

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E PROPORÇÕES DE ÁREAS
DE REFÚGIO EM DOIS HÍBRIDOS DE MILHO TRANSGÊNICO**

Paolo Orlando Zancanaro
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E PROPORÇÕES DE ÁREAS
DE REFÚGIO EM DOIS HÍBRIDOS DE MILHO TRANSGÊNICO**

Paolo Orlando Zancanaro

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Moro

Co-orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL - SP

Janeiro – 2012

Zancanaro, Paolo Orlando
Z27c Comparações de métodos e proporções de áreas de refúgio em
dois híbridos de milho transgênico / Paolo Orlando Zancanaro. --
Jaboticabal, 2012
iii, 33 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: José Roberto Moro
Banca examinadora: Sandra Helena Unêda-Trevisoli, Otávio
Briganti Solferini
Bibliografia

1. *Zea mays* L. 2. Mistura de sementes. 3. Manejo de resistência
de insetos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 633.15:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAOLO ORLANDO ZANCANARO - nascido no dia 7 de maio de 1986, na cidade de Londrina, PR, filho de Maria Zelinda Garavello Zancanaro e Lourenço Zancanaro. Concluiu o curso de Agronomia no ano de 2009, pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina, PR. Durante a graduação, foi bolsista de extensão e de iniciação científica e, no último semestre do curso, fez estágio curricular na empresa Monsanto do Brasil Ltda. em Uberlândia, MG. Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) em nível de Mestrado, na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – SP.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar cada momento da minha vida.

Aos meus pais, e meu irmão, pelo apoio e apreço na conquista de mais um objetivo em minha vida.

À Karen Sayuri Perardt, pelo amor, paciência e incentivo em mais esta etapa cumprida.

Ao Prof. Dr. José Roberto Moro, pela valiosa orientação, confiança, amizade e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior, por todo o auxílio, paciência e amizade.

Aos professores Rosângela Maria Pinto Moreira e Josué Maldonado Ferreira, pelo estímulo inicial que me trouxe ao melhoramento genético de plantas.

À Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal – SP, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos professores Dr. Rinaldo Cesar de Paula e Dr. Dilermando Perecin pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

Ao Dr. Otávio Briganti Solferini e a Profa. Dra. Sandra Helena Unêda-Trevisoli pelas valiosas sugestões e disponibilidade de participar na banca de defesa.

À empresa Monsanto do Brasil Ltda., pelo fornecimento das sementes utilizadas nos experimentos.

Aos amigos Flávio Cese Arantes, Rafael Santos Finholdt, Felipe Salazar e Diego Resende, pelo auxílio na condução dos experimentos e pelas brincadeiras descontraídas.

À Elizandra Döring Buchweitz, pela amizade, apoio e experiências transmitidas.

A todos os amigos e colegas da Pós-Graduação, pelo bom convívio e experiências trocadas.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
SUMMARY.....	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico da cultura do milho	3
2.2. O milho geneticamente modificado	5
2.3. Áreas de refúgio.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Manejo experimental e tratamentos utilizados	11
3.2. Avaliações dos caracteres	12
3.3. Análises estatísticas.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS	28

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E PROPORÇÕES DE ÁREAS DE REFÚGIO EM DOIS HÍBRIDOS DE MILHO TRANSGÊNICO

