

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**RISCO BIOECOLÓGICO DO MILHO TRANSGÊNICO EM
INSETOS NÃO-ALVO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO**

CARLA CRISTINA DUTRA

DOURADOS

MATO GROSSO DO SUL

2012

**RISCO BIOECOLÓGICO DO MILHO TRANSGÊNICO EM INSETOS NÃO-ALVO DO
SISTEMA DE PRODUÇÃO**

CARLA CRISTINA DUTRA

Bióloga

Orientador: PROF. DR. MARCOS GINO FERNANDES

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande
Dourados, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal,
para obtenção do título de Doutor

Dourados

Mato Grosso do Sul

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

633.15	Dutra, Carla Cristina.
D978r	Risco bioecológico do milho transgênico em insetos não-alvo do sistema de produção. / Carla Cristina Dutra. – Dourados, MS : UFGD, 2012. 72f. Orientador: Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Milho – Doenças e pragas. 2. Milho transgênico. 3. Pragas agrícolas. 4. Resistência de insetos. I. Título.

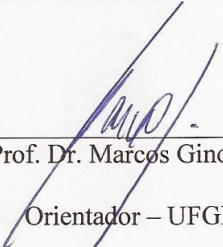
RISCO BIOECOLÓGICO DO MILHO TRANSGÊNICO EM INSETOS NÃO-ALVO DO SISTEMA DE PRODUÇÃO

Por

Carla Cristina Dutra

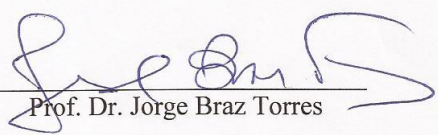
Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovada em: 08/08/2012



Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes

Orientador – UFGD/FCBA



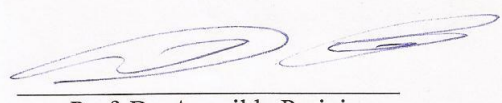
Prof. Dr. Jorge Braz Torres

Membro Titular – UFRPE



Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande

Membro Titular – UFGD/FCA



Prof. Dr. Amarildo Pasini

Membro Titular - UEL



Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira

Membro Titular – UFGD/FCBA

À **Deus** pela saúde e oportunidades... **Agradeço**

Aos meus **Pais** que me ensinaram os valores das pequenas coisas da vida, que quem trabalha com honestidade e caráter íntegro um dia alcança seus objetivos... concretizar um sonho só depende da vontade própria... **Dedico**

E a todos os **Mestres** que me orientaram... jamais esquecerei o que aprendi com cada um deles!.. **Ofereço**

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade de realizar o meu Doutorado nesta Instituição.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pela bolsa de doutorado, sem a qual seria impossível realizar meus estudos. E também agradeço pela oportunidade do doutorado sanduíche com bolsa.

À University of Minnesota por ter me aceitado e propiciado todos os meios para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao meu querido Orientador Prof. Dr. Marcos Gino, quem respeito e admiro muito, que sempre me aconselhou tanto na vida científica quanto na pessoal, muito obrigada por todo o seu apoio e seus ensinamentos!

Ao Prof. Dr. William D. Hutchison por ter me recebido tão bem na Universidade de Minnesota e me orientado na realização dos trabalhos, agradeço também a confiança e amizade.

Ao Dr. Robert Lee Koch do Departamento de Agricultura de Minnesota (MDA), pelo incentivo, orientação, oportunidade, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge Braz Torres que sempre foi tão atencioso ao responder meus emails e me orientar.

Ao Prof. Dr. José Roberto P. Parra por me receber em seu laboratório e pela orientação no período que passei com sua equipe.

Ao Prof. Dr. Amarildo Pasini pela atenção, apoio e orientação todas as vezes que o procurei.

Ao Prof. Dr. Arno Rieder que faz parte da minha vida desde a iniciação científica, quem eu posso contar, quem acreditou em mim e me mostrou o mundo da ciência.

E dentre tantos outros professores maravilhosos, exemplares, que admiro muito, agradeço aos Professores Doutores Josué Raizer, Manoel A. Uchôa Fernandes, Paulo Eduardo Degrande, Luiz Carlos F. de Souza, José Oscar Novelino, Fabricio Fagundes Pereira e Valter Vieira Alves.

Ao Dr. André Luiz Faleiros Lourenção pelo apoio na realização do trabalho de campo e também nas orientações técnicas, sua amizade e confiança; juntamente à Fundação MS com a disponibilização de áreas experimentais de plantação de milho para o desenvolvimento de trabalhos desta tese.

Ao Eng. Agr. M.Sc. Cláudio Guerra pelo apoio e compreensão, por permitir e colaborar com a realização de parte desta pesquisa em campos de produção de milho na fazenda Sementes Guerra, Dourados-MS.

Ao mestrando Wagner Justiniano que junto a empresa Monsanto doou sementes de milho para os experimentos de campo.

À Unigran e ao Dr. Elmo Melo por terem disponibilizado uma área experimental para desenvolvimento de parte das pesquisas de campo.

Aos estagiários, estudantes de agronomia, Gilmar Marques, Bruno Petelin e Nágila Oliveira pelo apoio no trabalho de campo durante todas as coletas, sempre com entusiasmo, responsabilidade e alegria.

Aos funcionários da fazenda experimental da FAECA/UFGD onde foi realizada parte das pesquisas de campo, em especial agradecer o apoio do Sr. Jesus Felizardo de Souza.

Aos servidores do setor de transportes da UFGD: Carlos Paulino Ramos e aos motoristas Sebastião Fernandes da Silva, Edson Lucio Pastor, Eleonilde Orlando e Cleber Almeida Renovato.

Aos secretários Maria Lúcia Teles, Ronaldo Pasquim de Araujo e Manfredo Rode Júnior pela amizade e disposição em me ajudar.

Aos M.Sc. Juarez Fuhmann e a Daniela de Cássia Bená pelo auxílio na identificação de espécies de Coleoptera.

Ao doutorando Manoel Fernando Demétrio pelo auxílio na identificação das formigas, pelos cafezinhos e por todo o carinho.

À equipe do Hecolab: Prof. Dr. Rogério Silvestre, e aos entomologistas Tiago Auko, Nelson Rodrigues da Silva, Dany Sheik Dourados, Felipe Varussa de Oliveira Lima e Bhrenno Trad.

Aos irmãos de orientação Thiago Mota, Melissa Donadello, Cácia Tigre Viana, Paulo Beltramin, Maria L. Matusumoto e Vera Alves.

À Belia B. Pinto de Arruda por sempre acreditar em mim, me apoiar, incentivar com todo carinho um pouco de mãe, um pouco de amiga... muito obrigada!!!

À Ana Rosa, uma grande amiga, que me ouve e orienta com palavras de força e fé.

À Nauk de Jesus que, além de amiga, me deu muito apoio e bons conselhos!

Aos amigos que sempre estiveram comigo mesmo de longe, Daniele Perassa, Renata Gabriela Teixeira, Milaine Fernandes, Taiane B. Pinto de Arruda, Alesandra Rodrigues, Kellen Fávero, Claudinéia Lizieri, Anna Frida H. Modro, Gilmara Araújo, Cristina Grijota, Clediane Dias, Hellen Calgaroto, Rízia Andrade, Graciele Poletto, Viviana de Oliveira Torres, Camila Meotti, Bruna Teló, Renata Borba, Theresa Cira, Kristy Ebert, Iva Skobic, Thelma Heidel, Andreia Arruda, Eber Ferreira do Prado, Gilmar Dias, Angélico Asenjo e Leandro Paim, que contribuíram com meu crescimento e me ajudaram em muitos momentos durante meu doutoramento.

À minha família que amo muito, mas muito mesmo... Obrigada! Ah, se não fosse aquelas tardes na fazenda com a mamãe me alfabetizando... talvez meus caminhos tivessem sido mais longos. Ah, se não fosse aqueles conselhos do papai, quem sabe eu tivesse tomado decisões diferentes... Ah, se não fosse a amizade e o amor das minhas lindas irmãs, talvez eu não soubesse escolher amizades verdadeiras.

E Graças a Deus todo esse trabalho foi possível e tenho tantas pessoas boas que posso agradecer por ter colaborado de alguma forma com esse trabalho, o qual é tão importante para mim.

O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano seria menor.

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

1. LISTA DE TABELAS	viii
2. LISTA DE FIGURAS	x
3. RESUMO	xi
4. ABSTRACT	xii
5. INTRODUÇÃO GERAL	xiii
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	xix
7. CAPÍTULO 1	

Preferência alimentar de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) entre *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com milho Bt e não-Bt

2.1. RESUMO	2
2.2. ABSTRACT.....	3
2.3. INTRODUÇÃO.....	4
2.4. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.4.1. Plantas.....	7
2.4.2. Insetos.....	7
2.4.3. Teste de escolha.....	9
2.4.4. Quantificação de Cry1Ab através do teste ELISA	10
2.4.5. Análise dos dados.....	11
2.5. RESULTADOS	12
2.6. DISCUSSÃO	16
2.7. REFERÊNCIAS	20

8. CAPÍTULO 2

Riqueza e composição de espécies de formigas e coleópteros de solo em lavouras de milho Bt e milho não-Bt

3.1. RESUMO	26
3.2. ABSTRACT.....	27
3.3. INTRODUÇÃO.....	28
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.4.1. Estudo de Campo.....	30
3.4.2. Avaliações da entomofauna edáfica.....	30
3.4.3. Identificação dos insetos	31
3.4.3. Análise dos dados.....	35
3.5. RESULTADOS	37
3.6. DISCUSSÃO.....	59
3.6. CONCLUSÃO	64
3.7. REFERÊNCIAS	66

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS **71**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Combinação dos tratamentos testados nos experimentos de teste-de-escolha. Larva ou fêmea adulta de *Harmonia axyridis* com chance de escolha entre lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho Bt e não-Bt..... 10

TABELA 2. Preferência do predador *Harmonia axyridis* de terceiro ínstar (A, B, C) e fêmeas adultas (D, E, F) por lagartas de *Spodoptera frugiperda* de três idades diferentes alimentadas com plantas de milho Bt e plantas de milho não-Bt, 3 e 6 horas após o início do experimento, St Paul (MN), 2011..... 15

TABELA 3. Concentrações de Cry1Ab ($\mu\text{g/g}$ do peso seco) em folhas de milho (MON-810, DK-5048 RR2), lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho Bt durante 24h, 48h, e 72h, e *Harmonia axyridis* larva (3º ínstar) e fêmeas adultas provenientes do teste de escolha entre *S. frugiperda* que se alimentaram de milho Bt e não-Bt..... 15

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Anos agrícolas e localidades de amostragem, coordenadas geográficas, híbrido de milho utilizado e número de amostragem em cada área de estudo. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009 a 2011..... 32

TABELA 2. Produtos químicos aplicados nos sistemas de produção de milho Bt e não-Bt, safras 2009/2010 e 2010/2011 e safrinhas 2010 e 2011, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2012..... 33

TABELA 3. Frequência de ocorrência de 25 espécies de formigas em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safras de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009-2011..... 39

TABELA 4. Frequência de ocorrência de 27 espécies de formigas em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safrinhas de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010 e 2011..... 40

TABELA 5. Índices de diversidade de Simpson (D') e Shannon (H'), Riqueza estimada de espécies pelos índices de Jackknife (Jack 2) e Chao2, Riqueza observada (S_o) e Teste-t pareado por local de amostragem para espécies de formigas em milho Bt e não-Bt em cada área de estudo, em duas safras e duas safrinhas no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009 a 2011..... 41

TABELA 6. Frequência de ocorrência de espécies de Coleoptera em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safras de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009/2010 e 2010/2011...47

TABELA 7. Frequência de ocorrência de espécies de Coleoptera em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safrinhas de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010 e 2011..... 48

TABELA 8. Índices de diversidade de Simpson (D') e Shannon (H'), Riqueza de espécies estimada pelos índice de Jackknife2 (Sest) e Chao2, Riqueza observada (S_o) e Teste t pareado por local de amostragem para espécies de Coleoptera em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt em cada área de estudo, em duas safras e duas safrinhas no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009 a 2011..... 50

TABELA 9. Distribuição de coleópteros coletados por armadilhas pitfall em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt durante a safra de 2009/2010 e 2010/2011, Mato Grosso do Sul, Brasil.....51

TABELA 10. Distribuição de coleópteros coletados por armadilhas pitfall em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt durante a safrinha de 2010 e 2011, Mato Grosso do Sul, Brasil..... 55

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Biomassa das lagartas alimentadas com milho Bt e não-Bt em três idades diferentes, St Paul (MN), 2011. 13

FIGURA 2. Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas com plantas de milho Bt e não-Bt, consumidas por larvas de terceiro ínstar de *Harmonia axyridis* (A, B, C) e fêmeas adultas (D, E, F). Presas de 24 h de idade (A, D), 48 h (B, E), e 72 h (C, F) 14

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Curva cumulativa de espécies de formigas no período de safra 2009/2010 e 2010/2011 e safrinha (2010 e 2011) em sistema de produção de milho Bt e não-Bt, Mato Grosso do Sul, Brasil. Sobs (Mao Tau) = riqueza de espécies observadas; Jack 2 = riqueza estimada de espécies Jackknife 2.. 42

FIGURA 2. Curva cumulativa de espécies de Coleoptera no período de safra 2009/2010 e 2010/2011 e safrinha (2010 e 2011) em sistemas de produção de milho Bt e não-Bt, Mato Grosso do Sul, Brasil. Sobs (Mao Tau) = riqueza de espécies observadas; Jack 2 = riqueza estimada de espécies Jackknife 2..... 46

Resumo

Risco bioecológico do milho transgênico em insetos não-alvo do sistema de produção

As plantas transgênicas resistentes a insetos, ou plantas Bt, apresentam proteção contra ataques de algumas pragas, levando a uma diminuição do uso de inseticidas. Estudos de análise de risco de plantas Bt a organismos não-alvo são importantes ferramentas para que essa tecnologia continue trazendo benefícios econômicos sem afetar a biodiversidade. Portanto, o objetivo desta tese foi investigar o risco bioecológico do milho Bt em insetos não-alvo do sistema de produção. Para isso foi conduzido um bioensaio em laboratório e um estudo em campo. 1. Bioensaio: Foi realizado na Universidade de Minnesota, Saint Paul, EUA. Conduziu-se em laboratório testes de escolha de preferência alimentar para determinar se o predador *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) apresenta alguma preferência entre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas de milho Bt (MON-810) ou de milho não-Bt. O bioensaio foi conduzido em placas de Petri, onde os predadores (larvas e adultos) receberam individualmente presas que foram alimentadas com folhas de milho Bt e não-Bt durante 24, 48 e 72 h. Ambos os estágios do predador consumiram as lagartas oferecidas. Em todas as combinações de predador e idade da presa, o número de cada tipo de presa consumido não diferiu estatisticamente. Através do teste ELISA confirmou-se a presença de Cry1Ab no tecido foliar e *S. frugiperda*, enquanto as concentrações em *H. axyridis* de terceiro ínstar e adultos foram muito baixas. Com base nos dados obtidos conclui-se que *H. axyridis* é um predador potencial de *S. frugiperda* e não apresenta preferência entre presas alimentadas com folhas de milho Bt e não-Bt. 2. Estudo de campo: Realizado no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, este trabalho objetivou verificar se existe diferença na riqueza e composição de espécies de formigas e coleópteros de solo em cultivos de milho Bt e sua isolinha não-Bt, na safra e safrinha no Centro Oeste brasileiro. Esta pesquisa foi desenvolvida em áreas de produção de milho Bt e sua isolinha não-Bt, durante dois anos agrícolas (2009 a 2011). Foram estudadas seis áreas de produção de milho nos períodos de safra e sete áreas nos períodos de safrinha. Para a amostragem dos insetos, foram realizadas coletas através de armadilhas *pitfall*. Os dados foram analisados através de índices faunísticos de riqueza e diversidade de espécies. Verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre a riqueza e diversidade de espécies dos sistemas de produção de milho Bt e não-Bt. Nos períodos de safras ocorreram algumas espécies exclusivas, assim como outras espécies ocorreram exclusivamente nas safrinhas. E ainda, observou-se maior riqueza e diversidade de espécies de formigas e coleópteros nos períodos de safras. Com base nos resultados obtidos nesta tese é possível afirmar que não houve impacto bioecológico do sistema de produção de milho Bt.

Palavras chave: Análise de risco, Coleoptera, Formicidae, *Harmonia axyridis*, plantas Bt, *Spodoptera frugiperda*.

Abstract

Bioecological risk of production system of transgenic maize on non-target insects

Transgenic plants resistant to insects, or Bt plants, are resistant to target pests, leading to a decreased use of insecticides. Studies of risk assessment of Bt crops on non-target organisms are important tools for this technology continue bringing economic benefits without affecting biodiversity. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the bioecological risk of Bt maize production system on non-target insects. For this, we conducted a bioassay and a field study. 1. Bioassay: Was conducted in a laboratory at University of Minnesota, Saint Paul, USA. We conducted choice tests of food preference to determine if the predator *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) shows any preference between *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt maize leaves (MON-810) or non-Bt maize. The bioassay was conducted in Petri dishes. Each predators (larvae and adults) received prey which fed Bt or non-Bt maize leaves for 24, 48 and 72 h. Both stages of the predator consumed the caterpillars that were offered. In all combinations of predator and prey age, the number of each type of prey consumed did not differ statistically. The ELISA test confirmed the presence of Cry1Ab in leaf tissue and *S. frugiperda*, while concentrations *H. axyridis* third instars and adults were very low. Based on the data obtained it appears that *H. axyridis* is a potential predator of *S. frugiperda* and has no preference between prey fed leaves from Bt corn and non-Bt. 2. Field Study: Was conducted in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. This study aimed to determine whether there are differences in composition and species richness of ants and beetles on soil production system of Bt and non-Bt maize, in two growing seasons (2009 to 2011), summer and winter, in the Midwest Brazil. This research was developed in the areas of production of Bt and non-Bt maize. We studied six areas of maize production on summer, and seven areas in winter periods. The insects were collected using pitfall traps. Data were analyzed using faunistics indices of richness and species diversity. Nevertheless, there was no statistically significant difference on richness and species diversity between production systems of Bt and non-Bt maize. In the winter crop season, occurred some unique species, as well as other species occurred exclusively in the summer. Furthermore, there was greater richness and species diversity of ants and beetles during periods of summer crops. Based on the results of this research, we can say that there was no bioecological impact of the production system of Bt maize.

Keywords: risk assessment, Coleoptera, Formicidae, *Harmonia axyridis*, Bt plants, *Spodoptera frugiperda*.

Introdução Geral

Plantas transgênicas, ou geneticamente modificadas (GM), resistentes a insetos expressam genes derivados da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essa bactéria é natural do solo e possui atividade entomopatogênica, o que se deve à presença de uma inclusão cristalina produzida durante a esporulação (pró-toxinas). O cristal, composto por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas cristal (Cry), apresenta ação extremamente tóxica e altamente específica para larvas de insetos de três ordens: Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, dependendo da proteína (Frizzas et al. 2004).

As plantas GM resistentes a insetos ou plantas Bt apresentam proteção contra ataques de algumas pragas, com isso a produtividade poderá ser maior e ocorrerá diminuição no uso de inseticidas (Yu et al. 2011). Hoje, o Brasil é o segundo produtor mundial de plantas GM, com uma área de produção de 30,3 milhões de hectares, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (69 milhões de ha) (James 2011). Dentre essas diversas culturas no Brasil que se produz em alta escala estão a soja, o milho e o algodão GM.

Desde 1996 o milho Bt (*Zea mays* L.) tem sido cultivado nos EUA, primeiramente com resistência a *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Hellmich et al. 2008; Hutchison et al. 2010). Em 2007, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a produção do milho Bt no Brasil com expressão da proteína Cry1Ab em altas concentrações no tecido da planta, o que confere resistência a *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (broca-do-colmo), supressão a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (lagarta-do-cartucho) e *Helicoverpa zea* (Boddie) (lagarta-da-espiga). A partir daí, observou-se alta adoção do cultivo de milho Bt, principalmente devido aos danos causados por pragas da Ordem Lepidoptera, como *S. frugiperda*, praga responsável por perdas significativas (17 a 39%) na produção de milho (Cruz 1995, Fernandes et al. 2003, Santos et al. 2009, Mendes et al. 2011). Desde o início da comercialização do milho Bt em

2008, o Brasil tem aumentado a taxa de produção de plantas transgênicas mais que qualquer outro país, um recorde de 4,9 milhões de hectares, equivalente a um aumento de 20% ao ano (James 2011).

Com a evolução da tecnologia de plantas transgênicas e a expansão do uso de milho Bt, o manejo de resistência de insetos também deve evoluir para favorecer um manejo sustentável de pragas (Onstad et al. 2011, Burkness et al. 2011) e atualmente o milho é a segunda cultura transgênica mais cultivada no mundo, com 51 milhões de hectares distribuídos em 16 diferentes países (James 2011). A necessidade de diminuir os custos, minimizar os impactos ambientais e os riscos à saúde dos produtores, têm tornado as plantas Bt uma alternativa promissora para o controle de insetos. Contudo, é necessária a adoção de técnicas de manejo adequadas, de forma a evitar o surgimento de resistência de insetos (Bobrowski et al. 2003).

Conhecer a diversidade de artrópodes nos habitats terrestres tem sido considerado importante devido à vasta gama de grupos tróficos a serem considerados como indicativos da estabilidade, produtividade e complexidade dos agroecossistemas (Rieske e Buss 2001). Por exemplo, artrópodes predadores como carabídeos, estafilinídeos, formigas e aranhas são importantes por reduzirem populações de pragas (Weseloh 1994; Kromp 1999). Algumas espécies de escarabeídeos e formicídeos utilizam o solo para alocação de recursos, abrigo e nidificação, o que leva a sua importante participação na ciclagem de nutrientes, aeração do solo e dispersores de sementes (Lima et al. 2007, Almeida e Louzada 2009).

Naranjo (2009) em uma revisão de literatura sobre os efeitos de plantas Bt (algodão e milho Bt) sobre invertebrados não-alvo, apresenta resultados de 360 trabalhos que verificaram pouco ou nenhum impacto negativo em organismos não-alvo, principalmente artrópodes. Portanto, para se avaliar impacto, efeitos ou riscos de plantas Bt em organismos não-alvo é necessário considerar o taxón a ser estudado, qual guilda ecológica este pertence, rota de exposição desse organismo à toxina Bt e o controle não-Bt usado para comparar os resultados.

A toxina Cry1Ab é considerada altamente seletiva na sua ação e no impacto do milho Bt sobre os organismos não-alvo que é o mínimo esperado. Entretanto, a produção contínua de toxina pelos tecidos da planta em todo o seu ciclo de desenvolvimento resulta em alto nível de toxina produzida (Pons et al. 2005). Em longo prazo ocorre a exposição de organismos não-alvo a essa toxina inseticida, proveniente de plantas Bt no campo. Esses níveis de exposição devem ser considerados para futuras análises de risco de plantas Bt a herbívoros não-alvo e artrópodes predadores (Harwood et al. 2005). Estudos de análise de risco a artrópodes não-alvo devem ser realizados utilizando uma espécie biológica “de substituição”, ou seja, aquela que melhor representa uma gama de outros artrópodes, e estas pesquisas devem iniciar em laboratório, seguido de semi-campo e campo, se necessário (Dutton et al. 2003, Romeis et al. 2008, Romeis et al. 2011).

Além dos estudos de campo, algumas pesquisas têm sido realizadas em laboratórios sobre efeito da toxina Cry, proveniente de plantas Bt, em predadores que se alimentaram de herbívoros que se alimentaram de plantas Bt. Conforme os resultados, apesar da toxina passar da planta para o herbívoro e deste para seu predador, os níveis de toxina e/ou tipo desta não afetam o predador (Meissle et al. 2005, Torres et al. 2006, Torres e Ruberson 2006, 2008, Esteves Filho et al. 2010, Li e Romeis 2010, Álvarez-Alfageme et al. 2011, Li et al. 2011).

