio em laboratório, para determinar qual o ínstar ideal de inoculação das lagartas nas plantas (4 tratamentos e 5 repetições). Foram inoculadas 5 lagartas em folhas de cana dos respectivos tratamentos (Figura 8), sendo utilizadas lagartas de primeiro, segundo, terceiro e quarto instares. Os pedaços de folha de cana foram cortados com parte da nervura principal mais larga para facilitar a penetração das lagartas nas nervuras, colocados nas placas e trocados a cada dois dias, sendo observadas a morte das lagartas e a mudança para a fase pupal.

Figura 8 - Teste prévio para escolha de lagartas inoculadas nas plantas dos telados. Em cada placa de petri são colocadas folhas de cana-de-açúcar dos respectivos tratamentos e 5 lagartas de broca, em diferentes ínstares.

Após o teste, três lagartas do ínstar adequado foram inoculadas nas plantas de cana no telado. Quando ocorreu a formação da pupa, foram feitas duas liberações semanais dos parasitóides dos copos descartáveis, retirando-se o papel da boca do copo para que os parasitóides saíssem naturalmente, sendo que cada copo foi colocado numa parte do telado (Figura 9). Cada liberação semanal totalizou 10 copos por telado, ou seja 200 pupas de broca contendo parasitóides.

Figura 9 - Croquis do telado mostrando a disposição dos copos contendo parasitóides

3.8.2 Testes em laboratório

A fertilidade, a longevidade e a porcentagem de parasitismo foram determinadas utilizando-se 50 fêmeas do parasitóide por tratamento, provenientes de uma mesma pupa de *D. saccharalis*, isoladas em tubos de vidro, com uma pupa do hospedeiro cuja

lagarta se alimentou da cana transgênica dos devidos tratamentos. Foram separadas para o parasitismo, 25 pupas fêmeas e 25 pupas machos de broca da cana-de-açúcar. Os tubos foram tampados com algodão hidrófugo envolvido em tecido “voil”, colocando-se, com auxílio de um pincel fino, a cada 48 horas, uma gota de solução de mel a 10%, para alimentação do parasitóide. Quando ocorreu a emergência dos parasitóides, foram isoladas novamente cerca de 50 fêmeas às quais foram oferecidas pupas de lagartas que se alimentaram dos tratamentos definidos anteriormente.

Nessa primeira geração foi registrada a longevidade das fêmeas e, após a emergência dos descendentes, anotou-se a data da morte e fez-se a sexagem para avaliar a razão sexual.

Para analisar a porcentagem de parasitismo, foi calculada a mortalidade (pupas mortas com ou sem descendentes), descontando-se a mortalidade natural do hospedeiro verificada em pupas não parasitadas.

3.9 Testes com *Chrysoperla externa* e *Melanaphis sacchari*

A hipótese testada é de que não haveria efeito significativo da planta transgênica sobre as populações de crisopídeos, quando estes se alimentassem de pulgões que colonizam as referidas plantas. Todos os testes foram realizados na cana-de-açúcar transgênica, e ao mesmo tempo na convencional. Além disso utilizou-se a variedade NA56-79, resistente aos pulgões, para comparar, se havia algum efeito diferente da planta resistente e da planta transgênica.

Os testes foram realizados em laboratório, observando-se a viabilidade da fase de ovo, a duração do estágio larval do predador, as viabilidades larval e pupal, anomalias nos adultos, razão sexual, longevidade dos adultos, período de pré-oviposição, período de oviposição e número de ovos/fêmea.

Foram utilizadas 40 larvas de crisopídeos para cada tratamento, com 4 repetições, todas isoladas em tubos de vidro para evitar o canibalismo. Os crisopídeos foram alimentados exclusivamente com ninfas ou adultos ápteros de pulgões da espécie *M.*

sacchari, sendo fornecidos, diariamente, 10, 20 e 30 pulgões/dia para larvas de 1^o, 2^o e 3^o ínstaes do crisopídeo, respectivamente. Os adultos foram mantidos em gaiolas e alimentados com a dieta de pólen, mel e levedo de cerveja. Os pulgões, mantidos nas plantas dos respectivos tratamentos, ficaram em estufa na COPERSUCAR. Foi mantido o número mínimo de 20 casais/tratamento em cada repetição do teste e avaliados a viabilidade e o período de eclosão de toda a progênie.

A análise dos resultados foi feita através da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste prévio em laboratório com lagartas de *Diatraea saccharalis*

No teste prévio realizado em laboratório foram utilizadas lagartas de *D. saccharalis* de primeiro, segundo, terceiro e quarto ínstaes cujos resultados se encontram nas tabelas 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

Tabela 1. Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de *Diatraea saccharalis* de 1º instar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Repetições	SP 80-3280 (testemunha)	Tratamentos		
		219	220	228
1	0	0	0	0
2	40	0	0	0
3	50	0	0	0
4	60	0	0	0
5	0	0	0	0
Média (%)	30	0	0	0

Tabela 2. Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de *Diatraea saccharalis* de 2º ínstar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Repetições	SP 80-3280 (testemunha)	Tratamentos		
		219	220	228
1	80	0	0	0
2	20	0	0	0
3	50	0	0	0
4	20	0	0	0
5	0	0	0	0
Média (%)	34	0	0	0

Tabela 3. Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de *Diatraea saccharalis* de 3º instar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Repetições	SP 80-3280 (testemunha)	Tratamentos		
		219	220	228
1	20	0	0	20
2	60	0	0	0
3	80	0	0	0
4	80	0	0	0
5	20	0	0	20
Média (%)	52	0	0	8

Tabela 4. Porcentagem (%) de sobrevivência de lagartas de *Diatraea saccharalis* de 4^o ínstar em plantas de cana-de-açúcar transgênica e testemunha. Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Repetições	SP 80-3280 (testemunha)	Tratamentos		
		219	220	228
1	100	80	80	100
2	100	60	40	100
3	80	60	80	100
4	100	80	60	100
5	100	60	60	80
Média (%)	100	68	64	96

Foi observado que as lagartas de primeiro e segundo ínstares de *D. saccharalis* não sobreviveram nos tratamentos transgênicos, sendo que no terceiro ínstar ocorreu uma média de sobrevivência de apenas 8 % no evento 228. Já no quarto ínstar as lagartas apresentaram um índice de sobrevivência acima de 50 %, indicando ser este o ínstar ideal para a inoculação em telado.