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o método de refúgio utilizado atualmente no plantio de milho geneticamente modificado com a nova tecnologia que está sendo proposta, denominada de Refúgio no Saco (RIB). Foram semeados quatro híbridos comerciais, sendo estes avaliados em sete diferentes tratamentos e 19 repetições. Os tratamentos utilizados foram na forma de refúgio no saco, com diferentes proporções de mistura de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5%, 7,5% e 10%), um simulando o refúgio atualmente utilizado, um totalmente transgênico e um totalmente não transgênico. As parcelas experimentais foram de quatro linhas de 20 m de comprimento, espaçadas de 0,9 m entre linhas e 0,2 m entre plantas, representando uma população aproximada de 55.555 plantas por hectare. Foram feitas avaliações visuais de notas de dano nas plantas e porcentagem de infestação na espiga para *Spodoptera frugiperda*, porcentagem de infestação e porcentagem de dano nas espigas para *Helicoverpa zea*, e estimativas de produtividade de grãos. Os tratamentos na forma de mistura no saco, com proporções de 2,5% e 5,0% sofreram menores danos que o tratamento que imita o método de refúgio convencional. As médias de produtividade dentro dos dois híbridos para os tratamentos com mistura de sementes foram estatisticamente iguais. As porcentagens de infestação e de dano na espiga ocasionadas por *S. frugiperda* e *H. zea* independem da proporção de mistura utilizada nos tratamentos. Com base nos resultados obtidos, observou-se que a tecnologia de refúgio no saco pode ser considerada uma alternativa viável para substituir o método de refúgio utilizado atualmente.

Palavras-Chave: manejo de resistência de insetos, mistura de sementes, *Zea mays* L

COMPARISON OF METHODS AND RATIO OF REFUGE AREAS IN TWO TRANSGENIC CORN HYBRIDS

SUMMARY – The objective of this work was to evaluate and compare the method currently used in refuge areas for genetically modified corn with the new technology being proposed, called Refuge in the Bag (RIB). It was used four commercial hybrids with seven treatments and nineteen replications each. Four treatments in the form of refuge-in-the-bag, mixed with different proportions of non-transgenic seed with the transgenic (Mixture 2.5%, 5%, 7.5% and 10%), one simulating the refuge currently used, one totally transgenic and one totally non-transgenic. The experimental plots were four rows of twenty meters long, spaced 0,9 meters between rows and 0,2 meters between plants, representing a total population of approximately 55,555 plants per hectare. It was evaluated notes of damage in plants and percentage of ear infestation for *Spodoptera frugiperda*, percentage of infestation and percentage of damage in the ears for *Helicoverpa zea*, and the estimated yield. The treatments in the form of mixture in the bag, with ratio of 2,5% and 5,0 % suffered less damage when compared to the treatment that imitates the currently used method of refuge. The average yields within the hybrids for the seed mixture treatments were statistically similar. The percentages of infestation and damage in the ears caused by *S. frugiperda* and *H. zea* are independent of the mixing ratio used in treatments. Based on the results, the refuge in the bag technology can be considered as a viable alternative to replace the currently used method of refuge.

Keywords: insect resistance management, seeds mixture, *Zea mays* L

1. INTRODUÇÃO

Com a chegada das plantas geneticamente modificadas que expressam genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), as pesquisas e trabalhos nessa área se tornaram cada vez mais importantes e são essenciais para o contínuo avanço de produtividade da cultura do milho (LEMESLE et al., 2010).

Através do aumento das áreas cultivadas com milho geneticamente modificado (GM) e o uso indiscriminado de inseticidas químicos ao longo dos anos, começou-se a perceber uma evolução de resistência por parte dos insetos-praga. O manejo da resistência de insetos (MRI) refere-se a um conjunto de práticas, aplicadas nas áreas agrícolas, com a finalidade de evitar e/ou retardar a evolução da resistência das pragas aos métodos empregados no seu controle. Um dos principais objetivos do manejo da resistência é evitar que se formem populações de insetos resistentes às toxinas produzidas pelas plantas Bt, e que essa resistência se espalhe para outras populações (MACHADO & FIÚZA, 2011).

Uma das estratégias para retardar o surgimento da resistência dos insetos-praga em áreas cultivadas com milho transgênico é a implementação de áreas de refúgio. Refúgio é a área na qual são cultivadas plantas que não possuem o gene Bt, onde a finalidade é manter uma população de indivíduos da praga suscetíveis à toxina Bt, ou seja, aqueles que não possuem genes para a resistência (BOURGUET et al., 2005). Nessas áreas espera-se a multiplicação de um número suficiente de insetos adultos suscetíveis à toxina Bt para cruzarem com insetos que possam ter adquirido resistência, diluindo, dessa forma, a resistência na população. A dispersão dos insetos suscetíveis para fora das áreas dos refúgios é necessária para que os cruzamentos aconteçam.