O assunto desta tese é sobre os riscos do milho Bt em insetos não-alvo. O primeiro capítulo trata da exposição do predador *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) à toxina Cry. Para isso foi desenvolvido um bioensaio de interação tritrófica constituído de planta de milho Bt e sua isolinha não-Bt, uma espécie de herbívoro e uma espécie de predador. Com esse capítulo foi possível responder duas questões: 1. Se o predador tiver a chance de escolher entre uma presa (herbívoro) que se alimentou de planta Bt e uma presa que se alimentou de planta não-Bt, este terá preferência por qual tipo de presa?; e 2. Qual o teor de toxina Cry adquirido pelo predador através da presa? As respostas a essas questões sobre preferência alimentar (tipo de presa) servem de apoio aos estudos relacionados a evolução de resistência de insetos.

O segundo capítulo trata de uma análise faunística de Formicidae e Coleoptera em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt no Estado de Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. Este estudo foi desenvolvido nas duas épocas de cultivo da cultura no MS, ou seja, na safra de verão e na safrinha (segunda safra) de inverno. Esses insetos têm grande importância para os agroecossistemas, pois são grupos bem conhecidos taxonomicamente, fáceis de coletar e bastante utilizados em estudos sobre impacto ambiental. E a pergunta desta pesquisa foi: existe diferença na fauna de formigas e coleópteros de solo entre áreas de cultivo de milho Bt e sua isolinha não transformada, não-Bt? A riqueza e a composição de espécies dos dois grupos estudados mostram se existe, ou não, algum efeito proveniente do sistema de produção das plantas que expressam a toxina inseticida (Cry). E, esses resultados poderão ser utilizados para complementar os estudos futuros de comparação de fauna em áreas de produção de milho Bt e verificar se houve efeito nessa fauna a longo prazo.

A estrutura geral da tese está de acordo com as normas do programa de Pós-Graduação em Agronomia, mas o primeiro capítulo está escrito nas normas da revista PLoS ONE, e o segundo capítulo nas normas da revista Neotropical Entomology, com algumas adaptações para a tese.

Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, S.S.P.; LOUZADA, J.N.C. Estrutura da Comunidade de Scarabaeinae (Scarabaeidae: Coleoptera) em Fitofisionomias do Cerrado e sua Importância para a Conservação. **Neotropical Entomology**, 38(1): 32-43, 2009.
- ÁLVAREZ-ALFAGEME, F.; BIGLER, F.; ROMEIS, J. Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. **Transgenic Research**, 20: 467-479, 2011.
- BURKNESS, E.C.; O'ROURKE, P.K.; HUTCHISON, W.D. Cross-pollination of nontransgenic corn ears with transgenic Bt corn: Efficacy against Lepidopteran pests and implications for resistance management. **Journal of Economic Entomology**, 104(5): 1476-1479, 2011.
- BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, 34(1): 843-850, 2003.
- CRUZ, I. Lagarta-do-cartucho na cultura do milho. **Circular Técnica**, 21. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS. 1995. 45p
- DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. **BioControl**, 48: 611-636, 2003.
- ESTEVES FILHO, A.B.; OLIVEIRA, J.V.; TORRES, J.B.; GONDIM JR, M.G.C. Biologia Comparada e Comportamento de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) em Algodoeiro Bollgard TM e Isolinha não-Transgênica. **Neotropical Entomology**, 39(3): 338-344, 2010.
- FERNANDES, O.D.; PARRA, J.R.P.; NETO, A.F.; PÍCOLI, R.; BORGATTO, A.F.; DEMÉTRIO, C.G.B. Effect of the genetically modified corn Mon810 on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 2(2): 25-35, 2003.
- FRIZZAS, M.R.; CUNHA, U.S.; MACEDO, P.M. Plantas transgênicas resistentes a insetos. **Revista Brasileira de Agrociências**, 10(1): 13-18, 2004.

HARWOOD, J.D.; WALLIN, W.G.; OBRYCKI, J.J. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. **Molecular Ecology**, 14: 2815-2823, 2005.

HELLMICH, R.L.; ALBAJES, R.; BERGVINSON, D.; PRASIFKA, J.R.; WANG, Z.Y.; WEISS, M.J. The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. In: ROMEIS, J.; SHELTON, A.M.; KENNEDY, G.G. **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. Springer Science + Business Media B.V., 2008. pp. 119-158.

HUTCHISON, W.D.; BURKNESS, E.C.; MITCHELL, P.D.; MOON, R.D.; LESLIE, T.W.; FLEISCHER, S.J.; ABRAHAMSON, M.; HAMILTON, K.L.; STEFFEY, K.L.; GRAY, M.E.; HELLMICH, R.L.; KASTER, L.V.; HUNT, T.E.; WRIGHT, R.J.; PECINOVSKY, K.; RABAEY, T.L.; FLOOD, B.R.; RAUN, E.S. Areawide suppression of european corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science**, 30: 222-225, 2010.

LIMA, H.V.; OLIVEIRA, T.S.; OLIVEIRA, M.M.; MENDONÇA, E.S.; LIMA, P.J.B.F. Indicadores de qualidade do solo em sistemas de cultivo orgânico e convencional no semi-árido cearense. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, 31: 1085-1098, 2007.

LI, Y.; ROMEIS, J. Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. **Biological Control**, 53: 337-344, 2010.

LI, Y.; ROMEIS, J.; WANG, P.; PENG, Y.; SHELTON, A.M. A comprehensive assessment of the effects of Bt cotton on *Coleomegilla maculata* demonstrates no detrimental effects by Cry1Ac and Cry2Ab. **PLoS ONE**, 6 (7): e22185, 2011.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. **ISAAA Brief No. 43**. ISAAA, Ithaca, NY, 2011.

KROMP, B. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 74: 187-228, 1999.

MEISSLE, M.; VOJTECH, E.; POPPY, G.M. Effects of Bt maize-fed prey on the generalist predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). **Transgenic Research**, 14: 123-132, 2005.

MENDES, S.M.; BOREGAS, K.G.B.; LOPES, M.E.; WAQUIL, M.S.; WAQUIL, J.M. Fall armyworm responses to genetically modified maize expressing the toxin Cry1A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46(3): 239-244, 2011.

NARANJO, S. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 4(11): 1-23, 2009.

ONSTAD, D.W.; MITCHELL, P.D.; HURLEY, T.M.; LUNDGREN, J.G.; PORTER, R.P.; KRUPKE, C.H.; SPENCER, J.L.; DIFONZO, C.D.; TRACEY, S.B.; HELLMICH, R.L.; BRUSCHMAN, L.L.; HUTCHISON, W.D.; TOOKER, J.F. Seeds of change: Corn seed mixtures for resistance management and integrated pest management. **Journal of Economic Entomology**, 104(2): 343-352, 2011.

PONS, X.; LUMBIERRES, B.; LÓPEZ, C.; ALBAJES, R. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: A farm scale study. **European Journal of Entomology**, 102: 73-79, 2005.

RIESKE, L.K.; BUSS, L.J. Influence of site on diversity and abundance of ground-and litter-dwelling Coleoptera in Appalachian Oak-Hickory forests. **Environmental Entomology**, 30(3):484-494, 2001.

ROMEIS, J.; BARTCH, D.; BIGLER, F.; CANDOLFI, M.P.; GIELKENS, M.M.C.; HARTLEY, S.E.; et al. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. **Nature Biotechnology**, 26(2):203-208, 2008.

ROMEIS, J.; HELLMICH, R.L.; CANDOLFI, M.P.; CARSTENS, K.; SCHRIJVER, A.; GATEHOUSE, A.M.R.; HERMAN, R.A.; HUESING, J.; MCLEAN, M.A.; RAYBOULD, A.; SHELTON, A.M. Recommendations for the design of laboratory studies on non-target arthropods for risk assessment of genetically engineered plants. **Transgenic Research**, 20: 1-22, 2011.

SANTOS, K.B.; NEVES, P.; MENEGUIM, A.M.; SANTOS, R.B.; SANTOS, W.J.; VILLAS BOAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.B.; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to

Spodoptera eridania (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, 50: 157-163, 2009.

TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R. Interactions of Bt-cotton and the omnivorous big-eyed bug *Geocoris punctipes* (Say), a key predator in cotton fields. **Biological Control**, 39: 47-57, 2006.

TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R.; ADANG, M. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. **Agricultural and Forest Entomology**, 8: 191-202, 2006.

TORRES, J.B.; RUBERSON, J.R. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. **Transgenic Research**, 17: 345-354, 2008.

WESELOH, R.M. Spatial distribution of the ants *Formica subsericea*, *F. neogagates*, and *Aphaenogaster fulva* (Hymenoptera: Formicidae) in Connecticut. **Environmental Entomology**, 23:1165-1170, 1994.

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**, 53(7): 520-538, 2011.

Capítulo 1

Preferência alimentar de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) entre *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com milho Bt e não-Bt

Resumo - Preferência alimentar de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) entre *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com milho Bt e não-Bt

Um tema recente em manejo de resistência de insetos pragas ao milho geneticamente modificado (GM) consiste na mistura de sementes de milho não-Bt com sementes de milho Bt, o que é chamado de “refúgio ensacado”. Esta mistura de sementes resulta em algumas plantas não-Bt em uma grande área de plantas Bt, o qual aumenta a possibilidade de encontro de predadores e presas que se alimentaram de milho Bt e não-Bt. Conduziu-se em laboratório testes de escolha de preferência alimentar para determinar se o predador generalista, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), apresenta alguma preferência entre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas de milho Bt (MON-810) ou de milho não-Bt. Os predadores foram larvas de terceiro ínstar e fêmeas adultas de *H. axyridis*. O bioensaio foi conduzido em placas de Petri, onde os predadores receberam individualmente presas que foram alimentadas com folhas de milho Bt e não-Bt durante 24, 48 e 72 h. Dez e 15 lagartas de cada tratamento foram oferecidas para predadores de terceiro ínstar e adultos, respectivamente. Foram realizadas observações das arenas 1, 2, 3, 6, 15 e 24 h depois do início do experimento para determinar o número e tipo de presa consumida por cada predador. Presas de cada idade que foram alimentadas com milho não-Bt foram significativamente maiores que lagartas alimentadas com folhas Bt. Ambos os estágios do predador consumiram as lagartas oferecidas. Todavia, em todas as combinações de predador e idade da presa, o número de cada tipo de presa (alimentadas com milho Bt e não-Bt) consumido não diferiu estatisticamente. Através do teste ELISA confirmou-se a presença de Cry1Ab no tecido foliar (23-33µg/g peso seco) e *S. frugiperda* (2,1-2,2µg/g), enquanto as concentrações em *H. axyridis* de terceiro ínstar e adultos foram muito baixas (0,01-0,2 µg/g). Com base nos dados obtidos conclui-se que *H. axyridis* é um predador potencial de *S. frugiperda* e não apresenta preferência entre presas alimentadas com folhas de milho Bt e não-Bt. A não preferência entre presas alimentadas com Bt e não-Bt pode estar a favor das estratégias do manejo de resistência de insetos ao utilizar mistura de sementes de plantas Bt e não-Bt.

Palavras-chave: teste de escolha, manejo da resistência de insetos (IRM), refúgio ensacado, milho transgênico, interação tritrófica

Abstract – Preference of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) between Bt and non-Bt maize fed *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) A recent shift in managing insect resistance to genetically engineered (GE) maize consists of mixing non-GE seed with GE seed known as “refuge in a bag”, which increases the likelihood of predators encountering both prey fed Bt and prey fed non-Bt maize. We therefore conducted laboratory choice-test feeding studies to determine if a predator, *Harmonia axyridis*, shows any preference between prey fed Bt or non-Bt maize leaves. The prey species was *Spodoptera frugiperda*, which were fed Bt maize (MON-810), expressing the single Cry1Ab protein, or non-Bt maize. The predators were third instar larvae and female adults of *H. axyridis*. In Petri dish arenas, individual predators were offered Bt and non-Bt fed prey larvae that had fed for 24, 48 or 72 h. Ten and 15 larvae of each prey type were offered to third instar and adult predators, respectively. Observations of arenas were conducted at 1, 2, 3, 6, 15 and 24 h after the start of the experiment to determine the number and type of prey eaten by each individual predator. Prey larvae of each age that fed on non-Bt leaves were significantly larger than larvae fed Bt leaves. Both predator stages had eaten nearly all the prey by the end of the experiment. However, in all combinations of predator stage and prey age, the number of each prey type consumed did not differ significantly. ELISA measurements confirmed the presence of Cry1Ab in leaf tissue (23-33µg/g dry weight) and *S. frugiperda* (2.1-2.2µg/g), while mean concentrations in *H. axyridis* were very low (0.01-0.2 µg/g). These results confirm the predatory status of this lady beetle on *S. frugiperda* and that both *H. axyridis* adults and larvae show no preference between prey fed Bt and non-Bt maize. The lack of preference between Bt-fed and non-Bt-fed prey should act in favor of insect resistance management strategies using mixtures of GE and non-GE maize seed.

Keywords: choice assay, insect resistance management (IRM), refuge in a bag, transgenic corn, tritrophic interaction

Introdução

Plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos produzem toxinas Cry da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) e tem sido comercializadas em 29 países (James 2011). Desde 1996 o milho Bt (*Zea mays* L.) tem sido cultivado nos EUA, primeiramente com resistência a *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae) (Hellmich et al. 2008; Hutchison et al. 2010). A recente aprovação do milho Bt no Brasil sugere alta adoção do cultivo devido aos danos causados por pragas da Ordem Lepidoptera, por exemplo, a lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), praga responsável por perdas significativas (17 a 39%) na produção de milho (Cruz 1995, Fernandes et al. 2003, Santos et al. 2009, Mendes et al. 2011). Desde a comercialização do milho Bt em 2008, o Brasil tem aumentado a taxa de produção de plantas transgênicas mais que qualquer outro país, um recorde de 4,9 milhões de hectares, equivalente a um aumento de 20% ao ano (James 2011).

O foco do presente estudo foi avaliar o risco de efeitos adversos de milho Bt sobre artrópodes não-alvo. Estudos anteriores demonstraram que as proteínas Cry de Bt expressas em plantas GM podem ser adquiridas por herbívoros não-alvo e predadores. Mas em interações tritróficas, herbívoros que consumiram proteínas Cry não afetaram negativamente a sobrevivência ou outros parâmetros de história de vida do terceiro nível trófico, como heterópteros (Torres et al. 2006, Torres and Ruberson 2008) e joaninhas (Álvarez-Alfageme et al. 2011). Assim como o uso de milho Bt expande e a tecnologia de plantas transgênicas evolui, o manejo da resistência a insetos (IRM) também deve evoluir para fornecer uma gestão sustentável de manejo de pragas (Onstad et al. 2011, Burkness et al. 2011).

Para diminuir o risco evolutivo de resistência às pragas, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA tem requerido aos produtores a cultivar uma área de refúgio. Para *O. nubilalis* nos EUA, por exemplo, áreas de refúgio com milho não-Bt devem ser plantadas dentro de 0,5 milhas do milho Bt (Huang et al. 2011). Nos últimos anos, devido a resistência de *Diabrotica virgifera*

virgifera (LeConte) (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho, uma nova estratégia de refúgio foi adotada, a qual consiste em uma mistura de sementes de milho Bt e não-Bt no mesmo saco resultando em um campo misto de plantas Bt e não-Bt (Onstad et al. 2011). Esta mistura de sementes de Bt com proporções pequenas de não-Bt em uma saco ou plantadeiras (5-10% não-GM) é chamado de “refúgio ensacado” (Onstad et al. 2011). Através de maior integração de pragas no campo, a mistura de sementes pode facilitar mais a persistência de inimigos naturais dentro dos campos de milho do que as formas de refúgio atuais (Andow 2008, Onstad et al. 2011) com potencial para desenvolvimento de resistência (Heimpel et al. 2005). A co-ocorrência de herbívoros que se alimentaram de plantas Bt e não-Bt aumentará, assim como os predadores com a chance de escolha entre presas que se alimentaram de Bt e não-Bt.

No Brasil, a intensidade de danos causados pela lagarta-do-cartucho é maior quando não há inimigos naturais presentes no campo (Figueiredo et al. 2006). Coccinelídeos entomófagos tem sido frequentemente reportados predando ovos e larvas de algumas espécies de Lepidoptera, incluindo a lagarta-do-cartucho (Evans 2009). Na América do Sul, uma espécie invasora de joaninha, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), está estabelecendo populações (Koch et al. 2006a, 2011). Primeiramente detectada na Argentina em 2001, no Brasil em 2002 (Almeida e Silva 2002) e mais recentemente foi encontrada no Mato Grosso do Sul em 2010 (Koch et al. 2011).

O ciclo de vida de *H. axyridis* sob a temperatura de 26° C e com dieta a base de *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae), apresentou na fase de ovo 2,8 dias; no primeiro ínstar 2,5 dias; no segundo ínstar 1,5 dias; terceiro ínstar 1,8 dias; quarto ínstar 4,4 dias; e pupa 4,5 dias (LaMana e Miller 1998). Os adultos, dependendo da temperatura, podem viver de 30 a 90 dias (Soares et al. 2001), e as fêmeas adultas apresentam maior taxa de predação que os machos (Lucas et al. 1997).

Este coccinelídeo ocorre em muitos sistemas agrícolas onde se alimenta principalmente afídeos, mas também, sabe-se que preda outros artrópodes imaturos incluindo larvas de Lepidoptera

(Koch 2003). *H. axyridis* se alimentou de *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae) mesmo na presença de *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe (Hemiptera: Aphididae) (Koch et al. 2005). Na revisão feita por Koch (2003) são apresentados vários resultados de resposta funcional para *H. axyridis*: resposta funcional Tipo I para predação de *Rhopalosiphum prunifoliae* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae); resposta funcional Tipo II para predação de larvas de *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) (Hemiptera: Aphididae); também apresentou Tipo II para comparar a predação de adultos em duas espécies de afídeos, e também para predação de larvas da borboleta monarca (*D. plexippus*); e resposta funcional Tipo III para predação de *H. axyridis* em *Cinara* spp (Hemiptera: Aphididae).

Trabalhos vêm sendo desenvolvidos para incorporar este predador nos programas de manejo integrado de pragas (MIP) do milho (Musser e Shelton 2003, Galvan et al. 2005a, Galvan et al. 2005b, Galvan et al. 2006, Koch et al. 2006b).

A expansão de *H. axyridis* no Brasil pode levar ao aumento da exposição de *S. frugiperda* a este predador em diferentes sistemas agrícolas. E a utilização de sistema de produção de milho Bt com refúgio ensacado aumentará a co-ocorrência de herbívoros que se alimentaram de planta Bt e não-Bt, assim como os predadores com a chance de escolha entre estes dois tipos de presas. A existência de preferência do predador por um tipo de presa poderia contribuir para a evolução de resistência de pragas em áreas de cultivo de milho Bt com refúgio ensacado. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar se *H. axyridis* demonstra preferência entre lagartas que se alimentaram de milho Bt e milho não-Bt.

Materiais e Métodos

Plantas

Dois híbridos de milho foram utilizados neste estudo; um híbrido GM, DKC-5048 RR2(Bt) (evento MON810), e sua isolinha convencional, DKC-4840 (não-Bt). O milho DKC-5048 RR2 expressa o gene *cry1Ab* proveniente do Bt, tendo como alvo algumas espécies praga da Ordem Lepidoptera. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação da Universidade de Minnesota, 27±1°C, 70±5% UR, fotoperíodo de 16:8 h (luz: escuro). Foram semeadas semanalmente sementes dos híbridos de milho em potes de um litro (4 sementes por pote) preenchidos com o solo Metromix 582 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA). O tecido foliar foi retirado das plantas entre os estágios vegetativos V3 e V6 (Abendroth et al. 2011) para alimentar as lagartas de *S. frugiperda*. A presença ou ausência de proteína Cry1Ab no tecido foliar usado para cada bioensaio foi confirmado usando o kit para Cry1Ab Envirologix Inc., Portland, ME; QuickStix™.

Também foram retiradas amostras de folhas para quantificar a proteína Cry1Ab. Cada amostra consistiu de pedaços de folha (1 cm de diâmetro) coletados três vezes (24, 48 e 72h após o início do bioensaio) de 10 plantas diferentes. As amostras foram obtidas da parte média superior das folhas de plantas Bt e não-Bt. Posteriormente, as amostras foram pesadas em tubos de 1,5 ml e armazenadas em freezer a -80 °C até o momento da quantificação da proteína Cry utilizando ELISA.

Insetos

Spodoptera frugiperda - Ovos de *S. frugiperda* foram adquiridos na French Agricultural Research (Lamberton, MN). As massas de ovos foram colocadas em recipientes de plástico (18 cm x 8 cm) e mantidas em câmaras de climatizada a 25±1°C, 70±5% UR, e fotoperíodo de 16:8 (D: N) h até a eclosão. As larvas foram alimentadas com folhas de milho durante 24, 48 ou 72 h, sendo que

estas mesmas folhas permaneceram com as larvas durante as 72h. Após cada período de alimentação, em cada bioensaio, quatro sub-amostras com 20 lagartas foram testadas para presença de toxina Bt usando kit para Cry1Ab QuickStixTM. Outra amostra foi utilizada para determinar a biomassa larval (de cada tratamento alimentar e idade de lagartas). Para isto utilizou-se balança de precisão (Mettler AE260 DeltaRange[®]) para pesar os grupos de lagartas (alimentadas com Bt: 5 grupos de 50 lagartas de 24h, 5 grupos de 40 lagartas de 48h, 5 grupos de 20 lagartas de 72h; alimentadas com não-Bt: 5 grupos de 50 lagartas de 24h, 5 grupos de 40 lagartas de 48h, 5 grupos de 20 lagartas de 72h), e então a média do peso larval foi calculado.

Harmonia axyridis – Para os experimentos foram utilizadas larvas de terceiro ínstar e fêmeas adultas de *H. axyridis*, as quais foram obtidas da colônia de manutenção do laboratório de entomologia da Universidade de Minnesota (Tween Cities, MN, EUA). Ovos de *H. axyridis* foram mantidos em placas de Petri (10 x 1,5 cm) em câmara climatizada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ UR e fotoperíodo de 16:8 h (L: E). Vinte e quatro horas após a eclosão, larvas de primeiro ínstar foram individualizadas em placas de Petri (6 x 1,5 cm) e criadas com dieta natural, ovos de *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). A água foi provida através de espuma floral. Os predadores foram criados sob estas condições até o momento de serem utilizados nos bioensaios (6 a 24 h após a mudança para o terceiro ínstar e fêmeas de 6 a 48 h após a mudança para o estágio adulto). Todos os indivíduos *H. axyridis* utilizados no experimento não foram alimentados 24h antes do início do bioensaio.

Também foram realizadas análises de quantificação do teor de toxina Bt na presa (*S. frugiperda*) e no predador (*H. axyridis*). Cinco amostras foram retiradas para cada idade de presa (24, 48 e 72h) de cada tratamento (alimentadas com milho Bt e milho não-Bt). Dez amostras para o predador de terceiro ínstar de cada tipo de presa oferecida (24, 48 e 72h de idade alimentadas com milho Bt e não-Bt); 10 amostras para predadores adultos que se alimentaram de presas de 24 e 48h (alimentadas com milho Bt e não-Bt); e 20 amostras para predadores que se alimentaram de

lagartas de 72h (Bt e não-Bt). Todas as amostras dos insetos foram armazenadas em tubos de 1,5 ml e acondicionadas em freezer a -80°C até a realização do teste ELISA.