4.2 Testes com *Trichospilus diatraeae* em laboratório

4.2.1 Longevidade das fêmeas de *Trichospilus diatraeae*

Foi registrada a longevidade das fêmeas utilizadas para o parasitismo de *D. saccharalis*, sendo que as tabelas são separadas por sexo das pupas de broca: 25 pupas

fêmeas e 25 pupas machos, pois as densidades das pupas são diferentes, ocorrendo um diferencial do número de parasitóides emergidos por pupas. Foram registradas a longevidade da primeira geração (Tabela 5) e da progênie para comparação dos resultados.

Tabela 5. Longevidade média (dias) das fêmeas de *Trichospilus diatraeae* utilizadas para o parasitismo de 25 pupas fêmeas e 25 pupas machos de *Diatraea saccharalis*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/Eventos	Longevidade de <i>Trichospilus diatraeae</i> sobre pupas de <i>Diatraea saccharalis</i> (Média ¹ em dias)	
	Pupas fêmeas	Pupas machos
99 (Testemunha)	$9,1 \pm 1,9 \text{ ab}$	$9,1 \pm 1,4 \text{ a}$
219	$9,4 \pm 1,7 \text{ ab}$	$8,7 \pm 1,6 \text{ a}$
220	$8,0 \pm 1,3 \text{ b}$	$8,2 \pm 1,2 \text{ a}$
228	$8,8 \pm 1,3 \text{ a}$	$8,8 \pm 1,6 \text{ a}$

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade; 25 repetições $\pm$ erro padrão.

4.2.2 Longevidade da progênie de *Trichospilus diatraeae*

Foram registradas as longevidades da progênie das fêmeas de *T. diatraeae* que parasitaram 25 pupas fêmeas e 25 pupas machos (Tabela 6) de broca da cana-de-açúcar cujas lagartas se alimentaram da planta transgênica e da planta testemunha.

Tabela 6. Longevidade média e longevidade total da progênie das fêmeas de *Trichospilus diatraeae* sobre 25 pupas machos e 25 pupas fêmeas de *Diatraea saccharalis* cujas lagartas se alimentaram de cana-de-açúcar transgênica. Temperatura de $25 \pm 1,0^\circ \text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10 \%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/Eventos	Longevidade média (dias)		Longevidade (dias)
	Pupas fêmeas	Pupas machos	Total ⁽²⁾
99 (Testemunha)	$10,3 \pm 0,2$	$10,2 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,4$
219	$9,0 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,4$
220	$9,2 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,3$
228	$10,8 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,2$	$10,8 \pm 0,3$
C.V. ⁽¹⁾ = 13,5919 %			D.P. ⁽³⁾ = 1,3418

⁽¹⁾ C.V. = Coeficiente de variação

⁽²⁾ Média $\pm$ erro padrão

⁽³⁾ D.P. = Desvio Padrão

A longevidade da progênie foi maior quando comparada com a longevidade das fêmeas utilizadas para o parasitismo de pupas da broca da cana-de-açúcar. A diferença do número de dias da progênie entre os tratamentos não foi significativa, o que demonstra que as plantas transgênicas não afetam os parasitóides quanto a sua longevidade, levando em conta apenas a primeira geração.

Segundo Paron (1999), a longevidade de *T. diatraeae* é em média $9,2 \pm 3,0$ dias, sobre o parasitismo de pupas da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*, sendo as lagartas criadas em dieta artificial.

4.2.3 Porcentagem de parasitismo de *Trichospilus diatraeae* sobre pupas de *Diatraea saccharalis*

Na tabela 7, os resultados demonstram a porcentagem de parasitismo com e sem emergência de adultos.

Tabela 7. Porcentagem de parasitismo de *Trichospilus diatraeae* em 50 pupas de broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (25 pupas fêmeas e 25 pupas machos). Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/ Eventos	Parasitismo (%) com emergência de adultos	Parasitismo (%) sem emergência de adultos	Parasitismo (%) total
99 (Test.)	64,5	14,2	78,7
219	63,5	9,0	72,5
220	64,0	9,7	72,5
228	64,2	10,1	74,3

Foi observado que ocorreu uma alta mortalidade das pupas que não deram origem a parasitóides, sendo que muitas pupas estavam secas, indicando que, provavelmente, foram utilizadas apenas para alimentação das fêmeas, após o período de oviposição. Nos eventos transgênicos a porcentagem foi semelhante à planta testemunha, o que demonstra que não há efeito significativo da planta transgênica no parasitismo de *T. diatraeae* sobre as pupas de broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*.

A porcentagem de parasitismo na planta testemunha (evento 99), na relação 1:1 (parasitóide: hospedeiro) sobre pupas armazenadas por 4 dias, foi de 78,7 %, menor do que o parasitismo registrado por Paron (1999), que resultou em $100 \% \pm 0,0$ na mesma densidade do hospedeiro, e a porcentagem de parasitismo sobre pupas armazenadas por 4 dias foi de $81,2 \pm 13,2$.