Todavia, ao longo dos anos, começaram a surgir alguns questionamentos sobre a forma como as áreas de refúgio foram propostas. Existe uma eficácia na metodologia de refúgio atualmente utilizada? Todos os agricultores plantam refúgio? As normas estipuladas para o plantio do refúgio são respeitadas? Os insetos emergidos nas áreas

de refúgio se dispersam para as demais áreas? Como prolongar a eficácia da tecnologia Bt se não houver o cumprimento das normas?

Mesmo com a contínua conscientização feita por empresas, universidades e instituições de pesquisa, há evidências de que a quantidade de agricultores que de fato cumprem as normas de plantio de refúgio está diminuindo ao longo dos anos. Entretanto a maioria estaria disposta a utilizar novas tecnologias de refúgio que facilitassem o planejamento e o plantio das áreas como um todo (GRAY, 2010; WEISE, 2009).

Uma nova tecnologia proposta para solucionar esse problema foi denominada de Refúgio no Saco (“Refuge In the Bag” - RIB). Essa tecnologia propõe que sejam feitas misturas de porcentagens de sementes não transgênicas diretamente nos sacos com as sementes transgênicas (SILVEIRA, 2010). Dentre as vantagens desse sistema, podemos destacar o fato de que os agricultores terão uma maior facilidade de plantio, já que as sementes virão misturadas nos sacos e o plantio do refúgio será automático, sem a necessidade de um planejamento e custo extra. Por outro lado, as empresas terão uma maior garantia de que o surgimento de indivíduos resistentes será mais demorado e assim a tecnologia Bt terá uma maior durabilidade.

Devido à importância do assunto e também à escassez de informação científica relacionada a este tipo de tecnologia no Brasil, notou-se a necessidade de conduzir um estudo que tentasse comprovar a sua real eficácia. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o método de refúgio utilizado atualmente no plantio de milho geneticamente modificado com a nova tecnologia proposta, denominada de Refúgio no Saco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da cultura do milho

O milho é uma espécie diplóide, de polinização cruzada (alógama), pertencente à família Poaceae, gênero *Zea*, espécie *mays*. É originário e foi domesticado pelos povos da América Central, provavelmente do México, e disseminado por todo o mundo. Possui ampla variabilidade genética, sendo identificadas atualmente cerca de 300 raças e, dentro de cada raça, inúmeras variedades. Essa grande variabilidade se traduz também quanto às adaptações climáticas, de altitude e latitude, em características agronômicas desejáveis, no tamanho e composição química de grãos, tipo de endosperma e qualidade das proteínas (PATERNIANI et al., 2000).

Seus cultivares são classificadas em variedades ou híbridos. As variedades possuem polinização aberta e representam um conjunto de plantas com características comuns, que apresentam material geneticamente estável e de alta variabilidade, o que lhes confere uma maior estabilidade de produção em relação ao híbrido em condições adversas, porém normalmente com um menor potencial produtivo (ARGENTA et al., 2003).

O híbrido é caracterizado por sua procedência, sendo o híbrido simples, por exemplo, obtido a partir do cruzamento de duas linhagens endogâmicas. Segundo ARGENTA et al. (2003), este tipo de genótipo expressa alta uniformidade genética, morfológica e fenológica, porém pouca variabilidade genética, necessitando de condições edafoclimáticas favoráveis e disponibilidade adequada de nutrientes para expressar seu alto potencial produtivo.