Teste de escolha

O experimento foi realizado em laboratório de entomologia da Universidade de Minnesota, Campus de Twin Cities, Saint Paul-MN, EUA. Placas de Petri (6 x 1,5 cm) foram usadas como arenas experimentais e os bioensaios foram conduzidos em câmara climatizada a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ UR e fotoperíodo de 16:8 h (L: E). Para o teste de escolha, *S. frugiperda* alimentadas com milho Bt e *S. frugiperda* alimentadas com milho não-Bt com 24, 48 ou 72h de idade foram oferecidas como presa. A combinação de estágio de predador e tratamentos de presa estão apresentados na Tabela 1. *H. axyridis* de terceiro ínstar recebeu 10 indivíduos de presa de cada tipo e *H. axyridis* adulto recebeu 15 indivíduos de presa de cada tipo, resultando em 20 e 30 presas oferecidas, respectivamente. Foi utilizado plástico filme para vedar as placas de Petri para prevenir o escape de lagartas. Para saber qual presa consumiu milho Bt ou não-Bt, presas de um dos tratamentos foram marcadas na superfície dorsal do abdomen com um pincel marcador permanente (Sharpie Ultra-Fine Point Permanent Marker, Newell Rubbermaid Office Products) pouco antes do início das observações. As marcações em presas alimentadas com Bt ou não-Bt foram aleatórias para não haver efeito de escolha relacionado as marcações. Cada um dos experimentos foram conduzidos separadamente, de 14 a 29 repetições por experimento (Tabela 1). O número de repetições variou entre larvas e adultos em função da disponibilidade de larva em idade teste. A inspeção de consumo foi conduzida nas arenas 1, 2, 3, 6, 15 e 24 h após o início do experimento para determinar o número e o tipo de presa consumida (alimentadas com plantas Bt e não-Bt) por cada indivíduo de *H. axyridis*.

Para identificar se a marcação feita nas lagartas poderia influenciar na escolha do predador pela presa, foi realizado um pré-teste. Em cada arena haviam 10 lagartas marcadas e 10 não

marcadas que se alimentaram do mesmo tipo de milho, Bt ou não-Bt. Este teste foi conduzido com *H. axyridis* de terceiro ínstar, as quais foram oferecidas presas de 24 e 48 h (10 repetições), e presas de 72h (7 repetições). As placas de Petri e as condições experimentais foram conforme descrito anteriormente.

Para conhecer o potencial do canibalismo entre as lagartas que se alimentaram de milho Bt e não-Bt, foram conduzidos testes somente com presas na arena. Para isso, 10 lagartas alimentadas com folhas de milho Bt e 10 alimentadas com não-Bt foram colocadas em uma arena. O teste de avaliação de canibalismo foi conduzido nas mesmas condições de tempo que o teste de escolha, ou seja, lagartas de 24h (25 repetições), 48h (15 repetições) e 72h (10 repetições) de idade. As lagartas foram marcadas conforme descrito acima, o número e o tipo de lagarta consumido foi anotado. As condições experimentais das arenas foram as mesmas descritas anteriormente.

Tabela 1. Combinação dos tratamentos testados nos experimentos de teste-de-escolha. Larva ou fêmea adulta de *Harmonia axyridis* com chance de escolha entre lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com milho Bt e não-Bt.

Experimento	Predador	Presa tipo 1 (alimentadas com milho não-Bt)	Presa tipo 2 (alimentadas com milho Bt)	n
A	3° instar	Lagarta de 24h	Lagarta de 24h	14-20
B	3° instar	Lagarta de 48h	Lagarta de 48h	16-26
C	3° instar	Lagarta de 72h	Lagarta de 72h	19-29
D	♀ adulto	Lagarta de 24h	Lagarta de 24h	20
E	♀ adulto	Lagarta de 48h	Lagarta de 48h	20
F	♀ adulto	Lagarta de 72h	Lagarta de 72h	20

Quantificação de CryIAb através do teste ELISA

Amostras de folhas, *S. frugiperda* e *H. axyridis* foram liofilizadas e seu peso seco foi determinado. Amostras de folhas foram cortadas em pequenos pedaços usando tesoura. Uma bola

de carboneto de tungstênio (5 mm) foi adicionada a cada tubo de microrreação junto com o tampão de fosfato salino e Tween (PBST) em um volume de 300µl por amostra de insetos e 500-750µl por amostra de folhas. As amostras foram homogeneizadas durante 3 minutos a 30 Hz em um Tissue Lyser II (Quiagen, Hombrechtikon, Switzerland). Após a centrifugação a $13000 \times g$ por 3 minutos, os sobrenadantes foram diluídos com a solução PBST 100 vezes para folhas de milho Bt e cinco vezes para as amostras de *S. frugiperda*. As amostras de folhas não-Bt e *H. axyridis* foram usadas sem diluição. As concentrações de Cry1Ab foram medidas através de *double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays* (DAS-ELISA) comercialmente disponível pela Agdia (Elkhart, IN). Uma curva padrão de detecção foi empregada utilizando as seis concentrações de Cry1Ab entre 0,3 e 10 ng/ml, a partir da qual foi estimada a concentração de Cry1Ab nas amostras coletadas. Proteína Cry1Ab purificada com atestado de pureza e qualidade foi fornecida pela Monsanto. As placas foram processadas de acordo com o protocolo do fabricante. A densidade óptica (OD) foi medida no comprimento de onda de luz 620 nm com um leitor de placas SpectrafluorPlus (Tecan, Männedorf, Switzerland). Concentrações de Cry1Ab (em µg/ g de peso seco) foram calculadas a partir da curva padrão usando análise de regressão. O limite de detecção (LOD) do sistema de ensaio foi determinado com base no desvio padrão dos valores de OD de todas as amostras não-Bt multiplicado por 3.

Análise dos dados

Os dados foram analisados utilizando o programa SAS Statistical Package (SAS Institute 1996, Cary, North Carolina, USA). Para cada classe de idade da presa, a média de biomassa das lagartas que se alimentaram de plantas Bt e não-Bt foram comparadas através do teste *t* (PROC TTEST). Para as combinações de cada classe de idade da presa e estágio do predador do teste de escolha, o número de presas alimentadas com Bt e não-Bt consumidas pelo predador foi comparado através do teste não paramétrico Wilcoxon signed rank test (PROC UNIVARIATE). Como o

consumo do predador pela presa foi cumulativo durante o tempo estudado, as análises estatísticas foram realizadas somente para dois períodos de observação para cada bioensaio. Os períodos de 3 e 6 horas permitiu tempo suficiente para que a maior parte da predação ocorresse. Uma análise similar também utilizando Wilcoxon signed rank test foi conduzida para analisar o canibalismo e os estudos prévios de marcações nas presas, mas somente para as observações no período de 6 h.

Resultados

A marcação das presas não afetou significativamente a preferência dos predadores para presas de 24 h ($Z= 5,5$; $p=0,3750$), 48 h ($Z= -2,0$; $p=0,8828$) e 72 h ($Z= -3,5$; $p=0,5000$). Além disso, no teste de canibalismo, em arenas apenas com lagartas, a taxa de canibalismo foi muito baixa ($0,25\pm 0,10$; $0,47\pm 0,15$; $0,54\pm 0,13$ lagartas de 24, 48, e 72 h, respectivamente) e não diferiu entre lagartas que se alimentaram de plantas de milho Bt e não-Bt durante 24 h ($Z= -6$; $p= 0,5625$), 48 h ($Z= 2$; $p=1$) e 72 h ($Z= 0$; $p=1$). Portanto as marcações e taxas de canibalismo não influenciaram nos resultados.

A média de concentrações de Cry1Ab nas folhas de milho Bt foi de 23-33 $\mu\text{g/g}$ do peso seco (Tabela 3), E não houve diminuição da proteína Bt no decorrer do tempo. Lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com milho Bt no período de 24 a 72h continham menor nível de Cry1Ab que nas folhas de milho (2,1-2,2 $\mu\text{g/g}$ do peso seco). Os valores para os diferentes períodos de alimentação foram similares. *H. axyridis* de terceiro ínstar e adultas que predaram lagartas de 24h no teste de escolha continham em média 0,05-0,17 e 0,01-0,02 μg de Cry1Ab/g de peso seco, respectivamente. Os valores foram próximos do LOD, o qual era de 0,03 a 0,007 $\mu\text{g/g}$ do peso seco para *H. axyridis* de terceiro ínstar e fêmeas adultas, respectivamente. Não foi detectado proteína Cry1Ab em folhas de milho não-Bt (LOD = 0.01 $\mu\text{g/g}$ do peso seco) e lagartas que se alimentaram dessas folhas (LOD = 0,03 $\mu\text{g/g}$ do peso seco).

As lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de plantas de milho não-Bt foram significativamente maiores que aquelas que se alimentaram de plantas Bt durante 24 horas (df=8; $t=-14,03$; $p=0,0001$), 48h (df=8, $t=-2,92$, $p=0,0139$) e 72h (df=8, $t=-9,44$, $p=0,0001$) (Figura 1).

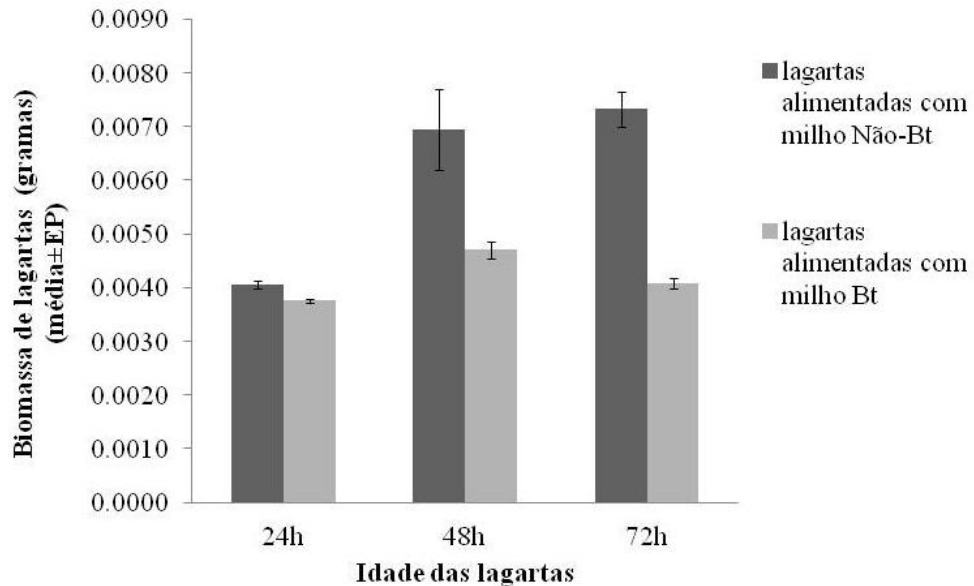


Fig. 1. Biomassa das lagartas alimentadas com milho Bt e não-Bt em três idades diferentes, St Paul (MN), 2011.

Apesar da diferença na biomassa das lagartas, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o número de presas consumidas para lagartas alimentadas com milho Bt e não-Bt em ambos os estágios do predador e combinações de idade da presa (Fig. 2, Tabela 2). Todavia, um tempo maior foi necessário para *H. axyridis* adulta consumir larvas mais velhas (72h). No final das observações *H. axyridis* de terceiro ínstar consumiu $9,775\pm0,105$ (média±EP) das lagartas de 24h oferecidas e $9,366\pm0,185$ (média±EP) das presas de 72h.

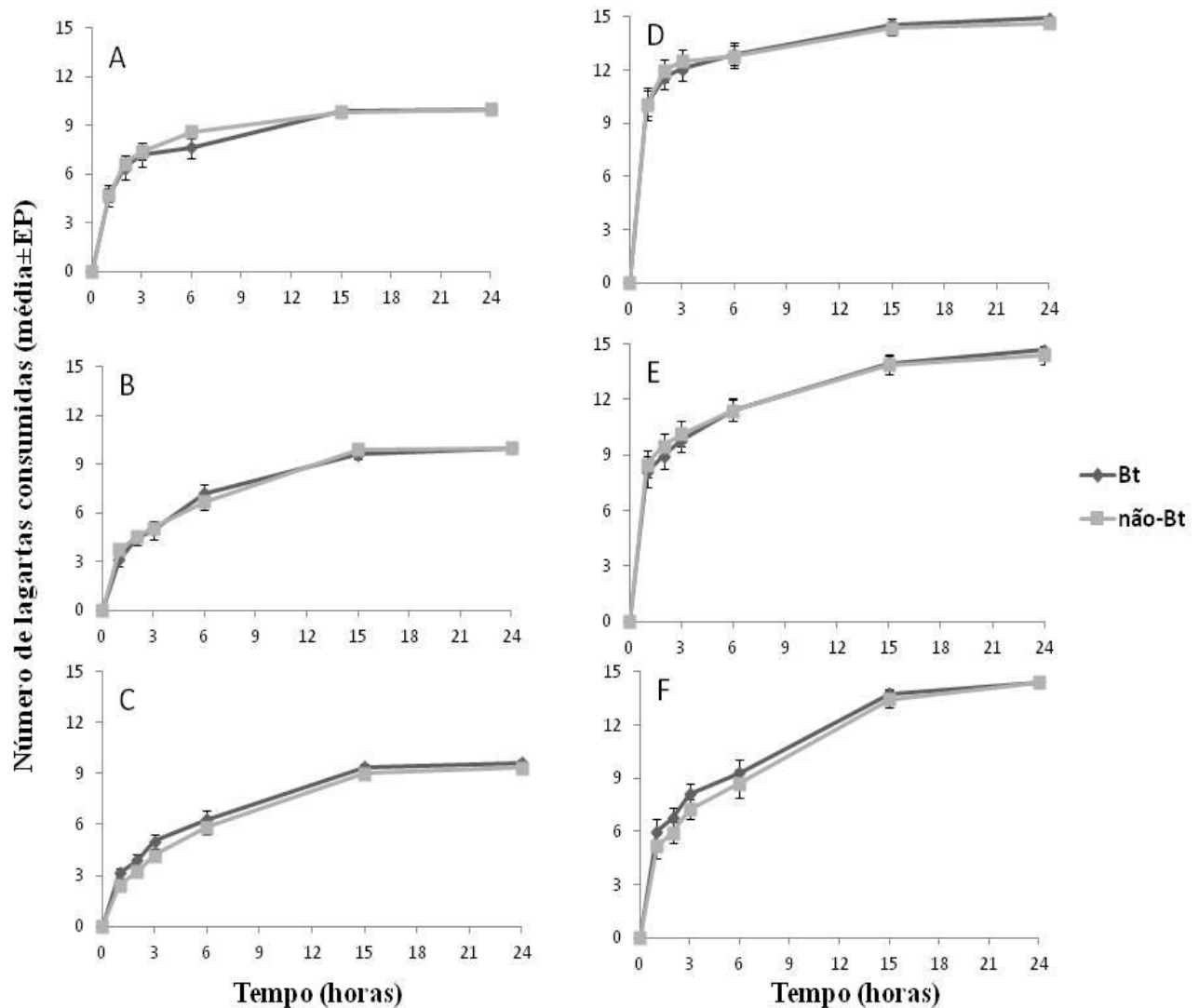


Fig. 2. Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas com plantas de milho Bt e não-Bt, consumidas por larvas de terceiro instar de *Harmonia axyridis* (A, B, C) e fêmeas adultas (D, E, F). Presas de 24 h de idade (A, D), 48 h (B, E), e 72 h (C, F).

Tabela 2. Preferência do predador *Harmonia axyridis* de terceiro ínstar (A, B, C) e fêmeas adultas (D, E, F) por lagartas de *Spodoptera frugiperda* de três idades diferentes alimentadas com plantas de milho Bt e plantas de milho não-Bt, 3 e 6 horas após o início do experimento. St Paul (MN), 2011.

Experimento	3 h			6 h		
	Z*	p	n	Z*	p	n
A	-0,5	0,982	20	-7,5	0,25	14
B	-9	0,822	26	19,5	0,256	16
C	54	0,169	29	13	0,519	19
D	-7	0,564	20	3,5	0,699	20
E	-13,5	0,625	20	1,5	0,96	20
F	31,5	0,074	20	22	0,265	20

*Wilcoxon signed rank test;

Tabela 3. Concentrações de Cry1Ab ($\mu\text{g/g}$ do peso seco) em folhas de milho (MON-810, DKC-5048 RR2), lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho Bt durante 24h, 48h, e 72h, e *Harmonia axyridis* larva (3° ínstar) e fêmeas adultas provenientes do teste de escolha entre *S. frugiperda* que se alimentaram de milho Bt e não-Bt.

Tempo	Folhas de milho	<i>S. frugiperda</i>	<i>H. axyridis</i>	Fase do predador	Experimento
0h	24,9 \pm 1,24 (n = 10)				
24h	23,4 \pm 2,35 (n = 10)	2,1 \pm 0,29 (n = 5)	0,05 \pm 0,014 (n = 10)	3° ínstar	A
			0,02 \pm 0,005 (n = 10)	♀ adulta	D
48h	30,5 \pm 1,36 (n = 10)	2,2 \pm 0,16 (n = 5)	0,10 \pm 0,041 (n = 10)	3° ínstar	B
			0,01 \pm 0,002 (n = 10)	♀ adulta	E
72h	33,4 \pm 2,13 (n = 10)	2,1 \pm 0,34 (n = 5)	0,17 \pm 0,040 (n = 10)	3° ínstar	C
			0,01 \pm 0,004 (n = 20)	♀ adulta	F

Folhas de milho não-Bt: < LOD (0,01 $\mu\text{g/g}$ peso seco)

S. frugiperda alimentadas com folhas de milho não-Bt: < LOD (0,03 $\mu\text{g/g}$ peso seco)

Discussão

Os dados apresentados indicam que *H. axyridis*, larvas e adultos, predam *S. frugiperda* de 24 a 72 horas de idade em condições de laboratório. Em 24 horas, um único indivíduo de *H. axyridis*, terceiro ínstar ou adulto, consumiu em média 20 ou 30 lagartas de *S. frugiperda*, respectivamente. Embora *H. axyridis* seja considerado um predador de afídeo, tem sido documentado predando ovos e larvas de algumas espécies de lepidópteros (Koch 2003). Em um estudo de resposta funcional, adultos e larvas de *H. axyridis* consumiram 15 lagartas de primeiro ínstar da espécie *Danaus plexippus* (Linnaeus) (Lepidoptera: Nymphalidae) por dia (Koch et al. 2003). Com a expansão de *H. axyridis* no mundo todo, especialmente na América do Sul (Koch et al. 2006a, 2011), a probabilidade de co-ocorrência do predador com novas presas continua aumentando. Sobretudo, o comportamento deste predador e as espécies de presas em campo devem ser estudados, como por exemplo, a presa *S. frugiperda*, que é uma praga importante no Brasil e na América do Sul (Cruz 1995, López-Edwards et al. 1999, Fernandes et al. 2003, Martinelli et al. 2006, Santos et al. 2009).

Este estudo verificou que *H. axyridis* não apresenta preferência entre as presas que se alimentaram de plantas de milho Bt e não-Bt. O risco potencial de Lepidoptera resistente a plantações Bt para coccinelídeos e outros predadores tem recebido considerável atenção (Romeis et al. 2006, Wolfenbarger et al. 2008). Estudos com coccinelídeos têm investigado resposta de nível populacional em campo (Wold et al. 2001, Daly e Buntin 2005, Dively 2005, Rauschen et al. 2010), impactos diretos de Lepidoptera com toxinas Cry, para coccinelídeos que consomem toxina Bt purificada ou tecido vegetal (Álvarez-Alfageme et al. 2008, 2011, Porcar et al. 2010, Li et al. 2011, Tian et al. 2012). Por outro lado, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos para verificar a preferência do predador por presas que se alimentaram de tecido de plantas Bt versus planta não-Bt (Meier e Hilbeck 2001, Meissle et al. 2005).

No presente estudo, houve um efeito subletal de Cry1Ab em lagartas de *S. frugiperda* que se alimentaram de tecido de plantas Bt, estas apresentaram biomassa significativamente menor que aquelas que se alimentaram de milho não-Bt. O que está de acordo com estudos anteriores (Mendes et al. 2011, Sanders et al. 2007) e que também foi verificado para uma espécie do mesmo gênero, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Dutton et al. 2005, Vojtech et al. 2005).

O milho Bt expressou 23-33 μg Cry1Ab/g de peso seco, o qual corresponde a 4,1-4,6 $\mu\text{g/g}$ do peso fresco. Estes valores são comparáveis com dados de campo (Nguyen e Jehle 2007). Lagartas de *S. frugiperda* que foram alimentadas com milho Bt continham baixa concentração de Cry1Ab comparado com as folhas. Além disso, larvas e adultos de *H. axyridis* (as quais consumiram lagartas alimentadas com Bt e lagartas alimentadas com não-Bt) continham somente traços da proteína Bt. Isto confirma que a proteína Bt é altamente diluída ao longo da cadeia alimentar. Níveis de diluição semelhantes têm sido reportados em outros estudos em sistema tri-tróficos de plantas Bt, larva de lepidóptero e um coccinelídeo predador (Li e Romeis 2009, Álvarez-Alfageme et al. 2011, Tian et al. 2012).

O tempo que a presa se alimentou do milho Bt não influenciou nas concentrações de Bt na lagarta. Os predadores apresentaram maior concentração de Cry1Ab quando se alimentaram de lagartas que foram mantidas por mais tempo na planta Bt (0,05; 0,10; 0,17 $\mu\text{g/g}$ do peso seco para 24, 48, e 72h, respectivamente). Provavelmente o maior tamanho das lagartas que se alimentaram durante 48 e 72h, possibilitou a maior ingestão de proteína Bt pelo predador de terceiro ínstar. Porém, isso não foi observado para as fêmeas adultas. O que pode se explicado por fêmeas adultas excretarem/defecarem na placa de Petri restos das presas consumidas mais frequentemente que as larvas de *H. axyridis*.

Sanders et al. (2007) reportaram que concentrações de Cry1Ab em quarto ou sexto ínstar de *S. frugiperda* foram aproximadamente 40% de Cry1Ab encontradas no milho Bt consumido. Níveis relativamente altos de toxina Cry1Ab foram encontrados em *S. littoralis*, onde lagartas alimentadas

durante de 8 a 11 dias com folhas milho MON810 continham aproximadamente um terço da concentração de Cry1Ab nas folhas (Vojtech et al. 2005). Por outro lado, Head et al. (2001) reportaram que lagartas neonatas de *O. nubilalis*, *Agrotis ipsilon* Hufnagel (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com plantas de milho MON810 da mesma idade que no presente estudo, continham apenas de 1 a 2% da concentração correspondente nas folhas.

Apesar dos efeitos subletais do milho Bt na biomassa da presa e da presença da toxina Bt nas presas alimentadas com plantas de milho Bt, *H. axyridis* não mostrou preferência entre os dois tipos de presas oferecidas. Em todas as combinações de estágio do predador e idade da presa, o número de cada tipo de presa (alimentadas com plantas Bt ou não-Bt) consumido não diferiu. Em um estudo similar, Meier e Hilbeck (2001) verificaram que quando foi oferecido para *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae) de terceiro ínstar lagartas de *S. littoralis* alimentadas com milho Bt e *S. littoralis* alimentadas com milho não-Bt, o crisopídeo teve preferência por *S. littoralis* alimentadas com milho não-Bt; todavia, *C. carnea* de primeiro e segundo ínstars não apresentaram preferência pelo tipo de presa. Além disso, *C. carnea* de primeiro e terceiro ínstar não tiveram preferência entre *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphidae) alimentados com plantas de milho Bt e não-Bt. Posteriormente, Meissle et al. (2005) verificaram que *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae) ingeriu larvas de *S. littoralis* prontamente e não evitou presas alimentadas com plantas de milho Bt.