4.2.4 Número de descendentes e razão sexual de *Trichospilus diatraeae*

O número de descendentes de fêmeas de *T. diatraeae* foi registrado após a mortalidade da progênie, separando os adultos e fazendo a contagem de fêmeas e machos (Tabela 8). Neste caso, também foram separados os descendentes do parasitismo de pupas fêmeas e machos (25 pupas/sexo) da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*. O número médio de descendentes fêmeas e machos também foi ilustrado nas figuras 1 e 2 respectivamente.

Tabela 8. Número médio de descendentes fêmeas e machos e razão sexual total do número de descendentes avaliados em 25 pupas fêmeas e 25 pupas machos de *Diatraea saccharalis*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/ Eventos	Média da progênie ⁽¹⁾			Razão sexual
	Fêmeas	Machos	Total	
99 (Test.)	81,1 $\pm$ 10,4	2,5 $\pm$ 0,7	83,7 $\pm$ 10,8	0,96
219	80,3 $\pm$ 11,8	3,6 $\pm$ 0,8	83,9 $\pm$ 12,4	0,95
220	83,3 $\pm$ 7,7	2,3 $\pm$ 0,5	85,6 $\pm$ 7,9	0,97
228	90,6 $\pm$ 19,8	2,4 $\pm$ 0,6	93,1 $\pm$ 20,2	0,97

⁽¹⁾ Média geral $\pm$ erro padrão

Figura 10 - Número médio de descendentes fêmeas de *Trichospilus diatraeae*

Figura 11 - Número médio de descendentes machos de *Trichospilus diatraeae*

O número de descendentes foi semelhante quando comparado com as plantas transgênicas e a testemunha, sendo que o evento 228 apresentou um maior número de descendentes. Paron (1999) registrou $87,5 \pm 16,0$ descendentes, sendo $86,0 \pm 15,4$ fêmeas e $1,6 \pm 0,9$ machos.

4.3 Testes com *Trichospilus diatraeae* nos telados

As lagartas (4^o instar) de broca da cana-de-açúcar foram inoculadas nas plantas de cana-de-açúcar dos telados e após 15 dias foram liberados semanalmente os parasitóides (*T. diatraeae*), onde cada liberação contava com 5 copos por telado, cada um contendo 20 pupas parasitadas. Foram feitas até quatro liberações por semana. Após 48 horas da primeira liberação, as inspeções eram realizadas e as pupas de broca recolhidas, anotando-se os dados da planta sobre a qual a pupa foi retirada. Aguardava-se a emergência dos parasitóides, sendo parte separada para continuar o parasitismo e observar o comportamento na primeira geração. Neste caso foram oferecidas pupas de broca de cana-de-açúcar aos parasitóides a cada 48 horas, para observar qual a capacidade de parasitismo quando oriundos das pupas cujas lagartas se alimentaram de plantas transgênicas. Foram registrados também a morte dos parasitóides e realizada a sexagem.

4.3.1 Parasitismo de *Trichospilus diatraeae* em pupas oriundas de plantas transgênicas dos telados

As pupas de *D. saccharalis* foram recolhidas do telado, e após a emergência dos parasitóides foram avaliados o percentual de parasitismo, a longevidade das fases imaturas, a longevidade dos parasitóides adultos e o número de machos e fêmeas.

Foram inoculadas 3 lagartas por planta no telado o que totaliza 180 lagartas por telado, em 5 repetições. O número de lagartas recolhidas no telado foi pequeno (Tabela

9), pois ocorreu a morte de uma porcentagem de lagartas que se alimentaram de plantas transgênicas.

Tabela 9. Porcentagem de pupas recolhidas do telado e de pupas parasitadas

Tratamentos/Eventos	% de pupas recolhidas	% de pupas parasitadas
99 (Testemunha)	35,6	50
219	44,4	50
220	31,1	56,3
228	26,7	64,3

Nos resultados (Tabela 9), a porcentagem de pupas recolhidas foi menor no evento 228, porém foi neste mesmo evento que a porcentagem de parasitismo foi maior. Nos outros eventos e na planta testemunha a porcentagem de parasitismo foi semelhante.

Tabela 10. Longevidade de *Trichospilus diatraeae* do período de ovo a emergência dos adultos sobre pupas parasitadas recolhidas do telado

Tratamentos/Eventos	Longevidade média de <i>T. diatraeae</i> de ovo a emergência dos adultos
99 (Testemunha)	17,2
219	16,6
220	16,6
228	16,5

A longevidade média de *T. diatraeae* desde o dia do parasitismo até a fase de emergência dos adultos (Tabela 10) foi menor do que a longevidade média apresentada nos experimentos realizados em laboratório. Deve-se levar em conta que algumas pupas

parasitadas foram recolhidas da planta após alguns dias de parasitismo, ou seja, algumas pupas que já estavam parasitadas permaneceram dentro da planta, pois a inspeção foi feita a cada 48 horas, o que pode ter influenciado nos resultados da longevidade.

Tabela 11. Número de fêmeas e machos oriundos de pupas parasitadas no telado e razão sexual

Tratamentos/ Eventos	Média da progênie			Razão sexual
	Fêmeas	Machos	Total	
99 (Test.)	256,2	37,7	293,9	0,87
219	266,7	41,5	308,2	0,85
220	284,6	45,0	329,6	0,86
228	283,0	46,5	329,5	0,86

O número de fêmeas e machos oriundos das pupas de *D. saccharalis* (Tabela 11) parasitadas nos telados foi bem maior quando comparado ao parasitismo pelas fêmeas individualizadas em tubos de vidro (testes feitos em laboratório).