O milho é o principal cereal cultivado no Brasil, contribuindo com mais de um terço de toda a produção de cereais do país. É cultivado na maioria das propriedades rurais, desde a pequena, onde é produzido com baixa tecnologia, até em grandes áreas, com emprego de alta tecnologia e com elevada produtividade, sendo a matéria

prima destinada para a agroindústria. Na realidade, 70% da produção mundial de milho é utilizada como alimento para produção animal (USSAMI, 2006).

A produção brasileira de milho tem se caracterizado pela divisão de cultivo em duas épocas de plantio. Os plantios de verão, ou primeira safra, são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre o fim de agosto na região Sul até os meses de outubro a novembro no Sudeste e Centro Oeste. A produção obtida na chamada safrinha, ou segunda safra, se refere ao milho de sequeiro, plantado numa época não usual, em fevereiro ou março, sucedendo uma cultura de verão e possibilitando a otimização da mão-de-obra e de maquinários da propriedade, diminuindo a sazonalidade da produção, do abastecimento e de preços (TSUNECHIRO et al., 2006).

A área cultivada com milho no Brasil apresentou um aumento aproximado de 40% nos últimos 38 anos, passando dos 10 milhões de hectares em 1973 para mais de 14 milhões de hectares atualmente. Nesse mesmo período, a produção brasileira passou de 14 milhões de toneladas para uma estimativa de mais de 59 milhões de toneladas na safra 2011/2012 (CONAB, 2012). Esse acréscimo na produção deve-se ao aumento na utilização de híbridos mais produtivos, aprimoramento das técnicas de cultivo da cultura, realização de plantios de milho safrinha, melhor controle de doenças, pragas e plantas daninhas. Estes dois últimos foram facilitados com o início da utilização de cultivares transgênicos.

Todos os anos, empresas de produção de sementes e instituições de pesquisas liberam no mercado dezenas de novos cultivares. Devido à grande heterogeneidade do material genético e de fatores bióticos e abióticos, o comportamento desses cultivares nas diferentes regiões do Brasil é diferenciado. Dentre os fatores bióticos, as pragas são os mais relevantes. Na cultura do milho, os gastos com inseticidas representam em média 15% do custo total.

Sabe-se que lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é a principal praga da cultura de milho, ocasionando perdas que ultrapassam 400 milhões de dólares anuais (CRUZ, 1999). Em termos de produtividade a redução em função da praga pode chegar a 60% dependendo do cultivar, do tipo de milho e da época em que ocorre o ataque

(CRUZ & TURPIN, 1983; CRUZ et al., 1996; CRUZ, 1999). Essas perdas normalmente acontecem devido a ataques à planta durante a fase vegetativa. Nos últimos anos, porém, tem sido verificado um aumento do ataque da praga às partes reprodutivas, especialmente nas espigas em formação e posteriormente nos grãos (CRUZ, 1995). Tais danos, quando não identificados corretamente, quanto à espécie de praga presente, podem ser confundidos com os danos provocados pela lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*), especialmente, quando ambas as espécies se encontram no mesmo nicho, ou seja, na parte apical da espiga (MATRANGOLO, 1995).

A lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) também é uma das pragas mais importantes da cultura do milho pela sua ocorrência endêmica e pela dificuldade de seu controle. Além de seus danos diretos, que podem chegar a 8%, causa danos indiretos pela abertura da espiga facilitando a entrada de outras pragas, umidade e fungos causadores de podridões.

2.2. O milho geneticamente modificado

Na safra 2010/2011, os cultivares transgênicos representaram cerca de 55,6% da área total de milho cultivada no Brasil. Na safra 2011/2012 estima-se que esta área será de aproximadamente 64,9%, o que corresponderá a 9,1 milhões de hectares (CÉLERES, 2011). Esse rápido crescimento na área semeada com milho transgênico resistente a insetos fez o Brasil atingir 25,4 milhões de hectares cultivados com culturas GM, superando a Argentina (22,9 milhões de hectares) e tornando-se o segundo maior país produtor de culturas GM, superado apenas pelos Estados Unidos, que possui 66,8 milhões de hectares plantados (JAMES, 2010).