A mistura de sementes (refúgio ensacado), onde plantas não-Bt são misturadas em campos de milho Bt, está sendo promovida para o manejo de resistência de insetos. A mistura de plantas não-Bt com plantas Bt resultará em predadores com chances de escolha entre presas que se alimentaram de plantas Bt e presas que se alimentaram de plantas não-Bt. Se o predador mostrar preferência por um tipo de presa, as taxas de desenvolvimento de resistência poderão ser impactantes (Heimpel et al. 2005). Por exemplo, se o predador preferir herbívoros que se

alimentaram de plantas não-Bt, então o predador consumirá uma fração desproporcional de, relativamente poucas, presas expostas ao não-Bt que se desenvolveram nas plantas refúgio do campo, o que poderá afetar o desenvolvimento de resistência. Os resultados do presente estudo sugerem que tal mecanismo de comportamento, para alterar as taxas de desenvolvimento de resistência, não é provável que aconteça para herbívoros do milho tendo como predador *H. axyridis*. Todavia, a resposta de predador em diferentes densidades de presa em plantas Bt e não-Bt não foram avaliadas nesta pesquisa, mas poderá ser um importante estudo de campo a ser desenvolvido.

Agradecimentos

Agradecemos ao pessoal da “University of Minnesota”: Thelma Heidel por fornecer os ovos de *Harmonia axyridis*, Dr. Roger Moon pela orientação na estatística e Dra. Cindy Tong pela ajuda com a liofilização do material; ao Jan Zünd do “Agroscope Reckenholz-Tänikon Research Station ART” pelo suporte com o teste ELISA; e à CAPES (BEX 4904-11-7) por fornecer a bolsa de doutorado ao primeiro autor.

Referências

1. Abendroth LJ, Elmore RW, Boyer MJ, Marlay SK (2011) Corn growth and development. Iowa State University. University Extension. PMR 1009. 49 pp.
2. Almeida LM, Silva VB (2002) Primeiro registro de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): um coccinélídeo originário da região Paleártica. *Revista Brasileira de Zoologia* 19(3): 941-944.
3. Álvarez-Alfageme F, Bigler F, Romeis J (2011) Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. *Transgenic Research* 20: 467-479.
4. Álvarez-Alfageme F, Ferry N, Castañera P, Ortego F, Gatehouse AMR (2008) Prey mediated effects of Bt maize on fitness and digestive physiology of the red spider mite predator *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). *Transgenic Research* 17: 943-954.
5. Andow D (2008) The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of Biosafety Reviews* 4:142-199.
6. Burkness EC, O'Rourke PK, Hutchison WD (2011) Cross-pollination of nontransgenic corn ears with transgenic Bt corn: Efficacy against Lepidopteran pests and implications for resistance management. *Journal of Economic Entomology* 104(5): 1476-1479.
7. Cruz I (1995) Lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Circular Técnica, 21. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS. 45p.
8. Daly T, Buntin GD (2005) Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for Lepidopteran control on nontarget arthropods. *Environmental Entomology* 34(5): 1292-1301.
9. Dively GP (2005) Impact of transgenic VIP3A x Cry1Ab Lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. *Environmental Entomology* 34: 1267-1291.
10. Dutton A, Romeis J, Bigler F (2005) Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114: 161-169.
11. Evans EW (2009) Lady beetles as predator of insects other than Hemiptera. *Biological Control* 51: 255-267.
12. Fernandes OD, Parra JRP, Neto AF, Pícoli R, Borgatto AF, et al. (2003) Effect of the genetically modified corn Mon810 on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 2(2): 25-35.
13. Fernandes OA, Faria M, Martinelli S, Schmidt F, Carvalho VF, et al. (2007) Short-term assessment of Bt maize on non-target arthropods in Brazil. *Scientia Agricola* 64(3): 249-255.

14. Figueiredo MLC, Martins-Dias AMP, Cruz I (2006) Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41(12): 1693-1698.
15. Galvan TL, Koch RL, Hutchison WD (2005a) Effects of spinosad and indoxacarb on survival, development and reproduction of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 34: 108-114.
16. Galvan TL, Koch RL, Hutchison WD (2005b) Toxicity of commonly used insecticides in sweet corn and soybean to the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Economic Entomology* 98(3): 780-789.
17. Galvan TL, Koch RL, Hutchison WD (2006) Toxicity of indoxacarb and spinosad to the multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), via three routes of exposure. *Pest Management Science* 62(9):797-804.
18. Head G, Brown CR, Groth ME, Duan JJ (2001) Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99:37-45
19. Heimpel GE, Neuhauser C, Andow DA (2005) Natural enemies and the evolution of resistance to transgenic insecticidal crops by pest insects: The role of egg mortality. *Environmental Entomology* 34(3): 512-526.
20. Hellmich RL, Albajes R, Bergvinson D, Prasifka JR, Wang ZY, et al. (2008) The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. In: *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs* (Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG, eds), pp. 119-158. Springer Science + Business Media B.V.
21. Huang F, Andow DA, Buschman LL (2011) Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 140: 1-16.
22. Hutchison WD, Burkness EC, Mitchell PD, Moon RD, Leslie TW, et al. (2010) Areawide Suppression of European Corn Borer with Bt Maize Reaps Savings to Non-Bt Maize Growers. *Science* 30: 222-225.
23. James C (2011) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. *ISAAA Brief* No. 43. ISAAA, Ithaca, NY.
24. Koch RL (2003) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science* 3(32): 1-16.

25. Koch RL, Burkness EC, Hutchison WD (2006b) Spatial distribution and fixed-precision sampling plans for the ladybird *Harmonia axyridis* in sweet corn. *BioControl* 51(6): 741-751.
26. Koch RL, Fernandes MG, Dutra CC (2011) First confirmed record of *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Check List* 7(4): 476-477.
27. Koch RL, Hutchison WD, Venette RC, Heimpel GE (2003) Susceptibility of immature monarch butterfly, *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae), to predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 28: 265-270.
28. Koch RL, Venette RC, Hutchison WD (2006a) Invasions by *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in the Western Hemisphere: Implications for South America. *Neotropical Entomology* 35(4): 421-434.
29. Koch RL, Venette RC, Hutchison WD (2005) Influence of alternate prey on predation of monarch butterfly (Lepidoptera: Nymphalidae) larvae by the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 34(2): 410-416
30. LaMana ML, Miller JC (1998) Temperature-dependent development in an Oregon population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 27(4): 1001-1005.
31. Li Y, Romeis J (2010) Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. *Biological Control* 53: 337-344.
32. Li Y, Romeis J, Wang P, Peng Y, Shelton AM (2011) A comprehensive assessment of the effects of Bt cotton on *Coleomegilla maculata* demonstrates no detrimental effects by Cry1Ac and Cry2Ab. *PLoS ONE* 6(7): e22185.
33. López-Edwards M, Hernández-Mendoza JL, Percador-Rubio AP, Molina-Ochoa J, Lezama-Gutiérrez R, et al. (1999) Biological differences between fice populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Florida Entomologist* 82(2): 254-262.
34. Lucas E, Coderre D, Vincent C (1997) Voracity and feeding preferences of two aphidophagous coccinellids on *Aphis citricola* and *Tetranychus urticae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85(2): 151-159.
35. Martinelli S, Barata RM, Zucchi MI, Silva-Filho MC, Omoto C (2006) Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 99(2): 519-526.

36. Meier MS, Hillbeck A (2001) Influence of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on prey preference of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Basic and Applied Ecology* 2: 35-44.
37. Meissle M, Vojtech E, Poppy GM (2005) Effects of Bt maize-fed prey on the generalist predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Transgenic Research* 14: 123-132.
38. Mendes SM, Boregas KGB, Lopes ME, Waquil MS, Waquil JM (2011) Fall armyworm responses to genetically modified maize expressing the toxin Cry1A(b). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 46(3): 239-244.
39. Musser FR, Shelton AM (2003) Predation of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) eggs in sweet corn by generalist predators and the impact of alternative foods. *Environmental Entomology* 32(5): 1131-1138.
40. Nguyen HT, Jehle JA (2007) Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON810. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114(2): 82-87.
41. Onstad DW, Mitchell PD, Hurley TM, Lundgren JG, Porter RP, et al. (2011) Seeds of change: Corn seed mixtures for resistance management and integrated pest management. *Journal of Economic Entomology* 104(2): 343-352.
42. Porcar M, García-Robles I, Domínguez-Escribà L, Latorre A (2010) Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry3Aa endotoxins on predatory Coleoptera tested through artificial diet-incorporation bioassay. *Bulletin of Entomological Research* 100: 297-302.
43. Rauschen S, Schaarschmidt F, Gathmann A (2010) Occurrence and field densities of Coleoptera in the maize herb layer: implications for Environmental Risk Assessment of genetically modified *Bt*-maize. *Transgenic Research* 19: 727-744.
44. Romeis J, Meissle M, Bigler F (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 20(1):63-71.
45. Sanders CJ, Pell JK, Poppy GM, Raybould A, Garcia-Alonso M, et al. (2007) Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Biological Control* 40: 362–369.
46. Santos KB, Neves P, Meneguim AM, Santos RB, Santos WJ, et al. (2009) Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 50: 157-163.
47. SAS Institute (1996) SAS/STAT Software: Changes and Enhancements through Release 6.11. Cary, North Carolina, USA.

48. Soares AO, Coderre D, Schanderl H (2001) Fitness of two phenotypes of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology* 98(3): 287-293.
49. Tian J, Collins HL, Romeis J, Naranjo SE, Hellmich RL, et al. (2012) Using field-evolved resistance to Cry1F maize in a lepidopteran pest to demonstrate no adverse effects of Cry1F on one of its major predators. *Transgenic Research* doi: 10.1007/s11248-012-9604-4
50. Torres JB, Ruberson JR, Adang M (2006) Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agricultural and Forest Entomology*. 8: 191-202.
51. Torres JB, Ruberson JR (2008) Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Research*. 17: 345-354.
52. Vojtech E, Meissle M, Poppy GM (2005) Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Transgenic Research* 14:133–144.
53. Wold SJ, Burkness EC, Hutchison WD, Venette RC (2001) In field monitoring of beneficial insect populations in transgenic corn expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *Journal of Entomological Science* 36: 177-187.
54. Wolfenbarger LL, Naranjo SE, Lundgren JG, Bitzer RJ, Watrud LS (2008) Bt crops effects on functional guilds of non-target arthropods: A meta-analysis. *PLoS ONE* 3(5), e2118.

Capítulo 2

**Riqueza e Composição de Espécies de Formigas e Coleópteros de Solo
em Lavouras de Milho Bt e Milho Não-Bt**

RESUMO - Riqueza e composição de espécies de formigas e coleópteros de solo em lavouras de milho Bt e milho não-Bt As plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos têm sido cultivadas em vários países e em ampla escala. Essas plantas expressam a toxina Cry proveniente da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que confere a planta resistência a algumas pragas-alvo. Portanto, estudos de análise de risco dessas plantas GM a organismos não-alvo são importantes ferramentas para que a tecnologia Bt continue trazendo benefícios econômicos sem afetar a biodiversidade. O objetivo deste trabalho foi verificar se existe diferença na riqueza e composição de espécies de formigas e coleópteros de solo em cultivos de milho Bt e sua isolinha não-Bt, na safra e safrinha no Centro Oeste brasileiro. Esta pesquisa foi desenvolvida em áreas de produção de milho Bt e sua isolinha não-Bt, durante dois anos agrícolas (2009 a 2011). Foram estudadas seis áreas de produção nos períodos de safra (verão) e sete áreas nos períodos de safrinha (inverno). Para a amostragem da fauna de Formicidae e Coleoptera, foram realizadas coletas através de armadilhas *pitfall*, dispostas em cada área de produção de milho durante todo o período de desenvolvimento vegetativo e de maturação das plantas. Os dados foram analisados através de índices faunísticos de riqueza e diversidade de espécies. Conforme os resultados, não há diferença estatística significativa entre a riqueza e diversidade de espécies dos sistemas de produção de milho Bt e não-Bt. Verificou-se também que nos períodos de safras ocorreram algumas espécies exclusivas, assim como outras espécies ocorreram exclusivamente nas safrinhas. E ainda, observou-se maior riqueza e diversidade de espécies de formigas e coleópteros nos períodos de safras.

Palavras chave: Análises faunísticas, análise de risco, Coleoptera, Formicidae, milho GM.

ABSTRACT - Richness and composition of soil ants and beetles species in Bt and non-Bt

maize crops Insect resistant genetically modified (GM) plants have been cultivated in several countries on a large scale. These plants express the Cry toxins from the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt), which confers target-pestresistance to plants. Therefore, studies of risk assessment of GM plants to non-target organisms are important tools for Bt technology to continue bringing economic benefits without affecting biodiversity. The objective of this study was to determine whether there are differences in richness and species composition of soil ants and beetles in Bt maize and conventional isolate (non-Bt) fields, in summer crop season and winter crop season in the Midwest of Brazil. This research was conducted in crop fields of Bt maize and non-Bt, for two years (2009-2011) during periods of summer and winter crops season. The assessment of Coleoptera and Formicidae species was performed using pitfall traps placed in fields throughout the period of vegetative growth and maturation of plants. Data were analyzed using faunistic indices of richness and species diversity. The results of this study show no statistically significant difference in species diversity of ant and ground beetle communities. Some species were exclusively sampled in the summer crop, as well, other were sampled just in the winter. And, the species richness and diversity of ants and beetles were greater in the summer crop than winter crop.

Keywords: Faunistic analysis, risk assessment, Coleoptera, Formicidae, GM maize.

Introdução

O milho, *Zea mays* L. (Poaceae: Panicoideae), é considerado uma das mais importantes e antigas culturas agrícolas. Atualmente é a segunda cultura transgênica mais cultivada no mundo com 51 milhões de hectares distribuídos em 16 diferentes países (James 2011). No Brasil, o milho é cultivado em duas safras por ano, a primeira safra é no verão e a segunda safra ou safrinha é no inverno. Na safra 2011/2012, a área cultivada com milho no Brasil chegou a 8,282 milhões de hectares e na segunda safra 7,170 milhões de hectares (CONAB 2012).

O milho geneticamente modificado (GM) resistente a insetos expressa a toxina Cry derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berlinier (Bt). Esta é uma bactéria gram-positiva, aeróbica, que durante sua esporulação produz uma inclusão cristalina. Esta inclusão contém proteína inseticida, as proteínas Cry. Quando ingerida, a proteína é solubilizada e hidrolisada no mesêntero (intestino médio) das larvas dos insetos, liberando polipeptídios da toxina que causa a morte das larvas alvo (Höfte e Whiteley 1989, Frizzas et al. 2004).

Estudos de campo e laboratório mostram diferentes resultados para a persistência da proteína Cry no solo, o qual parece resultar de diferentes atividades microbianas, a qual é dependente do tipo de solo, clima, espécie cultivada, práticas de manejo dessa espécie, e outros fatores ambientais que variam com a localização e zona climática (Icoz e Stotzky 2008). A fauna edáfica tem importância pelo fato de que tais indivíduos influenciam os processos do solo por meio da escavação e/ou ingestão e transporte do material mineral e orgânico (Lima et al. 2007).

Dentre os organismos de grande importância para o ecossistema do solo, destacam-se as formigas e os coleópteros. As formigas são conhecidas por colaborarem com os ciclos de nutrientes no solo, adubação e aeração, além de apresentarem muitas espécies predadoras. Este grupo é importante para estudos da influência de fatores locais, pois suas comunidades são consideradas interativas e bastante estruturadas por processos locais como competição intra e interespecífica

(Andersen e Patel 1994). A diversidade de espécies de formigas de solo aumenta com a complexidade estrutural do hábitat (Holldobler e Wilson 1990), portanto, são comumente utilizadas para estudos de diversidade e impacto ambiental, devido ao fato de serem organismos dominantes nos ecossistemas, serem facilmente coletadas, sensíveis às mudanças ambientais, de baixa mobilidade, além de pertencerem a um dos grupos mais conhecidos taxonomicamente.

Os coleópteros de solo por sua vez, especialmente as espécies com hábitos detritívoros, participam da decomposição de matéria orgânica no solo (Fowler et al. 1991, Bruyn 1999, Lima et al. 2007), promovendo melhorias nas condições físico-químicas do solo, assim como participam da ciclagem de nutrientes, polinização, dispersão de sementes, além de espécies predadoras que são importantes no controle biológico natural.

Alguns experimentos em campo mostram que não há efeito da toxina Cry das plantas Bt sobre a diversidade e abundância de insetos não-alvo (Naranjo 2005, Leslie et al. 2007, Thomazoni et al. 2010). No entanto, no campo existe a exposição contínua de organismos não-alvo à toxina Cry provenientes de plantas Bt; isso foi evidenciado por Harwood et al. (2005) que verificaram a presença da endotoxina Cry no trato digestivo de insetos não-alvo em campo de milho Bt. No caso de parasitoides e/ou predadores, a exposição a toxina Bt pode ocorrer por duas rotas: ao se alimentar/parasitar presas/hospedeiros contaminados pela toxina Bt ou se alimentar diretamente de substratos da planta Bt (pólen, néctar ou seiva da planta) (Dutton et al. 2003).

O conhecimento da diversidade de artrópodes associados às culturas agrícolas é fundamental para estudos ecológicos e de manejo integrado de pragas (MIP). A diversidade de artrópodes em lavoura de milho é representada principalmente por insetos fitófagos e artrópodes predadores. Estudos prévios identificaram espécies incluídas em 15 ordens de artrópodes (Garcia et al. 2004).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar se existe diferença na riqueza e composição de espécies de formigas e coleópteros de solo em sistemas de produção de milho Bt e sua isolinha não-Bt, na safra e segunda safra no Estado de Mato Grosso do Sul, Centro Oeste brasileiro.

Material e Métodos

1. Estudo de campo

O estudo foi realizado em dois anos agrícolas consecutivos, nas safras de 2009/2010 e 2010/2011 e nas safrinhas de 2010 e 2011. O experimento foi conduzido com diferentes tecnologias Bt e suas isolinhas não-Bt em diferentes áreas do município de Dourados-MS, uma área no município de Rio Brilhante-MS e uma em Maracaju-MS (Tabela 1). As áreas foram cultivadas sob as recomendações práticas do manejo integrado de pragas (Fundação MS, 2010), com aplicação de inseticidas e herbicidas (Tabela 2). As coletas dos espécimes de formigas e coleópteros para o estudo iniciaram quando as plantas estavam no estágio vegetativo 5 (V5) e terminaram no final do ciclo reprodutivo da planta. Cada área de coleta (campo amostral) era representada por dois tratamentos, os quais apresentavam em média 0,5 ha cada; em todas as áreas experimentais, o campo de milho Bt era situado ao lado do milho convencional (isolinha não-Bt), totalizando cada área experimental com 1,0 ha.

2. Avaliações da entomofauna edáfica

Foram realizadas coletas de formigas e coleópteros de solo através de armadilhas de interceptação no solo do tipo “*pitfall*” modificada (Woodcock 2005, Aquino et al. 2006). Para cada campo amostral foram utilizadas 15 armadilhas, dispostas na linha e entre plantas a cada 10 metros. A cada três linhas eram instaladas cinco armadilhas. Foi deixada uma bordadura de três linhas.

As armadilhas eram compostas por garrafas *pet* (litro) cortadas ao meio, sendo a parte superior encaixada invertida, formando um funil. O qual era fixado no solo com a borda no nível da superfície do solo. O interior de cada armadilha continha 2/3 de seu volume com líquido conservante (Tween 20 dissolvido 10% e hipoclorito de sódio dissolvido 10%). E também, uma cobertura para cada armadilha, constituída de madeira (15cm x 15cm). Hastes de metal funcionaram como base da cobertura, mantendo a altura de 2,5cm em relação a superfície do solo. A cobertura evitava o acúmulo de água da chuva e impurezas no interior das armadilhas. Posteriormente, os insetos coletados foram armazenados em potes plásticos contendo álcool 70% e levados ao laboratório de Entomologia da FCBA/UFGD para triagem e identificação. As coletas foram realizadas semanalmente desde o estágio vegetativo V5 até o final do período reprodutivo do milho. O número de coletas variou em cada localidade em função do clima (chuva ou geadas).

3. Identificação dos insetos

As formigas foram identificadas pelo doutorando em Entomologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), M.Sc. Manoel Fernando Demétrio. Os coleópteros foram identificados pelos M.Sc., egressos da UFGD, Juarez Furhmann e Daniela de Cássia Bená. E também, alguns indivíduos de coleópteros foram identificados por comparação com insetos do museu da UFGD.

Tabela 1. Anos agrícolas e localidades de amostragem, coordenadas geográficas, híbrido de milho utilizado e número de amostragem em cada área de estudo. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009 a 2011.

Ano agrícola	Local	Área	Coordenadas		Milho Bt	Milho não-Bt	Número de coletas
safra 2009/2010	Dourados-MS	A	22°12'22,08"S	54°53'55,53"O	DKB 390YG	DKB 390	11
safra 2009/2010	Rio Brilhante-MS	B	21°50'49,02"S	54°32'15,74"O	BG7049 Hx	BG7049	11
safra 2010/2011	Dourados-MS	C	22°14'15,49"S	55° 2'16,47"O	Status TL	Status	8
safra 2010/2011	Dourados-MS	D	22°12'48,77"S	54°53'45,37"O	DKB 390 PRO	DKB 390	12
safra 2010/2011	Dourados-MS	E	22°13'24,61"S	54°53'40,02"O	DKB 390 PRO	DKB 390	12
safra 2010/2011	Maracajú-MS	F	21°38'41,95"S	55° 5'50,57"O	Status TL	Status	7
safrinha 2010	Dourados-MS	G	22°13'15,57"S	54°53'49,18"O	DKB 390YG	DKB 390	9
safrinha 2010	Dourados-MS	H	22°13'36,93"S	54°53'22,99"O	DKB 390YG	DKB 390	9
safrinha 2010	Dourados-MS	I	22°11'37,51"S	54°54'51,37"O	DKB 390YG	DKB 390	12
safrinha 2011	Dourados-MS	J	22°13'2,27"S	54°53'42,91"O	DKB 390 PRO	DKB 390	7
safrinha 2011	Dourados-MS	L	22°13'2,75"S	54°53'8,40"O	DKB 390 PRO	DKB 390	10
safrinha 2011	Dourados-MS	M	22°14'39,56"S	55° 2'31,84"O	DKB 390 PRO	DKB 390	7
safrinha 2011	Dourados-MS	N	22°14'23,55"S	55° 2'9,47"O	DKB 390 PRO	DKB 390	7

Tabela 2. Produtos químicos aplicados nos sistemas de produção de milho Bt e não-Bt, safras 2009/2010 e 2010/2011 e safrinhas 2010 e 2011, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2012.