Tabela 12. Longevidade (dias) dos adultos de *Trichospilus diatraeae* oriundos de pupas parasitadas no telado

Tratamentos/Eventos	Média da longevidade (dias)
99 (Testemunha)	9,7
219	9,5
220	9,2
228	8,8

A longevidade dos parasitóides adultos (Tabela 12) oriundos de pupas de *D. saccharalis* parasitadas nos telados foi semelhante nos 4 eventos, sendo que no evento 228, a longevidade foi menor, porém não apresentou diferenças significativas quando comparada aos outros eventos. A longevidade registrada por Paron (1999) foi de 9,2 dias em condições de laboratório.

4.3.2 Parasitismo da primeira geração de *Trichospilus diatraeae* originários de fêmeas que emergiram de pupas de *Diatraea saccharalis* parasitadas nos telados

Os parasitóides que emergiram das pupas de *D. saccharalis* recolhidas do telado, foram colocados em gaiolas sendo oferecidas 3 pupas de *D. saccharalis* a cada 48 horas para parasitismo e posterior avaliação da longevidade da fase de ovo até a emergência do adulto; da longevidade dos adultos, do número de descendentes fêmeas e machos e da razão sexual (Tabela 13).

Sabe-se que há um percentual maior de parasitismo quando as pupas são oferecidas a várias fêmeas de *T. diatraeae*.

Tabela 13. Número médio de fêmeas e machos e razão sexual da primeira geração do parasitóide *Trichospilus diatraeae* oriundos de fêmeas que emergiram de pupas de *Diatraea saccharalis* parasitadas e recolhidas do telado. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/ Eventos	Média da progênie			Razão sexual
	Fêmeas	Machos	Total	
99 (Test.)	197,7	43,0	240,7	0,82
219	202,1	44,6	246,7	0,82
220	216,9	47,1	264,0	0,82
228	204,8	46,8	251,6	0,81

O número de descendentes, tanto fêmeas como machos, foi bem maior porque neste caso as pupas de *D. saccharalis* oferecidas ao parasitismo de *T. diatraeae* foram colocadas em gaiolas com várias fêmeas, e não isoladas como nos outros experimentos. O objetivo deste experimento foi avaliar a porcentagem de parasitismo da primeira geração de fêmeas de *T. diatraeae* oriundas do telado, independente se individualizadas em tubos de vidro ou não, comparando-as com a geração paternal que parasitou pupas no telado. Além disso, as pupas ficaram expostas por aproximadamente 48 horas, o que segundo Paron (1999) significa aumento relativo do número de descendentes em até 300 indivíduos ou mais.

Tabela 14. Longevidade média (dias) do período de ovo a adulto dos parasitóides de primeira geração e longevidade dos adultos de *Trichospilus diatraeae*.

Tratamentos/Eventos	Longevidade média (dias) de ovo a emergência dos adultos	Longevidade média (dias) dos adultos
99 (Testemunha)	18,1	10,5
219	18,0	9,7
220	18,6	9,9
228	18,4	9,1

A longevidade média do período de ovo até a emergência dos adultos dos parasitóides de primeira geração (Tabela 14) foi aproximadamente igual em todos os eventos, sendo maior que a longevidade da fase dos parasitóides que originaram de pupas parasitadas nos telados. A longevidade dos adultos da primeira geração de *T. diatraeae* não diferiu estatisticamente da longevidade da geração paternal, que se originou nos telados, cujos resultados são de 9,7; 9,5; 9,2 e 8,8 dias respectivamente nos eventos 99 (testemunha), 219, 220 e 228.

Tabela 15. Porcentagem de parasitismo da primeira geração de *Trichospilus diatraeae* oriunda das pupas parasitadas por fêmeas que parasitaram pupas de broca da cana-de-açúcar nos telados. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/Eventos	Primeira geração de <i>T. diatraeae</i>
	% de parasitismo
99 (Testemunha)	86,7
219	66,7
220	85,2
228	83,3

A porcentagem de parasitismo (Tabela 15) foi menor no evento 219 (planta com maior quantidade de toxina). Nos outros eventos a porcentagem foi semelhante à planta testemunha.

4.4 Ciclo biológico de *Chrysoperla externa*

Nos experimentos realizados para determinar o ciclo biológico do predador *C. externa*, acrescentou-se a planta resistente (NA 56-79), que foi utilizada para verificar seu efeito na relação pulgão-predador, quando comparada aos outros tratamentos transgênicos. O evento (tratamento) número 219 não foi testado pois os pulgões não se desenvolveram bem na planta, sendo assim não foi possível ter um número suficiente de pulgões necessários para a alimentação dos crisopídeos.

Na tabela 16 foi registrada a longevidade da geração que deu início ao experimento, ou seja, a geração paternal, para posterior comparação com a geração F1 (descendentes).

Tabela 16. Longevidade média (dias) das fases imaturas de *Chrysoperla externa*.
Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/ Eventos	Média da duração das fases imaturas (dias) de <i>C. externa</i> ⁽¹⁾					Pupa
	Ovo	Larva 1 ^o Ínstar	Larva 2 ^o Ínstar	Larva 3 ^o Ínstar		
99 (Test.)	4,0 $\pm$ 0,0 b	4,6 $\pm$ 0,8 a	3,0 $\pm$ 0,2 c	4,8 $\pm$ 0,5 a	9,8 $\pm$ 0,5	bc
220	4,3 $\pm$ 0,5 a	4,0 $\pm$ 0,6 b	3,6 $\pm$ 0,6 b	4,2 $\pm$ 0,8 b	9,4 $\pm$ 1,2	c
228	4,1 $\pm$ 0,5 ab	4,1 $\pm$ 0,6 b	3,0 $\pm$ 0,7 c	5,0 $\pm$ 0,7 a	11,2 $\pm$ 1,0	a
NA 56-79	4,1 $\pm$ 0,4 ab	4,9 $\pm$ 0,2 a	4,3 $\pm$ 0,6 a	4,9 $\pm$ 1,1 a	10,2 $\pm$ 0,8	b

¹Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade; 30 repetições $\pm$ erro padrão.