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou anaeróbica facultativa, naturalmente encontrada no solo. À semelhança de outras bactérias, esta espécie pode se manter em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Durante a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas

que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais em um dos pólos da célula (LERECLUS, 1988; HÖFTE & WHITELEY, 1989; PEFERÖEN, 1997). Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry, também chamadas de “Insecticidal Crystal Proteins” (ICPs). Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, sendo inócuas para a maioria dos outros organismos, incluindo insetos benéficos (HERRERO et al., 2001, SIEGEL, 2001).

Genes de Bt codificadores de proteínas Cry foram isolados e introduzidos em plantas agronomicamente importantes utilizando diferentes métodos de transformação genética como aqueles que empregam *Agrobacterium*, transformação direta de protoplastos e bombardeamento de partículas ou biobalística (PASQUALI & BODANESE-ZANETTINI, 2002). Em 1981, o primeiro gene Cry foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (SCHNEPF & WHITLEY, 1981). Em 1987, foi produzida a primeira planta de tomate com genes de Bt (FISCHHOFF, 1987). Além do tomate, o milho, a soja, a batata, o algodão, outras plantas cultivadas também foram modificadas geneticamente para expressar uma ou várias proteínas Cry para o controle de lepidópteros e coleópteros.

Como citado, as plantas Bt possuem proteínas com ação inseticida, que as protegem contra o ataque de determinadas espécies de insetos-praga durante todo o ciclo da cultura, representando uma tática adicional de proteção de plantas nos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). A proteção da planta varia de híbrido para híbrido, e sob condições de alta infestação a proteção dos híbridos com uma proteína Bt existentes no mercado equivale a três, até quatro aplicações de inseticidas. Dependendo das condições de campo e do híbrido Bt utilizado, talvez não haja nenhuma necessidade de aplicação de agrotóxico.

De forma geral, a adoção da tecnologia Bt tem promovido redução de perdas da produtividade da ordem de 20%, em função do melhor controle das lagartas que atacam o milho. Além da redução das perdas diretas causadas pelos danos das lagartas na espiga, que podem atingir até 30%, há a redução dos danos indiretos (abertura da espiga para entrada de microrganismos), com menor incidência de micotoxinas nos grãos. Entre outras vantagens, pode-se citar os ganhos indiretos pela redução da

aplicação de defensivos, maior comodidade para o produtor e menor contaminação do meio ambiente (WAQUIL, 2009).

Entretanto, no contexto agrícola, a resistência de insetos tem sido identificada como uma séria ameaça ao desenvolvimento e manutenção de práticas de MIP. Uma das explicações para a evolução da resistência está no fato de que muitas práticas de manejo de pragas, como o controle químico, a resistência genética de plantas a insetos e aos agentes de controle biológico, são colocadas em prática com o objetivo de reduzir a população de uma praga através do aumento da mortalidade ou da diminuição da fecundidade dos insetos. Deste modo, com o aumento da pressão de seleção, possíveis diferenças na sobrevivência e, ou fecundidade entre os indivíduos existentes em uma determinada população podem resultar na seleção de insetos resistentes à tática de controle empregada (FERRÉ & VAN RIE, 2002). Desta forma, com o uso incorreto de uma prática de manejo de pragas e a continua seleção dos indivíduos resistentes, a frequência destes pode alcançar níveis elevados, comprometendo o controle dos insetos-alvo.

Os insetos-alvo das plantas transgênicas e que são naturalmente resistentes, podem sobreviver no campo e transmitir essa resistência para gerações futuras. Portanto, antecipando a possibilidade de seleção de insetos resistentes, estudos vêm sendo conduzidos para atenuar esse impacto, e foram desenvolvidas estratégias para o manejo da resistência. Evidentemente, todos os outros fatores que causam mortalidade das espécies-alvo como os inimigos naturais, desempenharão papel importante. Inerente à aplicação da tecnologia Bt, duas estratégias são preconizadas para o manejo da resistência: a expressão de alta dose da toxina na planta e o plantio de áreas de refúgio (MACHADO & FIÚZA, 2011).