Ano agrícola	Área	Data de semeadura	Tratamento	Produto aplicado (ingrediente ativo)	Quantidade aplicada por hectare (ha) (Kg ou l)	Data da aplicação
safra 2009/2010	A	17/10/2009	Bt e não-Bt	Karate zeon 250 CS (Lambda cialotrina 250 g/l)*	30 ml/ha	30/10/2009
			não-Bt	Lannate BR (Metomil 215g/l)**	0,6 L/ha	4/11/2009
			Bt e não-Bt	Gesaprim GRDA (Atrazina 880g/kg)	2,27 L/ha	4/11/2009
			Bt e não-Bt	Callisto (Mesotriona 480g/l)	0,125 L/ha	4/11/2009
			não-Bt	Match CE (Lufenurum 50g/l)***	300 ml/ha	21/11/2009 e 30/11/2009
safra 2009/2010	B	14/10/2009	não-Bt	Methomex® 215 LS (Metomil 215g/l)†	800 ml/ha	3/11/2009
			não-Bt	Methomex® 215 LS (Metomil 215g/l)	800 ml/ha	12/11/2009
			não-Bt	Difluchem 240 SC (Diflubenzuron 240 g/l)††	80 g/ha	12/11/2009
			não-Bt	Espinosade†	80 ml/ha	30/11/2009
			Bt e não-Bt	Engeo Pleno (Tiametoxam 141 g/l) †††	300 ml/ha	30/11/2009
safra 2010/2011	C	6/12/2010	não-Bt	Lannate BR (Metomil 215g/l)	0,6 L/ha	27/12/2010 e 12/01/2011
			Bt e não-Bt	Atrazina Nortox 500 SC (Atrazina 500 g/l)	1,25 L/ha	3/1/2011
			Bt e não-Bt	Sanson 40 SC (Nicosulfuron)	0,8 L/ha	3/1/2011
safra 2010/2011	D	2/12/2010	Bt e não-Bt	2,4 D Nortox (2,4 D 806 g/l)	1 L/ha	15/12/2010
			Bt e não-Bt	Cyprtrin (cipermetrina 250 g/l)	60 ml/ha	15/12/2011
			não-Bt	Lannate BR (Metomil 215g/l)	0,7 L/ha	20/12/2010
			Bt e não-Bt	Pósmil (Atrazina 400 g/l)	4 L	23/12/2010
			Bt e não-Bt	Callisto (Mesotriona 480g/l)	0,125 L/ha	23/12/2010
			Bt e não-Bt	Sanson 40 SC (Nicosulfuron)	0,3 L/ha	23/12/2010
			não-Bt	Match CE (Lufenurum 50g/l)	0,3 L/ha	7/1/2011
safra 2010/2011	E	2/12/2010	Bt e não-Bt	2,4 D Nortox (2,4 D 806 g/l)	1 L/ha	15/12/2010
			Bt e não-Bt	Cyprtrin (Cipermetrina 250 g/l)	60 ml/ha	15/12/2011
			não-Bt	Lannate BR (Metomil 215g/l)	0,7 L/ha	20/12/2010
			Bt e não-Bt	Pósmil (Atrazina 400 g/l)	4 L	23/12/2010
			Bt e não-Bt	Callisto (Mesotriona 480g/l)	0,125 L/ha	23/12/2010
			Bt e não-Bt	Sanson 40 SC (Nicosulfuron)	0,3 L/ha	23/12/2010
			não-Bt	Match CE (Lufenurum 50g/l)	0,3 L/ha	7/1/2011
safra 2010/2011	F	10/10/2011	não-Bt	Methomex® 215 LS (Metomil 215g/l)†	800 ml/ha	24/11/2011
			não-Bt	Methomex® 215 LS	800 ml/ha	2/12/2011
			não-Bt	Difluchem 240 SC (Diflubenzuron 240 g/l)††	80 g/ha	2/12/2011
			não-Bt	Espinosade†	80 ml/ha	15/12/2011
			Bt e não-Bt	Engeo Pleno (Tiametoxam 141 g/l) †††	300 ml/ha	15/12/2011

Cont. Tabela 2.

Ano agrícola	Área	Data de semeadura	Tratamento	Produto aplicado (ingrediente ativo)	Quantidade aplicada por hectare (ha) (Kg ou l)	Data da aplicação
safrinha 2010	G	3/5/2010	Bt e não-Bt	Cyprin (Cipermetrina 250)*	60 ml/ha	20/5/2010
			Bt e não-Bt	Gesaprim GRDA (Atrazina 880g/kg)	3 L/ha	9/6/2010
			Bt e não-Bt	Callisto (Mesotriona 480g/l)	0,125 L/ha	9/6/2010
			não-Bt	Lannate BR (Metomil 215g/l)	0,5 L/ha	11/6/2010
			não-Bt	Certero (Triflumuron 480 g/l)	100 ml/ha	29/6/2010
safrinha 2010	H	3/5/2010	Bt e não-Bt	Cyprin (Cipermetrina 250 g/l)	60 ml/ha	20/5/2010
			Bt e não-Bt	Gesaprim GRDA (Atrazina 880g/kg)	3 L/ha	9/6/2010
			Bt e não-Bt	Callisto (Mesotriona 480g/l)	0,125 L/ha	9/6/2010
			não-Bt	Lannate BR (Metomil 215g/l)	0,5 L/ha	11/6/2010
			não-Bt	Certero (Triflumuron 480 g/l)	100 ml/ha	29/6/2010
safrinha 2010	I	6/4/2010	Bt e não-Bt	Gesaprim GRDA (Atrazina 880g/kg)	2 L/ha	7/5/2010
			Bt e não-Bt	Soberan (Tembotriona 500 g/l)	0,24 L/ha	7/5/2010
			não-Bt	Lannate BR (metomil 215g/l)	0,5 L/ha	15/5/2010
safrinha 2011	J	27/3/2011	Bt e não-Bt	Primatop (Atrazina+Simazina)	2 L/ha	11/4/2011
			Bt e não-Bt	Callisto (Mesotriona 480g/l)	0,125 L/ha	11/4/2011
			Bt e não-Bt	Pramilho (Nicosulfuron)	16 g/ha	11/4/2011
			Bt e não-Bt	Methomex [®] 215 LS (Metomil 215g/l)	0,7 L/ha	11/4/2011 e 21/4/2011
			não-Bt	Match CE (Lufenurum 50g/l)	0,3 L/ha	4/5/2011 e 16/5/2011
safrinha 2011	L	27/3/2011	Bt e não-Bt	Primatop (Atrazina+Simazina)	2 L/ha	11/4/2011
			Bt e não-Bt	Callisto (Mesotriona 480g/l)	0,125 L/ha	11/4/2011
			Bt e não-Bt	Pramilho (Nicosulfuron)	16 g/ha	11/4/2011
			Bt e não-Bt	Methomex [®] 215 LS (Metomil 215g/l)	0,7 L/ha	11/4/2011 e 21/4/2011
			não-Bt	Match CE (Lufenurum 50g/l)	0,3 L/ha	4/5/2011 e 16/5/2011
safrinha 2011	M	6/4/2011	não-Bt	Lannate BR (metomil 215g/l)	0,6 L/ha	28/4/2011 e 12/5/2011
			Bt e não-Bt	Atrazina Nortox 500 SC (Atrazina 500 g/l)	1,25 L/ha	3/5/2011
			Bt e não-Bt	Sanson 40 SC (Nicosulfuron)	0,8 L/ha	3/5/2011
safrinha 2011	N	6/4/2011	não-Bt	Lannate BR (metomil 215g/l)	0,6 l/ha	28/4/2011 e 12/5/2011
			Bt e não-Bt	Atrazina Nortox 500 SC (Atrazina 500 g/l)	1,25 L/ha	3/5/2011
			Bt e não-Bt	Sanson 40 SC (Nicosulfuron)	0,8 L/ha	3/5/2011

*Inseticida de contato e ingestão do grupo químico piretróide; **Inseticida sistêmico e de contato, do grupo químico metilcarbamato de oxima; ***Inseticida Fisiológico do Grupo Químico Benzo iluréia; † Inseticida sistêmico e de contato, do grupo químico carbamato; ††Inseticida fisiológico de ação por contato e ingestão, do grupo químico benzoiluréia; †††Inseticida sistêmico, de contato e ingestão, neonicotinóide e piretróide.

4. Análise dos dados

A diversidade de espécies refere-se à variedade de espécies de organismos vivos de uma determinada comunidade, habitat ou região. Para avaliar a diversidade de espécies de formigas e coleópteros de solo, foram realizadas análises de riqueza observada e estimada, diversidade, dominância e similaridade. Para isso, foram utilizados os seguintes índices faunísticos:

Riqueza (S_{obs}): Número total de espécies observadas.

Riqueza estimada (S_{est}) Índice de Jackknife 2: Estimador não-paramétrico, que estima a riqueza de espécies que ocorreram em apenas uma amostra e o número de espécies que ocorreram em duas amostras. É um índice que pode superestimar quando o tamanho da amostra é grande (Hellman e Fowler 1999). Este índice reduz as tendências das estimativas reduzindo a subestimação do número verdadeiro das espécies de uma comunidade representados por uma amostra (Colwel e Coddington 1994).

Riqueza estimada (S_{est}) Índice de Chao 2: Estimador não-paramétrico; utiliza o número de espécies em uma amostra, combinando com o número de espécies que aparecem somente em uma ou duas amostras (Hellman e Fowler 1999).

Índice de diversidade de Shannon (H'): Este índice considera que os indivíduos são amostrados ao acaso a partir de uma alta população. Quanto menor o valor deste índice, menor o grau de incerteza, assim, a diversidade da amostra é baixa (Uramoto et al. 2005). Os valores de Shannon geralmente situam-se entre 1,3 e 3,5, esse índice atribui maior valor às espécies raras e é um dos melhores índices para ser usado em comparações, caso não haja interesse em separar abundância de raridade (Felfili e Rezende 2003).

Índice de Simpson (D'): É um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos extraídos ao acaso de uma comunidade sejam de espécies diferentes. Quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância por uma ou poucas espécies (Kanieski 2010).

Índice de Hill (Hill's N): índice de equidade que expressa a diversidade em uma escala uniforme.

As análises de índices faunísticos foram realizadas através do software EstimateS (Colwell 2006). Para avaliar a eficiência da quantidade de amostras utilizadas, foram construídas curvas do coletor (riqueza de espécies acumuladas por amostragem) com 50 randomizações, através do programa Estimate S.

Teste t pareado: é um teste analisado em blocos, ou seja, além do tratamento é necessário informar o bloco (local onde os pares estão). Esse teste foi realizado para comparar a riqueza estimada (através do Chao 2) de espécies entre os tratamentos (milho Bt e não-Bt) em cada área de amostragem. As análises foram realizadas através do Software R (R Development Core Team 2011).

Curva do coletor: No início do processo de amostragem a quantidade de espécies novas (não-capturadas) é maior que a quantidade de espécies já capturadas. Assim, à medida que o trabalho de amostragem prossegue, a quantidade de espécies novas (não-amostradas) declina. Então, chega um momento que a maioria dos indivíduos amostrados se torna repetição (indivíduos de espécies já amostradas antes).

Resultados

Formicidae

Durante todo o período amostral na safra e safrinha de cultivos de milho Bt e não-Bt foram coletadas 32 espécies de Formicidae. Nas amostragens realizadas nas safras foram registradas 23 espécies pertencentes a nove gêneros e cinco subfamílias presentes nas áreas de milho Bt e o total de 21 espécies, sete gêneros e quatro subfamílias em milho não-Bt nos dois anos agrícolas estudados (Tabela 3 e 4). Duas espécies, *Mycocepurus goeldii* Forel e *Brachymyrmex* sp. 4, ocorreram apenas em áreas de milho não-Bt; assim como quatro espécies ocorreram exclusivamente em áreas de milho Bt: *Pheidole* sp. 6, *Acromyrmex* sp. 1, *Stegomyrmex* sp. 1 e *Gnamptogenys* sp. 1.

Resultados semelhantes foram observados nas safrinhas, sendo coletado um total de 24 espécies, nove gêneros e cinco subfamílias no milho Bt, e 21 espécies distribuídas em 10 gêneros e seis subfamílias em áreas de milho não-Bt (Tabela 4). Todavia, três espécies não ocorreram em áreas de milho Bt: *Hypoponera* sp. 1, *Camponotus crassus* Mayr, *Ectatomma tuberculatum* Olivier; e cinco espécies não ocorreram em áreas de milho não-Bt *Pheidole* sp. 7, *Solenopsis* sp. 1, *Atta* sp. 2, *Camponotus* sp. 1, *Pseudomyrmex termitarius* Smith.

Algumas espécies de formigas que ocorreram no período de verão (safra), não foram observadas nas amostras do período de inverno (safrinha). Por exemplo, as espécies *Pheidole* sp. 6, *Stegomyrmex* sp. 1, *Anochetus diegensis* Forel e *Brachymyrmex* sp. 4 ocorreram apenas no período de safra. As espécies *Pheidole* sp. 7, *Hypoponera* sp. 1, *Camponotus* sp. 1, *C. crassus*, *E. tuberculatum*, *Labidus praedator* Smith e *P. termitarius* ocorreram apenas nas amostras do período de safrinha.

Pheidole oxyops Forel, *Pheidole* sp. 3, *S. invicta* e *Linepithema humile* Mayr ocorreram em todas as áreas de amostragem em milho Bt no período de safra; e no tratamento não-Bt, duas espécies ocorreram em todas as áreas: *P. oxyops* e *Brachymyrmex* sp. 3 (Tabela 3). E nas safrinhas as espécies

mais frequentes foram *P. oxyops*, *Pheidole* sp. 2, *Pheidole* sp. 3, *Solenopsis invicta* Buren, em ambos os tratamentos (Tabela 4).

Considerando todos os gêneros de formigas encontrados em ambos os tratamentos, tanto na safra quanto na safrinha, o mais rico foi *Pheidole* (8 espécies), seguido de *Solenopsis* (4 espécies) e *Brachymyrmex* (4 espécies).

A riqueza estimada de espécies de formigas foi similar tanto no período de safra ($t= 0,83$; $gl= 5$; $p= 0,44$) quanto na safrinha ($t= 1,21$; $gl= 6$; $p= 0,27$). Conforme o índice de diversidade de Shannon, também não houve diferença na diversidade de espécies entre as áreas de milho Bt ($H'=2,80$) e não Bt ($H'=2,82$) nas safras e nas safrinhas ($H'=2,57$ para o milho Bt e $H'=2,52$ para o milho não-Bt) (Tabela 5).

Os altos valores obtidos pelo índice de Simpson mostram que no período de safra houve dominância de apenas algumas espécies ($D'=14,17$ e $D'=15,4$ para as áreas de Bt e não-Bt, respectivamente). O mesmo resultado foi verificado nas safrinhas ($D'=9,47$ e $D'=9,61$ em Bt e não-Bt, respectivamente) (Tabela 5).

O esforço amostral no período de safra foi satisfatório para demonstrar a comunidade de formigas nas áreas avaliadas, uma vez que a riqueza de espécies observadas e esperada pelo índice calculado (Jack 2) atingiram a mesma constância de riqueza de espécies, o que pode ser observado na curva de riqueza de espécies acumuladas por amostragem representada na Figura 1. No período da safrinha a riqueza observada de espécies de formigas foi inferior à riqueza esperada. Assim, as curvas de riqueza observada e estimada não se encontraram, porém ambas atingiram estabilidade a partir de 200 amostras (Figura 1).

Tabela 3. Frequência de ocorrência de 25 espécies de formigas em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safras de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009-2011.

Espécies	Safra 2009/2010				Safra 2010/2011							
	A Bt	A NBt	B Bt	B NBt	F Bt	F NBt	G Bt	G NBt	H Bt	H NBt	I Bt	I NBt
Myrmicinae												
Tribo Pheidolini												
<i>Pheidole</i> sp.1	3	4	7	7	-	-	-	2	1	-	4	1
<i>Pheidole</i> sp.2	4	5	7	5	-	-	1	1	1	-	1	2
<i>Pheidole</i> sp.3	6	4	5	5	1	2	3	-	2	2	2	7
<i>Pheidole</i> sp.4	2	3	6	7	1	-	-	1	-	-	1	1
<i>Pheidole</i> sp.5	3	3	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pheidole</i> sp.6	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-
<i>Pheidole oxyops</i>	9	6	9	9	1	1	6	2	2	1	5	6
Tribo Solenopsidini												
<i>Solenopsis</i> sp.1	-	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Solenopsis</i> sp.2	2	3	1	1	1	-	-	1	-	-	2	3
<i>Solenopsis</i> sp.3	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Solenopsis invicta</i>	6	3	1	3	1	-	5	2	1	-	3	5
Tribo Attini												
<i>Atta</i> sp.1	-	-	6	4	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Atta</i> sp.2	-	-	3	5	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Atta</i> sp.3	-	1	5	5	-	-	8	4	2	4	1	1
<i>Acromyrmex</i> sp.1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mycocepurus goeldii</i>	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Tribo Stegomyrmecini												
<i>Stegomyrmex</i> sp.1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
Ponerinae												
Tribo Ponerini												
<i>Anochetus diegensis</i>	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	1
Formicinae												
Tribo Plagiolepidini												
<i>Brachymyrmex</i> sp.1	-	3	3	3	-	-	1	-	1	-	1	1
<i>Brachymyrmex</i> sp.2	2	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	2
<i>Brachymyrmex</i> sp.3	3	3	3	3	1	2	1	3	-	1	4	6
<i>Brachymyrmex</i> sp.4	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Ectatomminae												
Tribo Ectatommini												
<i>Gnamptogenys</i> sp.1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dolichoderinae												
Tribo Dolichoderini												
<i>Linepithema humile</i>	3	1	4	3	1	-	3	1	1	-	1	1
<i>Linepithema</i> sp.1	1	1	1	3	1	-	-	-	-	-	2	3
Número total de espécies	12	17	20	19	9	3	13	10	9	5	14	16

A, B, F, G, H e I são as áreas de cultivo de milho onde foram realizadas as coletas.

Tabela 4. Frequência de ocorrência de 27 espécies de formigas em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safrinhas de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010 e 2011.

Espécies	Safrinha 2010						Safrinha 2011							
	C Bt	C NBt	D Bt	D NBt	E Bt	E NBt	J Bt	J NBt	L Bt	L NBt	M Bt	M NBt	N Bt	N NBt
Myrmicinae														
Tribo Pheidolini														
<i>Pheidole</i> sp.1	1	1	-	-	-	3	-	2	-	2	5	4	3	1
<i>Pheidole</i> sp.2	3	3	3	1	3	6	-	2	1	2	4	4	1	1
<i>Pheidole</i> sp.3	5	3	2	7	6	8	-	3	5	4	7	4	2	4
<i>Pheidole</i> sp.4	2	2	2	1	3	3	-	-	2	-	-	1	-	-
<i>Pheidole</i> sp.5	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-
<i>Pheidole</i> sp.7	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pheidole oxyops</i>	11	10	12	11	11	12	6	8	5	6	7	6	7	5
Tribo Solenopsidini														
<i>Solenopsis</i> sp.1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Solenopsis</i> sp.2	-	-	1	3	2	2	1	1	-	-	1	2	1	-
<i>Solenopsis</i> sp.3	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Solenopsis invicta</i>	6	7	5	8	12	10	-	2	3	4	3	4	3	3
Tribo Attini														
<i>Atta</i> sp.1	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Atta</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
<i>Atta</i> sp.3	-	1	12	11	1	2	-	-	1	3	4	2	1	-
<i>Mycocepurus goeldii</i>	-	-	3	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
Ponerinae														
Tribo Ponerini														
<i>Hypoponera</i> sp.1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Formicinae														
Tribo Plagiolepidini														
<i>Brachymyrmex</i> sp.1	-	-	1	2	4	3	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>Brachymyrmex</i> sp.2	-	-	1	2	2	1	1	2	1	1	4	4	-	-
<i>Brachymyrmex</i> sp.3	3	3	8	7	9	10	1	1	2	3	3	2	1	-
Tribo Camponotini														
<i>Camponotus</i> sp.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Camponotus crassus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Ectatomminae														
Tribo Ectatommini														
<i>Ectatomma tuberculatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Ecitoninae														
Tribo Ecitonini														
<i>Labidus praedator</i>	-	-	2	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Dolichoderinae														
Tribo Dolichoderini														
<i>Linepithema humile</i>	-	-	1	-	4	3	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Linepithema</i> sp.1	1	-	2	4	4	3	2	1	-	-	1	3	-	1
Pseudomyrmecinae														
Tribo Pseudomyrmecini														
<i>Pseudomyrmex termitarius</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Número total de espécies	8	8	17	14	16	17	7	12	9	8	13	14	9	7

C, D, E, J, L, M e N são as áreas de cultivo de milho onde foram realizadas as coletas.

Tabela 5. Índices de diversidade de Simpson (D') e Shannon (H'), Riqueza estimada de espécies pelos índices de Jackknife (Jack 2) e Chao2, Riqueza observada (S_o) e Teste t pareado por local de amostragem para espécies de formigas em milho Bt e não-Bt em cada área de estudo, em duas safras e duas safrinhas no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009 a 2011.

Local		D'	H'	Jack 2	Chao 2	S_o
A	Bt	10,87	2,33	11,52	12	12
A	Não-Bt	18,16	2,69	24,16	20,03	17
B	Bt	17,31	2,79	26,43	22,27	20
B	Não-Bt	17,77	2,78	25,91	24,45	19
F	Bt	–	2,2	23,14	39,86	9
F	Não-Bt	–	1,05	3,38	3	3
G	Bt	12,75	2,17	16,29	12,22	10
G	Não-Bt	12,75	2,17	16,29	12,22	10
H	Bt	22	2,14	16,96	12,33	9
H	Não-Bt	5,14	1,43	9,32	6,33	5
I	Bt	12,48	2,49	27,71	24,17	16
I	Não-Bt	12,48	2,49	27,71	24,17	16
Safra	Bt	14,17	2,8	22,16	23,4	23
Safra	não-Bt	15,4	2,82	22	21,5	21
Teste t=	0,83	gl= 5	p= 0,44			
C	Bt	5,7	1,8	10,74	8,46	8
C	Não-Bt	5,72	1,8	10,74	8,46	8
D	Bt	9,45	2,42	23,71	19,29	17
D	Não-Bt	10,3	2,36	16,98	14,69	14
E	Bt	11	2,47	21,48	17,83	16
E	Não-Bt	11,67	2,53	22,48	18,83	17
J	Bt	4,88	1,63	14,79	11,5	7
J	Não-Bt	8,57	2,2	19,36	14,7	12
L	Bt	8,4	1,99	14,1	10,71	9
L	Não-Bt	8,57	1,97	8,38	8	8
M	Bt	11,33	2,34	20,86	21,57	13
M	Não-Bt	14,53	2,49	18,5	15,29	14
N	Bt	6,79	1,92	16,26	13,29	9
N	Não-Bt	6,32	1,72	13,29	12,14	7
Safrinha	Bt	9,47	2,57	30,91	28,17	24
Safrinha	Não-Bt	9,61	2,52	27,87	29	21
Teste t=	1,21	gl= 6	p= 0,27			

Foi utilizado o programa EstimateS para as análises faunísticas. O Teste-t pareado por local de coleta foi realizado utilizando os dados de riqueza estimada do índice Chao 2 através do software R.