A longevidade de *C. externa* diferiu estatisticamente nos diferentes eventos, lembrando que na fase de ovo, o crisopídeo não sofreu influência dos eventos, pois neste caso ainda eram ovos oriundos da criação de *C. externa*, na qual os adultos foram criados com dieta artificial e as larvas com ovos de *D. saccharalis*. As diferenças no segundo ínstar demonstraram que a longevidade dos crisopídeos quando os pulgões *M. sacchari* se alimentaram da planta resistente (NA 56-79) foi maior do que nos outros eventos. Na planta testemunha (SP 80-3280) e no evento 228 (planta transgênica) a longevidade foi a mesma, o que não ocorreu na fase pupal, pois a longevidade de *C. externa* no evento 228 foi bem maior, seguido da planta resistente. A conclusão é de que não houve aumento significativo da longevidade dos crisopídeos quando alimentado com pulgões que se alimentaram dos eventos transgênicos.

Tabela 17. Longevidade (dias) dos adultos de *Chrysoperla externa*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/Eventos	Longevidade (dias) dos adultos de <i>C. externa</i> ⁽¹⁾	
	Fêmeas	Machos
99 (Testemunha)	$48,8 \pm 2,1$ b	$46,3 \pm 5,5$ a
220	$51,4 \pm 3,0$ a	$46,6 \pm 3,8$ a
228	$52,6 \pm 2,9$ a	$42,1 \pm 5,7$ b
NA 56-79	$51,8 \pm 2,8$ a	$40,9 \pm 4,3$ b

⁽¹⁾ Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade; 30 repetições $\pm$ erro padrão.

A longevidade dos adultos fêmeas e machos de *C. externa* (Tabela 17) foi semelhante quando os pulgões *M. sacchari* se alimentaram nos diferentes eventos e na planta resistente e não ocorreu nenhuma deformação nos adultos.

Tabela 18. Longevidade média (dias) das fases imaturas da primeira geração de *Chrysoperla externa*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/ Eventos	Média da duração das fases imaturas (dias) de <i>C. externa</i> ⁽¹⁾				
	Ovo	Larva 1 ^o Ínstar	Larva 2 ^o Ínstar	Larva 3 ^o Ínstar	Pupa
99 (Testemunha)	$5,9 \pm 0,3$ b	$4,7 \pm 0,9$ a	$3,8 \pm 0,9$ b	$4,7 \pm 1,0$ ab	$9,5 \pm 1,2$ c
220	$6,7 \pm 1,0$ a	$4,9 \pm 0,8$ a	$4,5 \pm 0,8$ ab	$4,1 \pm 0,9$ b	$13,5 \pm 0,9$ a
228	$6,2 \pm 0,7$ ab	$5,1 \pm 0,6$ a	$4,3 \pm 0,6$ ab	$4,5 \pm 1,0$ b	$13,7 \pm 0,5$ a
NA 56-79	$5,3 \pm 1,1$ c	$5,4 \pm 1,2$ a	$4,8 \pm 0,6$ a	$5,3 \pm 0,4$ a	$12,4 \pm 1,5$ b

⁽¹⁾ Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade; 30 repetições $\pm$ erro padrão.

Observa-se (Tabela 18) que ocorreu uma pequena diferença na duração da fase de ovo de *C. externa*, sendo que a maior foi registrada no evento 220, e a menor nas plantas resistentes. No primeiro, segundo e terceiro instares, a longevidade foi semelhante em todos os eventos, sendo um pouco maior nas plantas resistentes, mas sem resultados significativamente diferentes. Já a duração da fase pupal de *C. externa*, quando alimentado com pulgões *M. sacchari* criados sobre a planta testemunha, foi bem menor do que nos eventos transgênicos.

Tabela 19. Longevidade (dias) dos adultos de primeira geração de *Chrysoperla externa*.
Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/Eventos	Longevidade (dias) dos adultos de <i>Chrysoperla externa</i> ⁽¹⁾	
	Fêmeas	Machos
99 (Testemunha)	$50,1 \pm 3,4$ b	$39,9 \pm 8,6$ b
220	$50,4 \pm 4,6$ b	$47,4 \pm 3,9$ a
228	$54,0 \pm 3,2$ a	$42,6 \pm 6,3$ ab
NA 56-79	$54,7 \pm 3,1$ a	$38,4 \pm 4,4$ b

⁽¹⁾ Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade; 30 repetições $\pm$ erro padrão.

Os adultos de primeira geração de *C. externa* (Tabela 19) apresentaram uma pequena diferença na longevidade, tanto de machos como fêmeas, mas notou-se a diferença maior nos machos que se alimentaram de *M. sacchari* que se alimentaram do evento 220 e das plantas resistentes.

A razão sexual de *C. externa* foi de uma fêmea para um macho, como descrito por Freitas (2001), porém Nuñez (1988b) registrou 40 machos para cada 50 fêmeas no verão, e 50 fêmeas para 50 machos no inverno.

Tabela 20. Viabilidade do período de ovo a adulto de primeira geração de *Chrysoperla externa*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/ Eventos	Viabilidade (%) das fases de <i>C. externa</i> ⁽¹⁾					
	Ovo	Larva 1 ^o Ínstar	Larva 2 ^o Ínstar	Larva 3 ^o Ínstar	Pupa	Adulto
99 (Testemunha)	83,3	80,0	75,0	93,3	71,4	98,0
220	90,0	85,0	88,8	80,0	76,7	95,0
228	80,0	78,2	82,6	86,7	84,6	92,0
NA 56-79	80,6	86,7	90,0	78,2	83,3	96,0

⁽¹⁾ 30 repetições

A viabilidade no período de ovo a adulto da primeira geração de *C. externa* foi maior nos adultos, que tiveram um ótimo percentual de emergência em todos os eventos.

Tabela 21. Comparação da longevidade de *Chrysoperla externa* e seus descendentes de primeira geração. 1: Geração paternal; 2: Geração F1 (Progênie)

Tratamento/ Evento	Longevidade (dias) das fases imaturas de <i>C. externa</i> ⁽¹⁾					
	Ovo		1 ^o Instar		2 ^o Instar	
	1	2	1	2	1	2
99 (Test.)	4,0	5,9	4,6	4,7	3,0	3,8
220	4,3	6,7	4,0	4,9	3,6	4,5
228	4,1	6,2	4,1	5,1	3,0	4,3
NA5679	4,1	5,3	4,9	5,4	4,3	4,8

⁽¹⁾ 30 repetições

Tabela 22. Comparação da longevidade de *Chrysoperla externa* e seus descendentes de primeira geração. 1: Geração paternal; 2: Geração F1 (Progênie)

Tratamento/ Evento	Longevidade (dias) das fases imaturas de <i>C. externa</i> ⁽¹⁾			
	3º Ínstar		Pupa	
	1	2	1	2
99 (Test.)	4,8	4,7	9,8	9,5
220	4,2	4,1	9,4	13,5
228	5,0	4,5	11,2	13,7
NA5679	4,9	5,3	10,2	12,4

⁽¹⁾ 30 repetições

Tabela 23. Comparação da longevidade de *Chrysoperla externa* e seus descendentes de primeira geração. 1: Geração paternal; 2: Geração F1 (Progênie)

Tratamento/Evento	Longevidade (dias) dos adultos de <i>C. externa</i> ⁽¹⁾			
	Fêmeas Adultas		Machos Adultos	
	1	2	1	2
99 (Test.)	48,8	50,1	46,3	39,9
220	51,4	50,4	46,6	47,5
228	52,6	54,0	42,1	42,6
NA5679	51,8	54,7	40,9	38,4

⁽¹⁾ 30 repetições

Os dados foram analisados estatisticamente comparando-se a longevidade de *C. externa* em todas as fases do ciclo biológico, quando alimentado com pulgões *M. sacchari* alimentado com cana-de-açúcar transgênica (geração paternal), e a longevidade da primeira geração de *C. externa* (Tabelas 21, 22 e 23). A diferença na fase de ovo foi

significativa em todos os tratamentos, sendo que na primeira geração a duração (dias) foi maior.

Os adultos de *C. externa* de primeira geração ovipositaram normalmente na folha de sulfite das gaiolas de PVC, e os ovos apresentaram coloração e pedicelos normais. Em todas as fases não ocorreram deformações ou nenhum problema que viesse afetar o ciclo biológico do predador.

Tabela 24. Média do número de ovos/fêmea de *Chrysoperla externa*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Umidade Relativa $70 \pm 10\%$ e Fotofase 14 h.

Tratamentos/Eventos	Média do número de ovos/fêmea
99 (Testemunha)	$468,8 \pm 68,2$ a
220	$476,4 \pm 78,1$ a
228	$491,4 \pm 105,8$ a
NA 56-79	$488,4 \pm 91,6$ a

O número de ovos (Tabela 24) foi semelhante em todos os eventos. Cañedo & Lizárraga (1989) alimentaram populações F1 de *C. externa* com 7 tipos diferentes de alimentos e obtiveram variação na capacidade de postura de 40 a 800 ovos por fêmea.

5 CONCLUSÕES

Nos estudos realizados na relação tritrófica da cana-de-açúcar com a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* e o parasitóide *Trichospilus diatraeae*, pode-se considerar que a planta transgênica afetou significativamente a broca da cana-de-açúcar nos três primeiros instares. A partir do quarto instar a porcentagem de mortalidade foi mais baixa.

A longevidade da progênie do parasitóide *T. diatraeae* não foi afetada quando o parasitismo se deu em pupas cujas lagartas se alimentaram de plantas transgênicas.

A porcentagem de parasitismo de *T. diatraeae* sobre pupas de broca da cana-de-açúcar cujas lagartas se alimentaram de cana-de-açúcar transgênica foi semelhante a de parasitismo sobre pupas cujas lagartas se alimentaram da planta testemunha.

As plantas transgênicas não influenciaram o desenvolvimento do parasitóide *Trichospilus diatraeae* nos testes realizados nos telados e na primeira geração testada em laboratório de fêmeas oriundas das pupas de broca recolhidas dos telados.

O crisopídeo *Chrysoperla externa* até a primeira geração, não sofreu influências altamente significativas na relação tritrófica da planta de cana-de-açúcar e do pulgão *Melanaphis sacchari*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.A.; PENNY, N.D. Neuroptera of the Amazonian basin. Part 11a. Introduction and Chrysopini. **Acta Amazonica**, v.15, n. 3/4, p.413-477, 1985.
- ANDOW, D.A.; HUTCHISON, W.D. Bt-corn resistance management. In: MELLON, M.; RISSLER, J. (Ed.) Now or never: serious new plants to save natural pest control. Cambridge: Union of Concerned Scientists, 1998. p.19-66.
- AWADALLAH, K.T.; ABOU-ZEID, N.A.; TAWFIK, M.F.S. Development and Fecundity of *Chrysopa carnea* Stephens. **Bulletin de la Société Entomologique d'Egyte**, v.89, p.323-329, 1975.
- BARBOSA, P.; SAUNDERS, J.A. Plant allelochemicals: linkages between herbivores and their natural enemies. In: COOPER-DRIVER, G. A.; SWAIN, T.; CONN, E.E. (Ed.) **Chemically mediated interactions between plants and other organisms**. Plenum Press, 1985. p.107-137.
- BAUER, L.S. Response of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego*. **Environmental Entomology**, v.19, p.428-431, 1990.