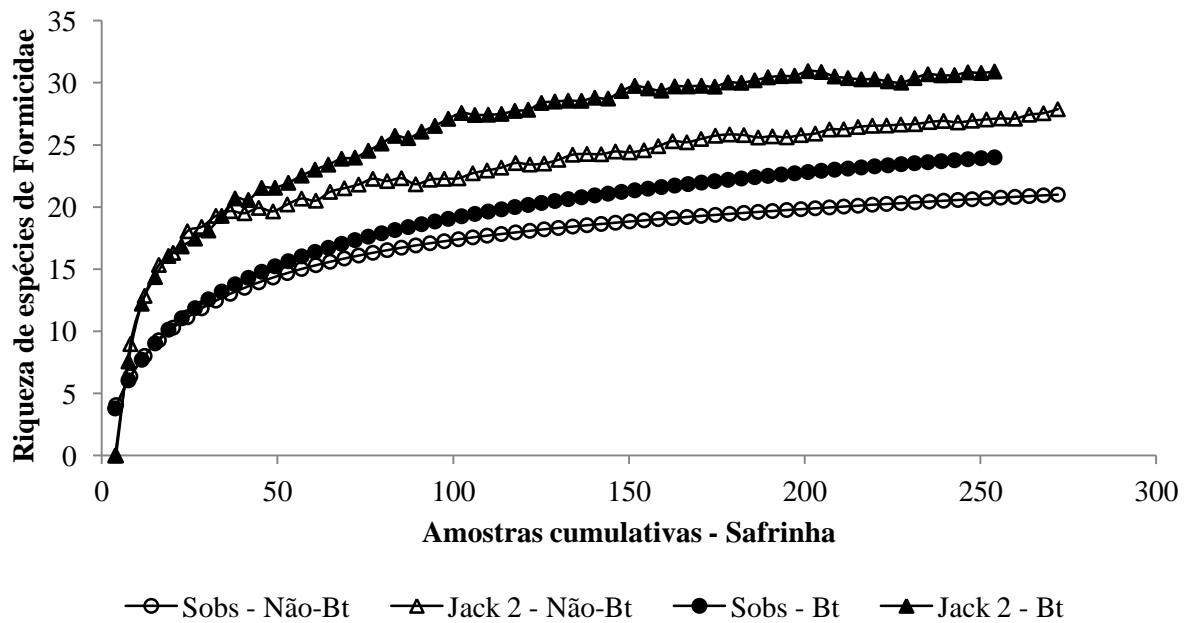
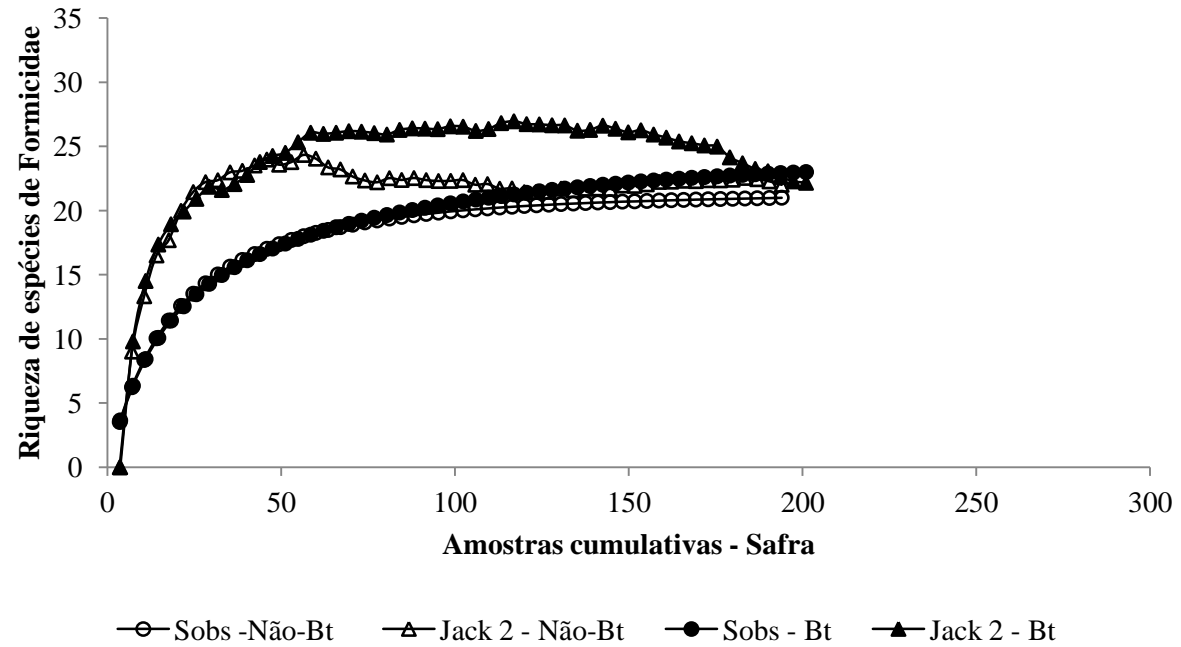


Figura 1. Curva cumulativa de espécies de formigas no período de safra 2009/2010 e 2010/2011 e safrinha (2010 e 2011) em sistema de produção de milho Bt e não-Bt, Mato Grosso do Sul, Brasil. Sobs (Mao Tau) = riqueza de espécies observadas; Jack 2 = riqueza estimada de espécies Jackknife 2;

Coleoptera

Nas áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt durante o período das duas safras e duas safrinhas foram coletadas 74 espécies de Coleoptera, pertencentes a 12 Famílias: Scarabaeidae, Trogidae, Nitidulidae, Cucujidae, Coccinellidae, Chrysomelidae, Tenebrionidae, Curculionidae, Carabidae, Staphylinidae, Scydmaenidae e Elateridae. A Família Scarabaeidae, cujas espécies apresentam hábitos alimentares detritívoros, foi a mais rica, representada por 23 espécies. A segunda Família mais rica em espécies foi Carabidae com 15 espécies. Esta Família é constituída por várias espécies de predadores generalistas, assim como as Famílias Coccinellidae e Staphylinidae.

Algumas espécies (21 espécies) ocorreram exclusivamente no período de safra (Tabela 6), enquanto outras (16 espécies) ocorreram somente na época da safrinha (Tabela 7). Verificou-se que 11 espécies foram mais abundantes durante o verão, estando presentes em, pelo menos, 80% das amostras, podendo estas espécies serem classificadas nos seguintes grupos tróficos: Detritívoros - *Ataenius platensis* Blanchard, *Canthidium* sp.1, *Chanthon* sp.1, *Coprophanæus Matallophanæus* spp., *Dichotomius* sp.1; Herbívoros - *Carpophilus* sp.1, *Stelidota* sp.1; Carnívoros - *Calosoma granulatum* Perty, *Galerita collaris* Dejean, *Megacephala (Tetracha) brasiliensis* Kirby e um estafilinídeo da tribo Aleocarini (Aleocarini sp. 1). Durante o período da safrinha esse número foi reduzido, totalizando cinco espécies: *Carpophilus* spp., *Stelidota* spp., *Ahasverus* spp. (fungívoros), *Lagria villosa* Fabricius (detritívoro) e Aleocarini sp. 1.

Dentre as espécies coletadas no período de safra, cinco destas ocorreram exclusivamente em campos de milho Bt e 12 outras espécies apenas em campos de milho não-Bt (Tabela 6). No período de safrinha também houve a ocorrência de espécies exclusivas em áreas de cultivo Bt, totalizando sete espécies, assim como outras oito espécies ocorreram apenas nas áreas de milho não-Bt (Tabela 7).

Durante o período das safras não houve diferença significativa estatisticamente na riqueza estimada de espécies de Coleoptera entre os sistemas de produção de milho Bt e não-Bt ($t= 1,12$; $gl= 5$; $p= 0,31$). Os índices de Shannon e de Simpson indicam maior diversidade e dominância de espécies no sistema de produção de milho não-Bt ($H'= 2,73$; $D'=10,95$) quando comparadas ao Bt ($H'= 2,59$; $D'=9,66$) (Tabela 8).

Nas safrinhas também não houve diferença da riqueza de espécies entre os dois sistemas de produção ($t= -0,44$; $gl= 6$; $p= 0,67$). E conforme os resultados dos índices de Shannon e de Simpson, a diversidade e dominância de espécies no sistema de produção de milho Bt ($H'=1,62$; $D'=3,28$) e não-Bt ($H'= 1,61$; $D'=3,31$) não foram diferentes (Tabela 8).

Das seis áreas de amostragem durante o verão, o número médio de indivíduos por área foi diferente entre os tratamentos Bt e não-Bt somente nas áreas A e F, onde a média de insetos no tratamento Bt foi de 141 indivíduos e no tratamento não-Bt de 105,18 indivíduos na área A ($\chi^2= 4,92$; $p\leq 0,02$); já na área F a média de indivíduos no tratamento Bt foi de 46,86 e no não-Bt foi de 78,14 ($\chi^2= 7,34$; $p\leq 0,01$) (Tabela 9). Dentre as sete áreas estudadas na safrinha, três apresentaram diferença entre o número médio de indivíduos: na área C o tratamento Bt apresentou a média de 130,92 e o não-Bt 80,42 ($\chi^2= 11,59$; $p\leq 0,00$); na área D o tratamento Bt com 78,58 e o não-Bt com 120,92 ($\chi^2= 8,56$; $p\leq 0,00$); e na área E, tratamento Bt com 109,83 e não-Bt com 146,83 ($\chi^2= 5,05$; $p\leq 0,02$) (Tabela 10). Apesar disso, a média do número de espécies abundantes (mensurado por Hill's N1) por tratamento não diferiu nas áreas estudadas entre Bt e não-Bt em ambas as épocas de avaliação (Tabela 10).

As curvas de coletor, riqueza de espécies por amostragem cumulativas, não estão totalmente estabilizadas, ou seja, não atingiram a saturação. O estimador de riqueza de espécies aponta para a possibilidade de existirem ainda muitas espécies a serem capturadas, em um período maior de coleta

ou utilizar maior número de armadilhas *pitfall*. A curva mais próxima da saturação foi na safra em áreas de cultivo de milho Bt (Figura 2). As curvas de riqueza de espécies, no período de safras começam a estabilizar a partir de 3000 amostras, exceto para riqueza de espécies esperadas no cultivo de milho não-Bt. Comportamento semelhante foi observado no período de safrinhas, a riqueza de espécies observadas também começou a estabilizar com 3000 amostras, mas a riqueza esperada ainda continuou a aumentar.

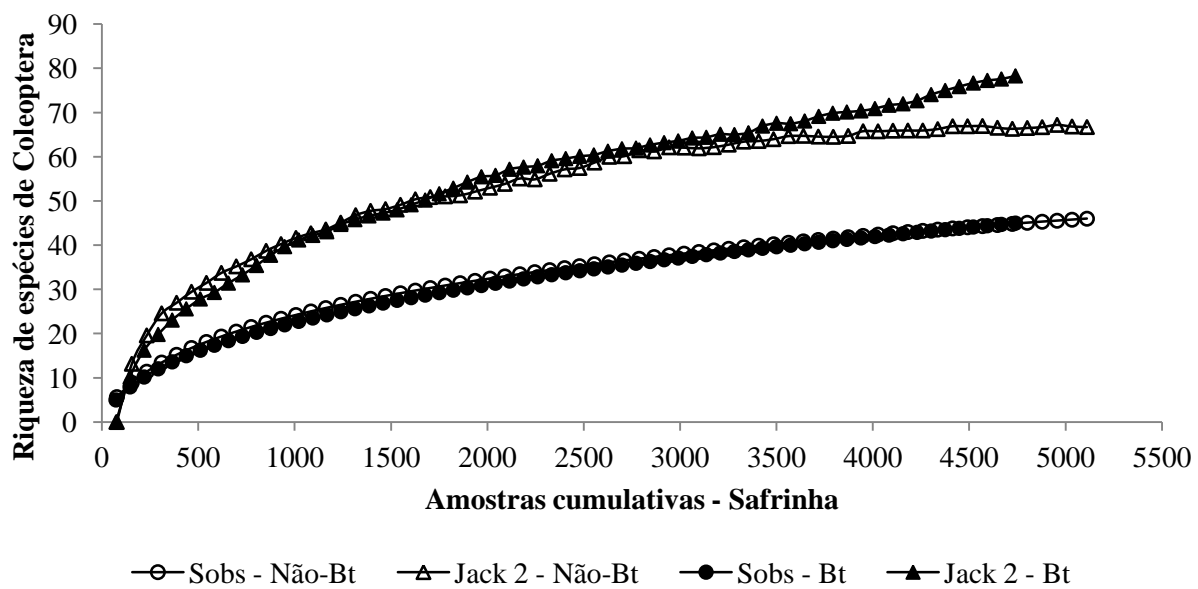
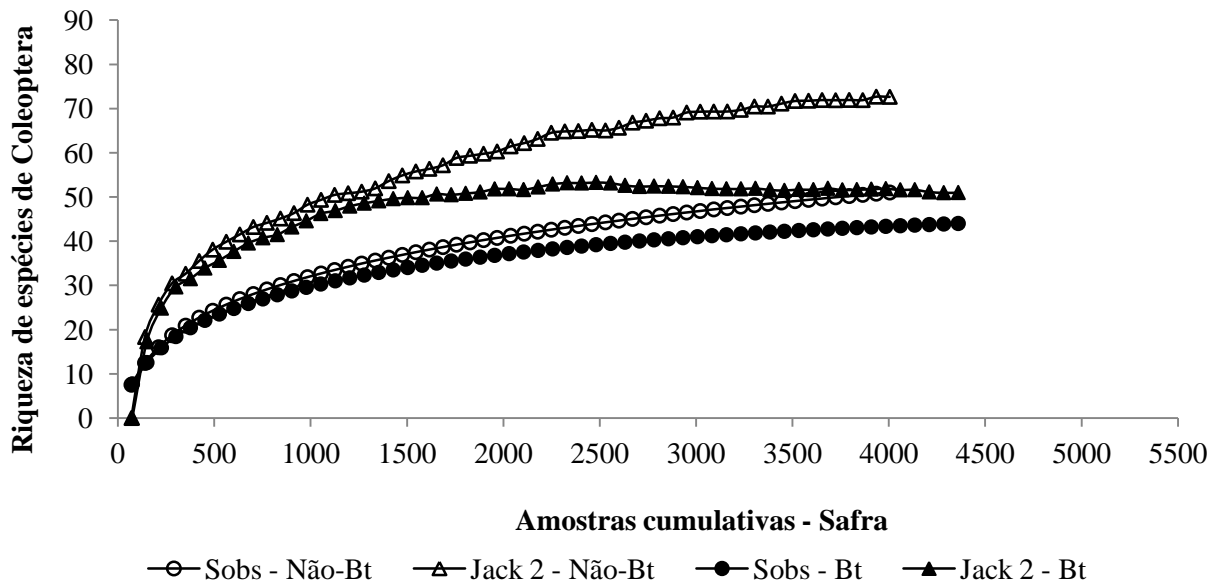


Figura 2. Curva cumulativa de espécies de Coleoptera no período de safra 2009/2010 e 2010/2011 e safrinha (2010 e 2011) em sistemas de produção de milho Bt e não-Bt, Mato Grosso do Sul, Brasil. Sobs (Mao Tau) = riqueza observada de espécies; Jack 2 = riqueza estimada de espécies Jackknife 2.

Tabela 6. Frequência de ocorrência de espécies de Coleoptera em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safras de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009/2010 e 2010/2011.

Taxon	Saфра 2009/2010				Saфра 2010/2011							
	A Bt	A NBt	B Bt	B NBt	F Bt	F NBt	G Bt	G NBt	H Bt	H NBt	I Bt	I NBt
SCARABAEOIDEA												
Sacarabaeiadae												
<i>Ataenius platensis</i>	91	32	88	46	15	75	4	4	8	6	16	10
<i>Canthidium</i> sp. 1	111	48	175	197	7	7	36	31	41	25	412	359
<i>Canthidium</i> sp. 2	-	2	34	25	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chanton chalybaeus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
<i>Canthon</i> sp. 1	25	30	58	63	-	1	4	81	3	2	25	26
<i>Canthon</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4
<i>Canthon</i> sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-
<i>Eutrichillum</i> spp	7	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Coprophanaeus Metallophanaeus</i> sp.	101	109	5	2	1	4	4	4	19	6	38	16
<i>Coprophanaeus Megaphanaeus</i> sp.	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Coprophanaeus (Coprophanaeus)</i> sp.	-	-	-	-	8	12	1	2	4	7	15	14
<i>Dichotomius</i> sp.1	33	27	36	9	6	4	1	16	13	1	209	126
<i>Dichotomius</i> sp. 2	-	-	-	-	19	56	1	2	3	2	67	26
<i>Trichillum</i> spp.	6	-	1	-	-	1	-	1	-	1	-	1
<i>Cyclocephala forsteri</i>	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bothynus</i> spp.	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leucothyreus kirbyanus</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ontherus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
<i>Anomala</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Scarabaeiadae sp. 6	-	5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scarabaeiadae sp. 7	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trogidae												
<i>Omorgus</i> spp.	2	4	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-
CUCUJOIDEA												
Nitidulidae												
<i>Carpophilus</i> spp.	30	8	50	77	117	9	2	-	2	5	8	5
<i>Stelidota</i> spp.	220	91	333	335	39	30	11	-	23	34	15	25
Nitidulidae sp. 1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitidulidae sp.2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Cucujidae												
<i>Ahasverus</i> spp.	5	2	4	1	-	-	-	-	-	2	-	1
CHRYSOMELOIDEA												
Chrysomelidae												
<i>Myochrous</i> spp.	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brasilaphitona</i> sp. 1	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaedon consimilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
TENEBRIONOIDEA												
Tenebrionidae												
<i>Ctesia hirta</i>	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lagria villosa</i>	-	1	-	-	30	24	-	-	1	1	1	-
<i>Phloeonemus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tenebrionidae sp. 1	8	12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
CURCULIONOIDEA												
Curculionidade												
<i>Sternechus subsignatus</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Curculionidae sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Curculionidae sp. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
CARABOIDEA												
Carabidae												
<i>Calosoma granulatum</i>	66	80	4	1	1	3	29	24	130	101	10	14
<i>Galerita collaris</i>	448	270	84	87	-	-	10	15	24	21	50	62
<i>Megacephala (Tetracha) brasiliensis</i>	4	5	7	3	7	17	23	38	54	69	26	28
<i>Pelecium violaceum</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Scarites</i> spp	2	1	3	8	-	-	2	-	6	4	1	3

Cont. Tabela 6.

Taxon	Safrinha 2009/2010				Safrinha 2010/2011							
	A Bt	A NBt	B Bt	B NBt	F Bt	F NBt	G Bt	G NBt	H Bt	H NBt	I Bt	I NBt
Carabidae sp. 1	9	1	4	8	2	2	-	-	-	-	1	8
Carabidae sp. 2	1	2	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-
Carabidae sp.3	2	2	-	-	1	-	1	1	-	1	2	1
Carabidae sp.4	-	-	4	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Carabidae sp.5	30	155	14	8	-	-	2	2	3	4	-	2
Carabidae sp.6	1	2	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-
Carabidae sp.7	-	3	7	4	3	3	1	-	3	9	47	63
Carabidae sp. 8	1	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STAPHYLINOIDEA												
Staphylinidae												
Aleocarini sp. 1	331	182	54	50	71	293	1	-	46	9	2	4
Xantolini sp. 1	11	54	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylinidae sp. 1	-	4	-	-	-	-	-	-	9	4	4	6
Scydmaenidae												
Scydmaenidae sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4
ELATEROIDEA												
Elateridae												
<i>Heteroderes</i> spp	1	1	2	-	-	-	-	-	2	-	2	1
<i>Conoderus maleatus</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeolus</i> spp.	3	1	-	-	-	1	-	-	-	2	2	2
Número total de espécies	27	33	27	25	15	19	20	15	22	22	26	31

A, B, F, G, H e I são as áreas de cultivo de milho onde foram realizadas as coletas

Tabela 7. Frequência de ocorrência de espécies de Coleoptera em áreas de milho Bt e milho não-Bt em safrinhas de dois anos agrícolas. Mato Grosso do Sul, Brasil, 2010 e 2011.

Taxon	Safrinha 2010						Safrinha 2011							
	C Bt	C NBt	D Bt	D NBt	E Bt	E NBt	J Bt	J NBt	L Bt	L NBt	M Bt	M NBt	N Bt	N NBt
SCARABAEOIDEA														
Sacarabaeidae														
<i>Ataenius platensis</i>	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Canthidium</i> sp. 1	-	-	-	3	-	-	13	18	10	9	182	92	30	106
<i>Chanton chalybaeus</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-
<i>Canthon</i> sp. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	7	4	-	1
<i>Canthon</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Canthon</i> sp. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	5	2
<i>Coprophanaeus Metallophanaeus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	1	8	5	4	2	4	-	4
<i>Dichotomius</i> sp.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	1
<i>Dichotomius</i> sp. 2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neoathyreus</i> spp.	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CUCUJOIDEA														
Nitidulidae														
<i>Carpophilus</i> spp.	994	723	159	527	531	516	9	-	72	58	3	23	31	22
<i>Stelidota</i> spp.	428	211	513	485	579	970	35	19	108	153	120	111	72	91
Nitidulidae sp. 1	-	-	1	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitidulidae sp. 2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Cucujidae														
<i>Ahasverus</i> spp.	5	2	15	8	4	14	-	1	5	1	1	1	2	2
Coccinellidae														
<i>Hyperaspis festiva</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cycloneda sanguinea</i>	-	-	1	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>Hippodamia convergens</i>	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eriopsis connexa</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CHRYSOMELOIDEA														
Chrysomelidae														
<i>Myochrous</i> spp.	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brasilaphitona</i> sp. 1	-	2	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brasilaphitona</i> sp. 2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phaedon consimilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

Cont. Tabela 7.

Taxon	Safrinha 2010						Safrinha 2011							
	C Bt	C NBt	D Bt	D NBt	E Bt	E NBt	J Bt	J NBt	L Bt	L NBt	M Bt	M NBt	N Bt	N NBt
Chrysomelidae sp.8	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TENEBRIONOIDEA														
Tenebrionidae														
<i>Lagria villosa</i>	-	2	6	8	52	79	7	4	23	19	2	9	3	3
<i>Phloeonemus</i> spp.	-	2	34	4	4	3	-	-	-	-	-	1	3	3
Tenebrionidae sp. 1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CURCULIONOIDEA														
Curculionidae														
Curculionidae sp. 1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Curculionidae sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	1	-	-
Curculionidae sp.3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
CARABOIDEA														
Carabidae														
<i>Calosoma granulatum</i>	-	-	7	5	2	13	5	8	40	59	-	2	-	-
<i>Galerita collaris</i>	-	-	141	272	12	54	-	-	1	-	-	-	1	-
<i>Megacephala (Tetracha) brasiliensis</i>	-	-	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scarites</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Carabidae sp. 1	2	1	14	9	3	7	1	-	-	1	-	-	1	-
Carabidae sp. 2	14	4	5	5	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Carabidae sp.3	-	-	1	7	-	2	-	1	1	-	1	-	-	1
Carabidae sp.4	1	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Carabidae sp.5	2	-	3	12	2	8	-	1	-	-	3	-	-	-
Carabidae sp.6	1	-	-	5	1	2	-	-	-	-	-	2	-	-
Carabidae sp.7	-	-	2	2	-	3	-	-	-	-	-	1	-	-
Carabidae sp. 8	-	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-
Carabidae sp.9	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carabidae sp.10	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
STAPHYLINOIDEA														
Staphylinidae														
Aleocharini sp. 1	57	4	11	82	109	54	-	36	51	18	31	14	1	6
Staphylinidae sp. 1	-	-	-	-	-	-	2	1	-	1	-	-	-	-
Staphylinidae sp. 2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylinidae sp. 3	-	-	-	-	3	9	-	2	-	-	-	-	-	-
Staphylinidae sp. 4	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylinidae sp. 5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scydmaenidae														
Scydmaenidae sp. 1	64	9	11	5	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
ELATEROIDEA														
Elateridae														
<i>Heteroderes</i> spp.	-	-	-	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeolus</i> spp.	2	2	-	-	3	7	-	-	-	-	-	-	-	-
Número total de espécies	12	13	25	25	20	29	8	11	15	11	14	15	11	14

C, D, E, J, L, M e N são as áreas de cultivo de milho onde foram realizadas as coletas

Tabela 8. Índices de diversidade de Simpson (D') e Shannon (H'), Riqueza de espécies estimada pelos índice de Jackknife2 (S_{est}) e Chao2, Riqueza observada (S_o) e Teste t pareado por local de amostragem para espécies de Coleoptera em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt em cada área de estudo, em duas safras e duas safrinhas no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 2009 a 2011.