- BORDAT, D.; BRENIERE, J.; COQUARD, J. Foreurs de graminées africaines: parasitisme et techniques d'élevage. **Agronomie Tropicale**, v.32, n.4, p.391-399, 1977.
- BOUCEK, Z. The african and asiatic species of *Trichospilus* and *Cotterelia* (Hymenoptera: Eulophidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.65, p.669-681, 1976.
- BOURNIER, J.P. Sur la reproduction parthenogenetique de *Trichospilus diatraeae* Cher. Et Margab (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Bulletin de la Société Entomologique de France**, v.80, n.5/6, p.116-118, 1975.
- BRAGA, D.P.V. Caracterização de duas variedades de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína CryIA(b) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Piracicaba, 2001. 71p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CAMPBELL, B.C.; DUFFEY, S.S. Effect of density and instar of *Heliothis zea* on parasitism by *Hyposoter exiguae*. **Environmental Entomology**, v.8, p.127-130. 1979a.
- CAMPBELL, B.C.; DUFFEY, S.S. Tomatine and parasitic wasps: potencial incompatibility of plant antibiosis with biological control. **Science**, v.205, p.700-702, 1979b.
- CAÑEDO, D.V. ; LIZÁRRADA, A. Dietas artificiales para la crianza em laboratorio de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Peruana de Entomologia**, n.31, p.83-85, 1989.

- CHAPMAN, M.H.; HOY, M.A. Relative toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and its predator *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Tetranychidae and Phytoseiidae). **Journal of Applied Entomology**, v.111, p.147-154, 1991.
- CROFT, B.A.; FLEXNER, J.L. **Microbial pesticides. Arthropod Biological Control Agents and Pesticides**, Croft, B.A. (Ed) cap.9, p.269-303, 1990.
- DAANE, K.M.; YOKOTA, G.Y.; ZHENG, Y.; HAGEN, K.S. Inundative release of common green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) to suppress *Erythroneura variabilis* and *E. elegantula* (Homoptera: Cicadellidae) in vineyards. **Environmental Entomology**, v.25, p.1224-1235, 1996.
- DICKSON, L.L.; WHITHAM, T.G. Genetically-based plant resistance traits affect arthropods, fungi, and birds. **Oecologia**, v.106, p.400-406, 1996.
- EL-HENEIDY, A.H.; BARBOSA, P.; GROSS, P. Influence of dietary nicotine on the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* and its parasitoid, the ichneumonid wasp *Hyposoter annulipes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.46, p.227-232, 1988.
- FEDERICI, B.A. Broadscale use of pest-killing plants to be true test. **California Agriculture**, v.52, p.14-20, 1998.
- FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Biotechnology**, v.10, p.271-275, 1992.
- FLEXNER, J.L.; LIGHTHART, B.; CROFT, B.A. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. **Agricultural Ecosystems and Environment**, v.16, p.203-254, 1986.

- FRANCIS, F.; HAUBRUGE, E.; HASTIR, P.; GASPAR, C. Effect of aphid host plant on development and reproduction of the third trophic level, the predator *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Environmental Entomology**, v.30 n.5, p.947-952, 2001.
- FREITAS, S. de. **O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas**. Jaboticabal: Funep, 2001. 66p.
- FREITAS, S. de; FERNANDES, O. A. Crisopídeos em agroecossistemas. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais: Conferências e Palestras**; 283p.
- FUJIMOTO, H. ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology**, v.11, p.1151-1155, 1993.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L. **Entomologia Agrícola**. 3 ed. São Paulo: Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GASSEN, D.N. **Parasitas, patógenos e predadores de insetos associados a cultura do trigo**. Passo Fundo: EMBRAPA, CNPT, 1986. 86 p. (Circular Técnica, 1).
- GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v.37, p.615-636, 1992.
- GIROUX, S.J.; CÔTÉ, J. CH.; VINCENT, CH.; MARTEL, P.; CODERRE, D. Bacteriological insecticide M-one effects on predation efficiency and mortality of adult *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Economic Entomology**, v.87, p.39-43, 1994.

- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.701-726, 1998.
- HAGEN, K.S. Nutritional ecology of terrestrial insect predators. In: SLANSKY, F. Jr.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.). **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York: John Wiley, 1987. p.533-577.
- HAGLEY, E.A.C. Release of *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae) for control of the green apple aphid, *Aphis pomi* Degeer (Homoptera: Aphididae). **The Canadian Entomologist**, v.121, n.4/5, p.309-314, 1989.
- HAUGE, M.S.; NIELSEN, F.H.; TOFT, S. The influence of three cereal aphid species and mixed diet on larval survival, development and adult weight of *Coccinella septempunctata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.89, p.319-322, 1998.
- HERRNSTADT, C.; SOARES, G.G.; WILCOX, E.R.; EDWARDS, D.L. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. **Biotechnology**, v.4, p.305-308, 1986.
- HERZOG, D.C.; FUNDENBURK, J.E. Plant resistance and cultural practice interactions with biological control. In: HOY, M.A.; HERZOG, D.C. (Ed.). **Biological control in agricultural IPM systems**. London: Academic Press, 1985. p.67-88.
- HILBECK, A.; MOAR, W.J.; PUSZTAI – CAREY M.; FILIPPINI, A.; BIGLER, F. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, v.27, n.5, p.1255-1263, 1998.

- ISENHOUR, D.J.; WISEMAN, B.R. Parasitism of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) as affected by host feeding on silks of *Zea mays* L. cv. Zapalote Chico. **Environmental Entomology**, v.18, p.394-397, 1989.
- JESSE L.H.C., OBRYCKI J.J. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: Lethal effects on the monarch butterfly. **Oecologia**, v.125, p.241-248, 2001.
- KOZIEL, M.G. ; BELAND, G.L.; BOWMAN, C; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHIGI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology**, v.11, p.194-200, 1993.
- LOSEY, J.E.; RAYOR L.S.; CARTER, M.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, v.399, p.214, 1999.
- MACINTOSH, S.C. et al. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.56, p.258-66, 1990.
- MELIN, B.E.; COZZI, E.M. Safety to nontarget invertebrates of lepidopteran strains of *Bacillus thuringiensis* and their β -exotoxins. In: LAIRD, M.; LACEY, L.A.; DAVIDSON, E.W. (Ed.) **Safety of microbial insecticides**. Florida: Boca Raton, 1989. p.149-168.
- MORAES, J.C. Aspectos biológicos e seletividade de alguns acaricidas a *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em laboratório. Lavras, 1989. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

- NEW, T.R. The biology of Chrysopidae and Hemerobiidae (Neuroptera), with reference to their usage as biocontrol agents: a review. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, v.127, n.2, p.115-140, 1975.
- NUÑEZ, Z.E. Ciclo biológico y crianza de *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae). **Revista Peruana de Entomologia**, v.31, p.76-82, 1988.
- OBRYCKI, J.J.; LOSEY, J.E.; ORLEY, R.T.; JESSE, L.C.H. Transgenic Insecticidal Corn: Beyond Insecticidal Toxicity to Ecological Complexity. **Bioscience**, v.51, n.5, p.353-361, 2001.
- ORR, D.B.; BOETHEL, D.J. Biology of *Telenomus chloropus* (Hymenoptera: Scelionidae) from eggs of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) reared on resistant and susceptible soybean genotypes. **The Canadian Entomologist**, v.117, p.1137-1142, 1985.
- PAINE, T.D. Cuban Laurel Thrips (Thysanoptera: Phlaeothripidae). Biology in Southern California: Seasonal Abundance, Temperature, Dependent Development, Leaf Suitability, and Predation. **Annals of the Entomological Society of America**, v.85, n.2, p.164-172, 1992.
- PARON, M.R. Bioecologia de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), endoparasitóide de pupas de Lepidoptera. Piracicaba, 1999. 57 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PEFEROEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v.15, n.5, p.173-177, 1997.

- PERLAK, F.J.; DEATON, T.A; et al. Insect resistant cotton plants. **Biotechnology**, v.8, p.939-943, 1990.
- PICARD-NIOI, A.L.; GRISON, R.; OLSEN, L.; ARNOLD, C.P.G.; PHAM-DELEGUE, M.H. impact of proteins used in plant genetic engineering: Toxicity and behavioral study in the honeybee. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.1710-1716, 1997.
- PILCHER, C.D. Phenological, physiological, and ecological influences of transgenic Bt corn on European corn borer management. Ames, 1999. 58p. Thesis (Ph.D.) - Iowa State University.
- POWELL, J. E.; LAMBERT, L. Effects of three resistant soybean genotypes on development of *Microplitis croceipes* and leaf consumption by its *Heliothis* spp. Hosts. **Journal of Agricultural Entomology**, v.1, p.169-176, 1984.
- POWELL, W.; WALTON, M.P.; JERVIS, M.A. Populations and communities. **Insect Natural Enemies**, v.ix, p.223-292, 1996.
- PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; McPHERSON, B.A.; THOMPSON, J.N.; WEISS, A.E. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.11, p.41-65, 1980.
- RIBEIRO, L.J. Características do desenvolvimento e potencial reprodutivo de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) sob diferentes dietas alimentares. Jaboticabal, 1998. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

- RICE, M.E.; WILDE, G.E. Antibiosis effect of sorghum on the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae), a third-trophic level predator of the greenbug (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, v.82, p.570-573, 1989.
- RIDGWAY, R.L.; JONES, S.L. Inundative releases of *Chrysopa carnea* for control of *Heliothis* on cotton. **Journal of Economic Entomology**, v.62, n.1, p.177-180, 1969.
- RIDGWAY, R.L.; KINZER, R.E. Chrysopids as predators of crop pests. **Entomophaga**, v.7, p.45-51, 1974.
- RIDGWAY, R.L.; MURPHY, W.L. Biological control in the field. In: CANARD, M.; SEMÉRIA, Y.; NEW, T.R. (Ed.) **Biology of chrysopidae**. Hague: W. Junk, 1984. p.220-228.
- SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.168-175, 1998.
- SIMS, S.R. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* CryIA(c) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. **Southwestern Entomologist**, v.20, n.4, p.493-500, 1995.
- TAUBER, M.J.; TAUBER, C.A. Dietary influence on reproduction in both sexes of five predacious species (Neuroptera). **The Canadian Entomologist**, v.106, p.921-925, 1974.
- TULISALO, U. Biological control in the greenhouse. In: CANARD, M.; SEMÉRIA, Y.; NEW, T.R. (Ed.) **Biology of chrysopidae**. Hague: W. Junk, 1984. p.228-233.

[USDA] US Department of Agriculture. 1999. USDA APHIS Documents and Reports: Crops No Longer Regulated by USDA. 2 Apr 2001. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/not_reg.html)

VANDENBERG, J.D. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v.83, p.755-759, 1990.

VAN EMDEN, H.F. Host plant-Aphidophaga interactions. **Agricultural Ecosystems and Environment**, v.52, p.3-11, 1995.

WARREN, G.W.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; KOZIEL, M.G. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. **Journal of Economic Entomology**, v.85, p.1651-1659, 1992.

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