Local		D'	H'	S_{est}	Chao 2	S_o
A	Bt	6,07	2,17	32,21	28,7	27
A	Não-Bt	8,16	2,43	53,5	46,79	33
B	Bt	5,84	2,21	34,67	29,73	27
B	Não-Bt	5,41	2,08	39,93	33,15	25
F	Bt	4,96	1,95	21,48	17,71	16
F	Não-Bt	3,11	1,68	22,69	20,07	19
G	Bt	6,6	2,22	32,28	26,4	20
G	Não-Bt	5,16	1,96	27,65	27,44	15
H	Bt	6,26	2,25	30,41	25,18	22
H	Não-Bt	5,77	2,19	27,95	23,95	22
I	Bt	4,08	1,93	44,64	45,56	26
I	Não-Bt	4,3	2,08	47,93	42,55	31
Safra	Bt	9,66	2,59	51	47,05	44
Safra	Não-Bt	10,95	2,73	72,73	65,06	51
Teste t=	1,12	gl= 5	p= 0,31			
C	Bt	2,1	0,99	16,73	13,38	12
C	Não-Bt	1,64	0,73	21,98	17,58	13
D	Bt	2,87	1,53	45,24	55,25	25
D	Não-Bt	3,55	1,54	40,37	35,38	25
E	Bt	2,75	1,27	30,21	24,28	20
E	Não-Bt	2,55	1,33	45,45	37,64	29
J	Bt	3,55	1,54	9,95	8,29	8
J	Não-Bt	4,77	1,8	18,86	19,57	11
L	Bt	4,83	1,82	25,73	24,19	15
L	Não-Bt	3,41	1,52	19,13	19,75	11
M	Bt	2,64	1,25	25,07	20,13	14
M	Não-Bt	3,3	1,52	25,73	24,19	15
N	Bt	3,46	1,55	17,97	15,17	11
N	Não-Bt	2,99	1,41	24,4	19,83	14
Safrinha	Bt	3,28	1,62	78,31	90,31	45
Safrinha	Não-Bt	3,31	1,61	66,73	58,5	46
Teste t=	0,44	gl= 6	p= 0,67			

Foi utilizado o programa EstimateS para as análises faunísticas. O Teste-t pareado por local de coleta foi realizado utilizando os dados de riqueza estimada do índice Chao 2 através do software R.

Tabela 9. Distribuição de coleópteros coletados por armadilhas pitfall em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt durante a safra de 2009/2010 e 2010/2011, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Taxon	Safra verão - 2009/2010								Safra verão - 2010/2011			
	Local A				Local B				Local F			
	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**
SCARABAEOIDEA												
Sacarabaeiadae												
<i>Ataenius platensis</i>	8,27	2,91	1,7	0,11	8	4,18	0,65	0,27	2,14	10,71	4,46	0,02
<i>Canthidium</i> sp.1	10,09	4,36	1,55	0,13	15,91	17,91	0,03	0,73	1	1	0,5	1
<i>Canthidium</i> sp. 2	0	0,18	3,68	0,67	3,09	2,27	0,01	0,72				
<i>Canthon</i> sp. 1	2,27	2,73	0,06	0,84	5,27	5,73	0,03	0,89	0	0,14	5,14	0,71
<i>Eutrichillum</i> spp	0,64	1,36	0,04	0,61								
<i>Coprophanaeus Metalophanaeus</i> sp.	9,18	9,91	0	0,87	0,45	0,18	0,83	0,73	0,14	0,57	0,46	0,61
<i>Coprophanaeus Megaphanaeus</i> sp.	0,18	0	3,68	0,67								
<i>Coprophanaeus (Coprophanaeus)</i> sp.									1,14	1,71	0,06	0,74
<i>Dichotomius</i> sp.1	3	2,45	0,04	0,82	3,27	0,82	0,52	0,22	0,86	0,57	0,36	0,81
<i>Dichotomius</i> sp. 2									2,71	8	1,71	0,11
<i>Trichillum</i> spp	0,55		0,38	0,46	0,09	0	9,09	0,76	0	0,14	5,14	0,71
<i>Cyclocephala forsteri</i>					0,27	0,18	1,82	0,89				
<i>Bothynus</i> spp	0	0,09	9,09	0,76								
<i>Leucothyreus kirbyanus</i>					0,09	0	9,09	0,76				
Scarabaeidae sp. 6	0	0,45	0,65	0,5	0,36	0	1,11	0,55				
Scarabaeidae sp. 7	0	0,36	1,11	0,55								
Trogidae												
<i>Omorgus</i> spp	0,18	0,36	1,23	0,81	0,09	9,09	0,76					
CUCUJOIDEA												
Nitidulidae												
<i>Carpophilus</i> spp	2,73	0,73	0,29	0,28	4,55	7	0,18	0,47	16,71	1,29	11,57	0
<i>Stelidota</i> spp	20	8,27	4,07	0,03	30,27	30,45	0,01	0,98	5,57	4,29	0,01	0,68
Nitidulidae sp. 1	0	0,09	9,09	0,76								
Nitidulidae sp. 9										0,29	1,79	0,59
Cucujidae												
<i>Ahasverus</i> spp	0,45	0,18	0,83	0,73	0,36	0,09	1,16	0,69				
CHRYSOMELOIDEA												
Chrysomelidae												
<i>Myochrous</i> spp					0	0,09	9,09	0,76				
<i>Brasilaphitona</i> sp. 1	0	0,18	3,68	0,67	0,09	0	9,09	0,76				
TENEBRIONOIDEA												
Tenebrionidae												
<i>Ctesia hirta</i>					0	0,73	0,1	0,39				
<i>Lagria vilosa</i>	0	0,09	9,09	0,76					4,29	3,43	0	0,76
<i>Phloeonemus</i> spp	0,73	1,09	0,22	0,79	0,09	0	9,09	0,76				

Cont. Tabela 9.

Taxon	Safrã verã - 2009/2010								Safrã verã - 2010/2011			
	Local A				Local B				Local F			
	Bt	Nã-Bt	χ^2	P**	Bt	Nã-Bt	χ^2	P**	Bt	Nã-Bt	χ^2	P**
CURCULIONOIDEA												
Curculionidade												
<i>Sternachus subsignatus</i>					0	0,09	9,09	0,76				
CARABOIDEA												
Carabidae												
<i>Calosoma granulatum</i>	6	7,27	0,01	0,73	0,36	0,09	1,16	0,69	0,14	0,43	0,89	0,71
<i>Galerita collaris</i>	40,73	24,55	3,53	0,05	7,64	7,91	0,03	0,94				
<i>Megacephala (Tetracha) brasiliensis</i>	0,36	0,45	1,01	0,92	0,64	0,27	0,45	0,7	1	2,43	0,05	0,44
<i>Pelecium violaceum</i>					0	0,09	9,09	0,76				
<i>Scarites</i> sp. 1	0,18	0,09	3,03	0,86	0,27	0,73	0,3	0,65				
Carabidae sp. 1	0,82	0,09	0,08	0,45	0,36	0,73	0,37	0,73	0,29	0,29	1,75	1
Carabidae sp. 2	0,09	0,18	3,03	0,86						0,43	0,76	0,51
Carabidae sp.3	0,18	0,18	2,75	1					0,14	0	5,14	0,71
Carabidae sp.4					0,36	0	1,11	0,55				
Carabidae sp.5	2,73	14,09	6,39	0,01	1,27	0,73	0,1	0,7				
Carabidae sp.6	0,09	0,18	3,03	0,86					0,14	0	5,14	0,71
Carabidae sp.7	0	0,27	1,94	0,6	0,64	0,36	0,53	0,79	0,43	0,43	1,17	1
Carabidae sp. 8	0,09	0	9,09	0,76	0,73	0	0,1	0,39				
STAPHYLINOIDEA												
Staphylinidae												
Aleocarini sp. 1	30,09	16,55	3,37	0,05	4,91	4,55	0,04	0,91	10,14	41,86	18,14	0
Xantolini sp. 1	1	4,91	1,43	0,11	0,27	0,18	1,82	0,89				
Staphylinidae sp. 9	0	0,36	1,11	0,55								
ELATEROIDEA												
Elateridae												
<i>Heteroderes</i> spp	0,09	0,09	5,5	1	0,18	0	3,68	0,67				
<i>Conoderus maleatus</i>					0	0,09	9,09	0,76				
<i>Aeolus</i> spp	0,27	0,09	1,84	0,76					0	0,14	5,14	0,71
Soma das espécies⁺	141	105,18	4,92	0,02	89,82	85,55	0,06	0,75	46,86	78,14	7,34	0,01
Hill's N1⁺⁺	8,77	11,38	0,13	0,56	9,13	7,68	0,01	0,72	7,03	5,39	0,03	0,64

O n das áreas A e B = 11; n da área F = 7

** Valores do χ^2 é significativamente diferente se $P \leq 0,05$

⁺Média do número de indivíduos coletados por tratamento

⁺⁺Média do número de espécies abundantes coletadas por tratamento

Cont. Tabela 9. Distribuição de coleópteros coletados por armadilhas pitfall em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt durante a safra de 2009/2010 e 2010/2011, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Taxon	Safra verão - 2010/2011											
	Local G				Local H				Local I			
	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**
SCARABAEOIDEA												
Sacarabaeiadae												
<i>Ataenius platensis</i>	0,44	0,44	1,13	1	0,73	0,55	0,53	0,87	1,78	1,11	0,04	0,69
<i>Canthidium</i> sp.1	4	3,44	0,03	0,84	3,73	2,27	0,03	0,55	45,78	39,89	0,28	0,52
<i>Chanton chalybaeus</i>									0,11	0,22	2,37	0,85
<i>Canthon</i> sp. 1	0,44	9	6,04	0,01	0,27	0,18	1,82	0,89	2,78	2,89	0,14	0,96
<i>Canthon</i> sp. 2									0,11	0,44	0,8	0,65
<i>Canthon</i> sp. 4	0	0,44	0,69	0,5								
<i>Coprophanæus Metalophanæus</i> sp.	0,44	0,44	1,13	1	1,73	0,55	0,01	0,43	4,22	1,78	0,35	0,32
<i>Coprophanæus Megaphanæus</i> sp.		0,11	7,11	0,74								
<i>Coprophanæus (Coprophanæus)</i> sp.	0,11	0,22	2,37	0,85	0,36	0,64	0,53	0,79	1,67	1,56	0,25	0,95
<i>Dichotomius</i> sp.1	0,11	1,78	0,24	0,23	1,18	0,09	0,01	0,33	23,22	14	1,82	0,13
<i>Dichotomius</i> sp. 2	0,11	0,22	2,37	0,85	0,27	0,18	1,82	0,89	7,44	2,89	1,22	0,16
<i>Trichillum</i> spp	0	0,11	7,11	0,74	0	0,09	9,09	0,76	0	0,11	7,11	0,74
<i>Ontherus</i> spp	0,11	0	7,11	0,74	0,09	0	9,09	0,76				
<i>Anomala</i> spp					0,09	0	9,09	0,76	0	0,11	7,11	0,74
Trogidae												
<i>Omorgus</i> spp									0,11	0	7,11	0,74
CUCUJOIDEA												
Nitidulidae												
<i>Carpophilus</i> spp	0,22	0	2,72	0,64	0,18	0,45	0,83	0,73	0,89	0,56	0,31	0,78
<i>Stelidota</i> spp	1,22	0	0,04	0,27	2,09	3,09	0	0,66	1,67	2,78	0	0,6
Cucujidae												
<i>Ahasverus</i> spp					0	0,18	3,68	0,67	0	0,11	7,11	0,74
CHRYSEMELOIDEA												
Chrysomelidae												
<i>Phaedon consimilis</i>					0,09	0	9,09	0,76				
TENEBRIONOIDEA												
Tenebrionidae												
<i>Lagria vilosa</i>					0,09	0,09	5,5	1	0,11	0	7,11	0,74
<i>Phloeonemus</i> spp									0	0,11	7,11	0,74
CURCULIONOIDEA												
Curculionidae												
Curculionidae sp. 4									0	0,11	7,11	0,74
Curculionidae sp. 5									0	0,11	7,11	0,74

Cont. Tabela 9.

Taxon	Safrã verã - 2010/2011											
	Local G				Local H				Local I			
	Bt	Nã-Bt	χ^2	P**	Bt	Nã-Bt	χ^2	P**	Bt	Nã-Bt	χ^2	P**
CARABOIDEA												
Carabidae												
<i>Calosoma granulatum</i>	3,22	2,67	0,03	0,82	11,82	9,18	0,13	0,57	1,11	1,56	0,12	0,79
<i>Galerita collaris</i>	1,11	1,67	0,07	0,74	2,18	1,91	0,13	0,89	5,56	6,89	0,01	0,71
<i>Megacephala (Tetracha) brasiliensis</i>	2,56	4,22	0,07	0,52	4,91	6,27	0,01	0,68	2,89	3,11	0,1	0,93
<i>Pelecium violaceum</i>									0	0,11	7,11	0,74
<i>Scarites</i> sp. 1	0,22	0	2,72	0,64	0,55	0,36	0,74	0,85	0,11	0,33	1,36	0,74
Carabidae sp. 1									0,11	0,89	0,05	0,44
Carabidae sp. 2									0,11		7,11	0,74
Carabidae sp.3	0,11	0,11	4,5	1	0	0,09	9,09	0,76	0,22	0,11	2,37	0,85
Carabidae sp.4	0,11	0	7,11	0,74								
Carabidae sp.5	0,22	0,22	2,25	1	0,27	0,36	1,3	0,91	0	0,22	2,72	0,64
Carabidae sp.6	0,22	0	2,72	0,64								
Carabidae sp.7	0,11	0	7,11	0,74	0,27	0,82	0,19	0,6	5,22	7	0,05	0,61
STAPHYLINOIDEA												
Staphylinidae												
Aleocarini sp. 1	0,11	0	7,11	0,74	4,18	0,82	1,12	0,13	0,22	0,44	0,91	0,79
Staphylinidae sp. 9					0,82	0,36	0,25	0,68	0,44	0,67	0,54	0,83
Scydmaenidae												
Scydmaenidae sp. 1								0,22	0,44	0,91	0,79	
ELATEROIDEA												
Elateridae												
<i>Heteroderes</i> spp					0,18	0	3,68	0,67	0,22	0,11	2,37	0,85
<i>Aeolus</i> spp					0	0,18	3,68	0,67	0,22	0,22	2,25	1
Soma das espécies	15,22	25,11	1,96	0,12	36,09	28,73	0,62	0,36	106,56	90,89	1,09	0,26
Hill's N1	9,18	7,08	0,07	0,6	9,48	8,92	0,01	0,9	6,87	8,03	0	0,76

O n da área G e I = 9, H = 11.

* Número de dias de amostragem usados para calcular os valores do χ^2

** Valores do χ^2 é significativamente diferente se $P \leq 0,05$

+ Média do número de indivíduos coletados por tratamento

++ Média do número de espécies abundantes coletadas por tratamento

Tabela 10. Distribuição de coleópteros coletados por armadilhas pitfall em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt durante a safrinha de 2010 e 2011, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Taxon	Safrinha - 2010											
	Local C				Local D				Local E			
	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**
SCARABAEOIDEA												
Sacarabaeiidae												
<i>Ataenius platensis</i>					0	0,08	10,08	0,77	0	0,08	10,08	0,77
<i>Canthidium</i> sp. 1					0	0,25	2,25	0,62				
<i>Canthidium</i> sp. 2												
<i>Chanton chalybaeus</i>					0	0,08	10,08	0,77				
<i>Dichotomius</i> sp. 2									0	0,08	10,08	0,77
<i>Neothyreus</i> spp					0,08	0	10,08	0,77				
CUCUJOIDEA												
Nitidulidae												
<i>Carpophilus</i> spp	82,83	60,25	3,26	0,06	13,25	43,92	15,4	0	44,25	43	0	0,89
<i>Stelidota</i> spp	35,67	17,58	5,48	0,01	42,75	40,42	0,02	0,8	48,25	80,83	7,73	0
Nitidulidae sp. 1					0,08	0	10,08	0,77	0	0,5	0,5	0,48
Nitidulidae sp. 9					0,08	0	10,08	0,77	0	0,08	10,08	0,77
Cucujidae												
<i>Ahasverus</i> spp	0,42	0,17	0,96	0,74	1,25	0,67	0,09	0,67	0,33	1,17	0,02	0,5
Coccinellidae												
<i>Hyperaspis festiva</i>	0	0,08	10,08	0,77	0	0,08	10,08	0,77				
<i>Cycloneda sanguinea</i>					0,08	0,08	6	1	0,08	0	10,08	0,77
<i>Hippodamia convergens</i>									0,08	0,08	6	1
<i>Eriopsis connexa</i>					0,08	0	10,08	0,77				
CHRYSOMELOIDEA												
Chrysomelidae												
<i>Myochrous</i> spp									0,08	0	10,08	0,77
<i>Brasilaphitona</i> sp. 1	0	0,17	4,17	0,68	0,58	0,25	0,53	0,72				
<i>Brasilaphitona</i> sp. 2					0,42	0	0,82	0,52				
Chrysomelidae sp8					0,08	0,17	3,36	0,87				
TENEBRIONOIDEA												
Tenebrionidae												
<i>Lagria villosa</i>	0	0,17	4,17	0,68	0,5	0,67	0,6	0,88	4,33	6,58	0,14	0,5
<i>Phloeonemus</i> spp	0	0,17	4,17	0,68	2,83	0,33	0,71	0,16	0,33	0,25	1,44	0,91
Tenebrionidae sp. 1									0,17		4,17	0,68
CURCULIONOIDEA												
Curculionidae												
Curculionidae sp. 1					0,08	0	10,08	0,77				
Curculionidae sp.3									0	0,08	10,08	0,77

Cont. Tabela 10.

Taxon	Safrinha - 2010											
	Local C				Local D				Local E			
	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**
CARABOIDEA												
Carabidae												
<i>Calosoma granulatum</i>					0,58	0,42	0,69	0,87	0,17	1,08	0,01	0,41
<i>Galerita collaris</i>					11,75	22,67	2,86	0,06	1	4,5	1,14	0,14
<i>Megacephala (Tetracha) brasiliensis</i>					0,08	0	10,08	0,77	0	0,17	4,17	0,68
Carabidae sp. 1	0,17	0,08	3,36	0,87	1,17	0,75	0,18	0,76	0,25	0,58	0,53	0,72
Carabidae sp. 2	1,17	0,33	0,02	0,5	0,42	0,42	1,2	1	0,33	0,08	1,35	0,7
Carabidae sp.3					0,08	0,58	0,38	0,54		0,17	4,17	0,68
Carabidae sp.4	0,08	0,17	3,36	0,87						0,08	10,08	0,77
Carabidae sp.5	0,17	0	4,17	0,68	0,25	1	0,05	0,5	0,17	0,67	0,3	0,58
Carabidae sp.6	0,08	0	10,08	0,77	0	0,42	0,82	0,52	0,08	0,17	3,36	0,87
Carabidae sp.7					0,17	0,17	3	1		0,25	2,25	0,62
Carabidae sp.10					0,08	0,08	6	1				
Carabidae sp.50									0	0,08	10,08	0,77
STAPHYLINOIDEA												
Staphylinidae												
Aleocarini sp. 1	4,75	0,33	2,3	0,05	0,92	6,83	3,12	0,03	9,08	4,5	0,95	0,21
Staphylinidae sp. 5									0	0,08	10,08	0,77
Staphylinidae sp. 7									0,25	0,75	0,25	0,62
Staphylinidae sp. 10					0	0,08	10,08	0,77				
Staphylinidae sp. 6	0,08	0	10,08	0,77								
Scydmaenidae												
Scydmaenidae sp. 1	5,33	0,75	2,11	0,06	0,92	0,42	0,19	0,67	0,08	0,08	6	1
ELATEROIDEA												
Elateridae												
<i>Heteroderes</i> spp					0	0,08	10,08	0,77	0,25	0,08	2,08	0,77
<i>Aeolus</i> spp	0,17	0,17	3	1					0,25	0,58	0,53	0,72
Soma das espécies	130,92	80,42	11,59	0	78,58	120,92	8,56	0	109,83	146,83	5,05	0,02
Hill's N1	2,7	2,07	0,03	0,77	4,63	4,65	0,1	0,99	3,56	3,78	0,08	0,93

O n das áreas A, B e C = 12

*Número de dias de amostragem usados para calcular os valores do χ^2

** Valores do χ^2 é significativamente diferente se $P \leq 0,05$

+Média do número de indivíduos coletados por tratamento

++Média do número de espécies abundantes coletadas por tratamento

Tabela 10. Distribuição de coleópteros coletados por armadilhas pitfall em áreas de cultivo de milho Bt e não-Bt durante a safrinha de 2011, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Taxon	Safrinha - 2011															
	Local J				Local L				Local M				Local N			
	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**
SCARABAEOIDEA																
Sacarabaeiadae																
<i>Ataenius platensis</i>										0,13	6,13	0,72				
<i>Canthidium</i> sp. 1	1,86	2,57	0,02	0,73	1,25	1,13	0,32	0,94	22,75	11,5	3,07	0,05	5	17,67	6	0,01
<i>Chanton chalybaeus</i>													1,17	0	0,02	0,28
<i>Canthon</i> sp. 1					0,13	0	6,13	0,72	0,88	0,5	0,28	0,75	0	0,17	4,17	0,68
<i>Canthon</i> sp. 2					0,13	0	6,13	0,72					0	0,17	4,17	0,68
<i>Canthon</i> sp. 3									0,13	0	6,13	0,72	0,83	0,33	0,21	0,64
<i>Coprophanaeus Metalophanaeus</i> sp.	0,14	1,14	0	0,38	0,63	0,5	0,68	0,91	0,25	0,5	0,75	0,77	0	0,67	0,17	0,41
<i>Dichotomius</i> sp.1									0,25	0,13	2,04	0,84	0	0,17	4,17	0,68
CUCUJOIDEA																
Nitidulidae																
<i>Carpophilus</i> spp	1,29	0	0,06	0,26	9	7,25	0,03	0,66	0,38	2,88	0,69	0,17	5,17	3,67	0,03	0,61
<i>Stelidota</i> spp	5	2,71	0,21	0,41	13,5	19,13	0,66	0,32	15	13,88	0	0,83	12	15,17	0,17	0,54
Nitidulidae sp. 1																
Nitidulidae sp. 9																
Cucujidae																
<i>Ahasverus</i> spp	0	0,14	5,14	0,71	0,63	0,13	0,33	0,56	0,13	0,13	4	1	0,33	0,33	1,5	1
Coccinellidae																
<i>Cycloneda sanguinea</i>					0,13	0	6,13	0,72								
CHRYSOMELOIDEA																
Chrysomelidae																
<i>Brasilaphitona</i> sp. 2													0	0,17	4,17	0,68
<i>Phaedon consimilis</i>									0,13	0	6,13	0,72				
TENEBRIONOIDEA																
Tenebrionidae																
<i>Lagria villosa</i>	1	0,57	0,21	0,73	2,88	2,38	0,05	0,83	0,25	1,13	0,01	0,46	0,5	0,5	1	1
<i>Phloeonemus</i> spp									0	0,13	6,13	0,72	0,5	0,5	1	1
CURCULIONOIDEA																
Curculionidae																
Curculionidae sp. 2					0,25	0,13	2,04	0,84	0,13	0,13	4	1				

Cont. Tabela 10.

Taxon	Safrinha - 2011															
	Local J				Local L				Local M				Local N			
	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**	Bt	Não-Bt	χ^2	P**
CARABOIDEA																
Carabidae																
<i>Calosoma granulatum</i>	0,71	1,14	0,18	0,75	5	7,38	0,15	0,5	0	0,25	2,25	0,62				
<i>Galerita collaris</i>					0,13	0	6,13	0,72					0,17	0	4,17	0,68
<i>Scarites</i> spp									0	0,13	6,13	0,72				
Carabidae sp. 1	0,14	0	5,14	0,71		0,13	6,13	0,72					0,17	0	4,17	0,68
Carabidae sp.3	0	0,14	5,14	0,71	0,13	0	6,13	0,72	0,13	0	6,13	0,72	0	0,17	4,17	0,68
Carabidae sp.4																
Carabidae sp.5	0	0,14	5,14	0,71					0,38	0	1,04	0,54				
Carabidae sp.7									0	0,13	6,13	0,72				
Carabidae sp. 8					0,13		6,13	0,72								
STAPHYLINOIDEA																
Staphylinidae																
Aleocarini sp. 1	0	5,14	3,34	0,02	6,38	2,25	1,13	0,16	3,88	1,75	0,23	0,37	0,17	1	0,02	0,44
Staphylinidae sp. 9	0,29	0,14	1,71	0,83	0	0,13	6,13	0,72								
Staphylinidae sp. 7	0	0,29	1,79	0,59												
Soma das espécies	10,43	14,14	0,3	0,45	40,25	40,5	0,01	0,98	44,63	33,25	1,38	0,2	26	40,67	2,8	0,07
Hill's N1	4,68	6,02	0,01	0,68	6,15	4,59	0,03	0,63	3,49	4,59	0	0,7	4,71	4,08	0,02	0,83

O n da área J = 7, área L e M = 8, área N = 6

* Número de dias de amostragem usados para calcular os valores do χ^2 ** Valores do χ^2 é significativamente diferente se $P \leq 0,05$

+ Média do número de indivíduos coletados por tratamento

++ Média do número de espécies abundantes coletadas por tratamento

Discussão

Formicidae

Foi registrada no presente trabalho, nas áreas de monocultivos de milho estudadas, uma baixa riqueza de espécies de formigas. De fato, espera-se que em agroecossistemas com monocultivos agrícolas e revolvimento do solo seja afetada a população natural de organismos do solo e, no caso das formigas, trabalhos de análises faunísticas em sistemas agrícolas normalmente relatam a baixa riqueza de espécies, por exemplo: em áreas de cultivo de café orgânico foram registradas 38 espécies de formigas (Spolidoro 2009); já em áreas de plantio direto encontrou-se 26 espécies (Ishizuka 2004); em cultivo de soja foram identificadas 32 espécies e em cana-de-açúcar 45 espécies (Santos 2010); enquanto em algodão 18 espécies de formigas foram observadas durante o ciclo da cultura (Dutra 2009). Essas riquezas de espécies se tornam baixas quando comparadas com uma única área de mata nativa, onde foram registradas 102 espécies desse grupo (Lutinski et al. 2008), ou com as 142 espécies descritas em fragmentos de floresta (Santos et al. 2006).

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa, as maiores riquezas de espécies ocorreram nas subfamílias Myrmicinae e Formicinae. Sabe-se que Myrmicinae é considerada a maior subfamília de Formicidae, representando mais de 55% das espécies encontradas no mundo, seguida por Formicinae e Dolichoderinae (Lopes e Santos 1996), além de apresentara maior diversidade de hábitos alimentares na região neotropical (Fowler et al. 1991).

A curva de riqueza de espécies acumuladas por amostragem no período de verão (safra) foi satisfatória para caracterizar a comunidade de formigas presente nas áreas amostradas, pois a riqueza de espécies observadas foi similar a riqueza estimada. Isso significa que o esforço amostral foi suficiente para registrar as espécies existentes nas áreas estudadas. Por outro lado, no período de inverno (safrinha) as curvas de riqueza não se estabilizaram, o que indica que o esforço amostral pode

não ter sido o suficiente para quantificar totalmente a comunidade de formigas. Todavia, como se trata de um agroecossistema em monocultivo e de cultura de inverno, outros fatores podem ter afetado diretamente na amostragem de formigas, como por exemplo, as baixas temperaturas observadas no período e baixa umidade. Esses fatores climáticos podem reduzir a atividade de alguns grupos mais sensíveis de formigas nas áreas, aumentando o número de espécies raras, o que torna o processo de amostragem menos eficiente na determinação da riqueza de espécies.

A diferença entre a riqueza observada e estimada indica uma provável diversificação de ambientes, o que indica um maior número de espécies raras, o que afeta (aumentando ou diminuindo) a riqueza de formigas nas áreas. Assim, quanto mais heterogenias as amostras, maior será a distância entre a riqueza observada e a estimada.

As espécies de *Pheidole* foram as mais frequentes nas áreas de milho Bt e não-Bt. Isso, provavelmente, deve-se ao fato de que este gênero apresenta elevado número de espécies (Verhaagh e Rosciszewski 1994; Soares et al. 1998; Marinho et al. 2002), além de serem eficientes predadores epigêicos, muitas vezes generalistas, e ocorrendo nos mais diversos ambientes (Wilson 2003). A espécie *P. oxyops* foi registrada em todas as amostras dos dois tratamentos, isso é justificável por se tratar de uma espécie relatada como a mais abundante em diversos agroecossistemas (Cividanes et al. 2009).

Os dois gêneros mais abundantes registrados *Pheidole* e *Solenopsis*, são comuns em áreas de cultivo de milho (Della Lucia et al. 1982) e estão adaptadas em áreas com pulverização de inseticidas (Micherreff Filho et al. 2002). Além disso, estes gêneros são representados por espécies predadoras, importantes agentes de controle biológico. Por exemplo, há registros de *Pheidole* predando adultos de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) (Fernandes et al. 1994).

Não houve diferença na diversidade e riqueza de formigas, essa similaridade ocorreu mesmo com sistemas de produção diferentes. Onde o sistema de produção de milho não-Bt recebeu mais aplicação de produtos químicos quando comparado ao Bt. A similaridade de espécies entre os tratamentos foi alta, isso significa maior homogeneidade na composição de espécies entre os sistemas de produção de milho Bt e não-Bt, justamente pelo fato de algumas espécies registradas serem consideradas de elevada amplitude de tolerância fisiológica às alterações ambientais (Fernandes et al. 1994, Wilson 2003). Algumas espécies de formigas ocorreram apenas em áreas de milho Bt e outras apenas em áreas de milho não-Bt, todavia essas espécies apareceram com baixa frequência de ocorrência. Isso provavelmente está relacionado aos tratos culturais adotados pelo produtor em cada sistema de produção.

Coleoptera

A ordem Coleoptera é muito diversificada, tanto em número de espécies quanto em tipos de ambientes que podem ser explorados por essas espécies (Vanin e Ide 2002). A família Scarabaeidae foi a mais rica em espécies registrada neste estudo. Estes insetos detritívoros e coprófagos podem ser de grande importância como ferramenta para desenvolvimento de técnicas adequadas de manejo de ambientes, especialmente os agroecossistemas (Sampaio et al. 2009). Em áreas de pastagem, verificaram-se diferentes densidades populacionais de besouros coprófagos (sacarabeídeos) e quanto maior a densidade populacional dos insetos, maior também a produção de matéria seca e teor de proteína bruta total das plantas (Fincher et al. 1981).

Carabidae, a segunda Família em número de espécies coletadas na presente pesquisa, constitui o maior grupo da guilda de invertebrados de solo de predadores generalistas, com grande potencial para agentes de controle biológico em agroecossistemas (Ellsbury et al. 1998, French et al. 2004).

Leslie et al. (2007) compararam diferentes culturas transgênicas com suas respectivas isolinhas, em um sistema com MIP, e registraram na maioria das vezes o tratamento GM com a maior riqueza de espécies. Já no presente estudo, não houve diferença significativa para comunidades de Coleoptera e Formicidae em sistemas de produção de milho Bt e sua isolinha não-Bt. Estudos de populações de Carabidae em culturas de milho Bt sem aplicação de inseticidas e não-Bt com e sem aplicação de inseticidas também mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos (Floate et al. 2007). Além disso, segundo Naranjo (2005), o impacto observado em inimigos naturais em cultivares de algodão GM e sua isolinha geralmente é devido à aplicação de inseticidas. No Brasil também foram realizados estudos de campo que não indicam efeitos do milho Bt a predadores, como, por exemplo, tesourinha (Dermaptera: Forficulidae) e joaninha (Coleoptera: Coccinellidae) (Fernandes et al. 2007).

Apesar de não ter ocorrido nenhuma diferença significativa da riqueza de espécies de coleópteros entre áreas de cultivo de milho Bt e milho não-Bt, os índices calculados para estimar a riqueza resultaram em maior riqueza de espécies nas áreas de milho não-Bt na safra, enquanto na safrinha a maior riqueza foi registrada nas áreas de milho Bt. Marvier et al. (2007) em uma meta-análise de 42 experimentos de campo com manejo de inseticida, verificaram que invertebrados não-alvo são geralmente mais abundantes em cultivos de milho e algodão Bt do que em cultivos de suas isolinhas não GM.

A resposta obtida pela curva do coletor (riqueza de espécies por amostras cumulativas) sugere que o esforço amostral não foi suficiente para registrar toda a comunidade de coleópteros estimada. Assim, considera-se que a amostragem de coleópteros de solo através de armadilhas *pitfall* não representou a estimativa absoluta da densidade populacional, apenas a estimativa da densidade das espécies que são mais frequentes ou mais ativas. No entanto, a densidade relativa pode ser mais importante que a densidade absoluta em relação ao controle biológico de pragas, pois são justamente

os indivíduos mais frequentes e ativos que proporcionam mudanças nos cálculos de diversidade de espécies. E também, amostragens contínuas (por semanas ou meses) representam muito bem os dados de abundância relativa de espécies através de anos ou estações (French et al. 2004). Com base nisto, os resultados da presente pesquisa podem ser considerados suficientes para afirmar que não houve efeito direto da cultivar de milho Bt sobre a riqueza de espécies de Coleoptera de solo.

Embora a diversidade de espécies não seja diferente entre os tratamentos (milho Bt e não-Bt), nas safras de verão a diversidade de coleópteros de solo foi maior que nas safrinhas de inverno. Por exemplo, a Família Sacarabaeidae foi a mais rica, mais diversa e com mais espécies dominantes na safra, sendo que no período de safrinha apenas alguns indivíduos dessa família foram registrados. Isso pode ser justificado principalmente por fatores climáticos. Na safra, o clima típico de verão, com altas temperaturas e umidade e maior período de luminosidade, é mais favorável para o desenvolvimento dos insetos. Contrastando com o período de inverno quando é cultivado o milho safrinha, com clima mais ameno chegando às temperaturas baixas e até geadas, e muitos dias com baixa umidade do ar, fatores que podem ter influenciado na menor diversidade das espécies.

Ao se comparar o número de espécies de Coleoptera nas áreas amostrais, verificaram-se variações dos resultados. Algumas áreas apresentaram maior número de espécies no sistema de produção Bt, enquanto outras áreas o maior número de espécies no não-Bt. Essa situação parece não estar ligada ao híbrido de milho utilizado e sim às características peculiares de cada fazenda onde foram realizadas as coletas, ao sistema de produção, aplicações de inseticidas realizadas, e também a fatores abióticos. Por exemplo, na safrinha 2010 as condições climáticas foram resultantes de um inverno seco, enquanto que na safrinha de 2011 o inverno obteve maior precipitação e dias quentes.

Quando se trata de agroecossistemas é importante lembrar que os métodos de manejo agrícola de produção intensiva, condições ambientais (Cividanes et al. 2009) e uso de inseticidas ocasionam alterações na entomofauna. O que geralmente resulta em maiores impactos na diversidade e abundância de espécies em cultivares convencionais do que em cultivares Bt (Griffiths et al. 2007).

Este estudo também relatou uma lista de espécies de Coleoptera e Formicidae existentes na região de Dourados, Rio Brillhante e Maracaju, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Essa lista com a diversidade de espécies, em condições de cultivo de milho, direciona estudos futuros. Assim, será possível comparar os resultados sobre impacto de milho Bt sobre formigas e coleópteros, e avaliar pontos negativos e positivos dessa tecnologia sobre artrópodes não-alvo.

Conclusão

Esta pesquisa possibilitou verificar que o sistema de produção de milho Bt nas safras e safrinhas não afetou a riqueza e diversidade de formigas e coleópteros de solo, no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil.

Verificou-se que no período de verão ocorreram algumas espécies de formigas e coleópteros que não ocorreram no inverno, assim como outras ocorreram exclusivamente no inverno.

Na safrinha (inverno) a riqueza e a diversidade de espécies de formigas e coleópteros foram inferiores ao período de safra (verão).

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de doutorado. Aos taxonomistas M.Sc. da UFGD: Juarez Furhmann e Daniela de Cássia Bená pela identificação de espécies de Coleoptera, e ao Manoel Fernando Demétrio pela identificação das espécies de Formicidae. Ao Dr. Josué Raizer pelo auxílio na análise estatística. Aos estagiários, estudantes de Agronomia, Gilmar Marques, Bruno Petelin e Nágila Oliveira, pela contribuição no trabalho de campo.

Referências

- Andersen AN, Patel AD (1994) Meat ants as dominant members of Australian ant communities: an experimental test of their influence on the foraging success and forager abundance of other species. *Oecologia* 98:15-24.
- Aquino AM, Aguiar-Menezes EL, Queiroz JM (2006) Recomendações para coleta de artrópodes terrestres por armadilhas de queda (“Pitfall-Traps”). Circular Técnica, 18. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 8p.
- Bruyn LAL (1999) Ants as bioindicators of soil function in rural environments. *Agric, Ecosyst Environ* 74: 425-441.
- Cividanes FJ, Barbosa JC, Martins ICF, Pattaro F, Nunes MA, Santos RS (2009) Diversidade e distribuição espacial de artrópodes associados ao solo em agroecossistemas. *Bragantia* 68(4): 991-1002.
- Colwell RK, Coddington JA (1994) Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Phil Trans R Soc Lond B* 345: 101-118.
- Colwell RK (2006) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8. Persistent URL <purl.oclc.org/estimates>
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2012) Acompanhamento da safra Brasileira, grãos, safra 2011/2012, oitavo levantamento, maio/2012. Brasília: Conab, 2012.
- Della Lucia TMC, Loureiro MC, Chandler L, Freire JAH, Galvão JD, Fernandes B (1982) Ordenação de comunidades de Formicidae em quatro agroecossistemas de Viçosa, Minas Gerais. *Experientiae* 28(6): 67-94.
- Dutra CC (2009) Impacto de algodão geneticamente modificado resistente a insetos sobre a entomofauna de solo. Dissertação de Mestrado em Entomologia: UFGD, Dourados-MS. 54 p.
- Dutton A, Romeis J, Bigler F (2003) Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a casa study. *BioControl* 48: 611-636.

- Ellsbury MM, Powell JE, Forcella F, Woodson WD, Clay SA, Riedell WE (1998). Diversity and dominant species of ground beetle assemblages (Coleoptera: Carabidae) in crop rotation and chemical input systems for Northern Great Plains. *Ann Entomol Soc Am* 91(5): 619-625.
- Felfili JM, Rezende RP (2003) Conceitos e métodos em fitossociologia. Brasília: Editora UNB, 68 p.
- Fernandes WD, Oliveira PS, Carvalho SL, Habib MEM (1994) *Pheidole* ants as potential biological control agents of the boll weevil, *Anthonomus grandis* (Col., Curculionidae), in Southeast Brazil. *J Appl Entomol* 118: 437-442.
- Fernandes OA, Faria M, Martinelli S, Schmidt F, Carvalho VFC, Moro G (2007) Short-term assessment of Bt maize on non-target arthropods in Brazil. *Sci Agric* 64(3): 249-255.
- Floate KD, Cárcamo HA, Blackshaw RE, Postman B, Bourrassa S (2007) Response of ground beetle (Coleoptera: Carabidae) field populations to four years of Lepidoptera-specific Bt corn production. *Environ Entomol* 36(5): 1269-1274.
- Fincher GT, Monson WG, Burton GW (1981) Effects of cattle feces rapidly buried by dung beetles on yield and quality of coastal bermudagrass. *Agron J* 3: 775-79.
- Fowler HG, Forti LC, Brandão CRF, Delabie JHC, Vasconcelos HL (1991) Ecologia nutricional de formigas. In Panizzi AR, Parra JRP (eds) *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. São Paulo, Editora Manole & CNPq, 359 pp.
- French BW, Chandler LD, Ellsbury MM (2004) Ground beetle (Coleoptera: Carabidae) assemblages in a transgenic corn-soybean cropping system. *Environ Entomol* 33(3): 554-563.
- Frizzas MR, Cunha US, Macedo PM (2004) Plantas transgênicas resistentes a insetos. *Rev Bras Agrociências* 10(1): 13-18.
- Fundação MS (2010) *Tecnologia e produção: soja e milho 2010/2011*. Maracaju, 257p.
- Garcia FR, Nardi N, Costa MRM, Brecosvit AD (2004) Ocorrência de artrópodes em lavouras de milho (*Zea mays*) no município de Alvoredo-SC. *Bioikos* 18(1): 21-28.

- Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch ANE, Cortet J, Andersen MN, Krogh PH (2007) Microbial and microfaunal community structure in cropping systems with genetically modified plants. *Pedobiologia* 51: 195–206.
- Harwood JD, Wallin WG, Obrycki JJ (2005) Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Mol Ecol* 14: 2815-2823.
- Hellman JJ, Fowler GW (1999) Bias, precision, and accuracy of four measures of species richness. *Ecol Applic* 9(3): 824-834.
- Holldobler B, Wilson EO (1990) *The Ants*. Cambridge: The Belknap Press of Harvard University Press, 731 p.
- Höfte H; Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53(2): 242-255.
- Icoz I, Stotzky G (2008) Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. *Soil Biol Biochem* 40: 559-586.
- Ishizuca DL (2004) Estrutura de comunidade de formigas (Hymenoptera: Formicidae) em sistemas de plantio direto e convencional na região de Dourados-MS, Brasil. Dissertação de Mestrado em Entomologia: UFMS, Dourados-MS. 62 p.
- Kaniesky MR (2010) Caracterização florística, diversidade e correlação ambiental na floresta nacional de São Francisco de Paula, RS. Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal: Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS. 99 p.
- Leslie TW, Hoheisel GA, Biddinger DJ, Rohr JR, Fleischer SJ (2007) Transgenes sustain epigeal insect biodiversity in diversified vegetable farm systems. *Environ Entomol* 36(1): 234-244.
- Lima HV, Oliveira TS, Oliveira MM, Mendonça ES, Lima PJBF (2007) Indicadores de qualidade do solo em sistemas de cultivo orgânico e convencional no semi-árido cearense. *Rev Bras Ci Solo* 31: 1085-1098.

- Lopes BC, Santos RA (1996) Aspects of the ecology of ants (Hymenoptera: Formicidae) on the mangrove vegetation of Rantones, Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Boletim Entomol Venezuelano* 11: 123-133.
- Lutinski JA, Garcia FRM, Lutinski CJ, Iop S (2008) Diversidade de formigas na floresta de Chapecó, Santa Catarina, Brasil. *Cienc Rural* 8(7): 1810-1816.
- Marinho CGS, Zanetti R, Delabie JHC (2002) Ant (Hymenoptera: Formicidae) diversity in Eucalyptus (Myrtaceae) plantations and cerrado litter in Minas Gerais, Brazil. *Neotrop Entomol* 31(2): 187-195.
- Marvier M, McCreedy C, Regetz J, Kareiva PA (2007) Meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science* 316: 1475-1477.
- Micherreff Filho M, Della Lucia TMC, Cruz I, Galvão JCC, Veiga CE (2002) Impacto de deltametrina em artrópodes-pragas e predadores na cultura do milho. *Rev Bras Milho Sorgo* 1(1): 25-32.
- Naranjo S (2005) Long-Term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environ Entomol* 34(5): 1193-1210.
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Santos MS, Louzada JNC, Dias N, Zanetti R, Delabie JHC, Nascimento IC (2006) Riqueza de formigas (Hymenoptera, Formicidae) da serapilheira em fragmentos de floresta semidecídua da Mata Atlântica na região do Alto do Rio Grande, MG, Brasil. *Iheringia Sér Zool* 96(1): 95-101.
- Santos GG (2010) Diversidade e composição das comunidades de formigas em cana-de-açúcar, soja e fragmentos florestais no cerrado. Dissertação de Mestrado em Entomologia: UFGD, Dourados-MS. 44 p.
- Sampaio JA, Ribeiro GT, Oliveira FF, Leal SM 2009. Coleoptera cursores de solo como indicadores de recuperação florestal. *Candombá* 5(2): 149-168.
- Soares SM, Marinho CGS, Della Lucia TMC (1998) Diversidade de invertebrados edáficos em áreas de eucalipto e mata secundária. *Acta Biol Leopold* 19: 157-164.

- Spolidoro MV (2009) Levantamento da mirmecofauna de solo (Hymenoptera, Formicidae) em cultivo de café (*Coffea arabica*). Dissertação de Mestrado em Ciências: ESALQ, Piracicaba.
- Thomazoni D, Degrande PE, Silvie PJ, Faccenda O (2010) Impact of Bollgard[®] genetically modified cotton on the biodiversity of arthropods under practical field conditions in Brazil. *Afri J Biotech* 9(37): 6167-6176.
- Uramoto K, Walder JMM, Zucchi RA (2005) Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. *Neotrop Entomol* 34: 33-39.
- Vanin SA, Ide S (2002) Classificação comentada de Coleoptera. p. 193-205. In Costa C, Vanin SA, Lobo JM, Melic A (org). *Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática*. Zaragoza, M3m Monografías Tercer Milenio, 328p
- Verhaagh M, Rosciszewski K (1994) Ants (Hymenoptera:Formicidae) and savanna in the Biosphere Reserve Beni, Bolivia. *Andrias* 13: 199-214.
- Wilson EO (2003) La hiperdiversidad como fenómeno real: el caso de *Pheidole*. p. 363–370. In Fernández F. (ed). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto Humboldt. Bogotá, 398 p.
- Woodcock BA (2005) Pitfall trapping in ecological studies. In: Leather, S.R. *Insect sampling in forest ecosystems*. Blackwell Science Ltd. pp: 37-57

Considerações Finais

As respostas obtidas com esta pesquisa, tanto em laboratório quanto em campo, mostraram que não houve efeito negativo do milho Bt sobre os insetos não-alvo estudados. No bioensaio de interação de três níveis tróficos, verificou-se que o predador não teve preferência pelo tipo de presa, ou seja, presa alimentada com milho Bt e presa alimentada com milho não-Bt. Também, foi constatado que a proteína Cry é adquirida da folha para o herbívoro e deste para o predador. Mesmo o predador alimentado-se igualmente dos dois tipos de presa, a proteína Cry estava presente no seu organismo. É recomendável que estudos futuros sejam realizados para verificar se essa toxina acumulada no organismo do predador pode ocasionar algum efeito no seu ciclo de vida (ex: duração de ínstar, fecundidade, longevidade). Através dessas informações será possível identificar em condições naturais de exposição do predador à proteína Cry a existência de algum efeito cumulativo durante seu ciclo de vida.

As análises faunísticas responderam a pergunta do segundo capítulo: não houve efeito significativo de cultivares de milho Bt sobre a fauna de formigas e coleópteros de solo. Entretanto, como o milho Bt foi liberado recentemente no Brasil, se faz necessário que estudos de monitoramento da entomofauna continuem sendo realizados.

As plantas GM foram desenvolvidas com o objetivo de resistir ao ataque de insetos pragas e ajudarem a reduzir os impactos negativos no ambiente desencadeados pelo uso de inseticidas químicos nos sistemas agrícolas. Assim, essas plantas podem levar a benefícios, tais como: preservação da saúde humana (o trabalhador no campo e aqueles que consomem o alimento) e redução de poluição por resíduos tóxicos no ambiente. No entanto, podem ocorrer impactos negativos dessas plantas em plantio de larga escala, como, por exemplo, a redução de espécies benéficas, além de pragas secundárias (não-

alvo) surgirem como pragas primárias; por isso, estratégias de MIP e de manejo de resistência de insetos em áreas de produção de plantas GM se faz necessário.

Até o momento, vários estudos foram realizados para a avaliação de risco de plantas GM a organismos não-alvo. Protocolos de como fazer essas análises de risco foram publicados recentemente e o desenvolvimento de novas cultivares GM tem sido contínuo. A maioria dos trabalhos publicados não verificaram efeitos negativos dessas plantas Bt. Contudo, os estudos de análise de risco devem continuar buscando respostas para utilizar essa tecnologia da melhor forma.