2.3. Áreas de refúgio

Áreas de refúgio consistem na semeadura de um híbrido de milho não Bt, de igual porte e ciclo vegetativo similar ao do híbrido Bt da área semeada. O objetivo do refúgio é preservar a eficiência e, conseqüentemente, os benefícios da tecnologia do milho Bt, mantendo uma população de pragas-alvo sensível às proteínas inseticidas do milho Bt. No refúgio a praga-alvo terá condições de sobrevivência e reprodução e não será exposta à pressão de seleção da proteína inseticida expressa pela planta Bt, desde que não haja aplicação de inseticida químico. Sendo assim, existe a possibilidade de indivíduos da população de pragas do refúgio se acasalarem com qualquer indivíduo resistente que possa ter sobrevivido na lavoura de milho Bt, transmitindo a suscetibilidade para as próximas gerações das pragas-alvo (EMBRAPA, 2011).

A área de refúgio é realizada com a semeadura de pelo menos 10% da área total de milho cultivado, com o híbrido de milho não Bt, a uma distância máxima de 800 metros da área com milho Bt. Essas recomendações são no sentido de sincronizar os cruzamentos dos possíveis adultos sobreviventes na área de milho Bt com aqueles suscetíveis, emergidos na área de refúgio. Para áreas com dimensões acima de 800 m cultivadas com milho Bt, serão necessárias faixas de refúgio internas. Nessas áreas é permitida a utilização de outros métodos de controle de pragas, desde que não sejam utilizados bioinseticidas à base de Bt.

A partir disso, surgem várias questões: todos os produtores rurais plantam refúgio? As normas para o plantio e coexistência do milho Bt e não Bt são respeitadas? Será que a maneira como foi proposta o plantio do refúgio é eficiente para que haja o aparecimento de insetos que infestem essas áreas? Numa propriedade rural totalmente plantada com milho Bt, onde todos os vizinhos também o plantaram, há sobrevivência de lagartas para que estas infestem as áreas de refúgio? Uma pesquisa feita pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) afirma que o número de agricultores que não estão cumprindo as normas estabelecidas de plantio de refúgio

vem aumentando. Do ano de 1996 até 2005, mais de 90% dos agricultores cumpriam as normas. A partir de 2006, essa porcentagem começou a cair gradualmente e já no ano de 2008, 25% dos agricultores diziam não seguir mais as normas de plantio de refúgio (WEISE, 2009). Uma das explicações para este processo é a de que o plantio das áreas de refúgio onera os custos de produção, bem como o planejamento do plantio como um todo. Os produtores devem calcular a área a ser semeada com milho não Bt (bordas, faixas, etc.), parar a semeadura do milho Bt, limpar as caixas de sementes para que não haja contaminação, colocar as sementes não Bt e iniciar a semeadura novamente. Todas essas etapas, segundo os próprios agricultores, acabam colaborando para o não cumprimento das normas.

Na tentativa de solucionar esse problema, as principais empresas multinacionais produtoras de sementes de milho começaram a cogitar a possibilidade de misturar uma porcentagem de sementes não transgênicas diretamente nos sacos com sementes transgênicas (SILVEIRA, 2010). Esta parece ser uma solução simples para um problema antigo, e tal tecnologia foi denominada de refúgio no saco ("Refuge in the Bag" - RIB). Na realidade, essa tecnologia nunca foi utilizada pois os híbridos existentes no mercado exigiam uma área muito grande de refúgio, de pelo menos 10%. Como as sementes não transgênicas, misturadas no saco com as sementes transgênicas terão desempenho agrônômico muito inferior, pois serão atacadas pelos insetos sem receber nenhum inseticida, 10% é um prejuízo muito alto para os agricultores. Com a nova geração de transgênicos resistentes a insetos, que trazem duas proteínas Bt no mesmo híbrido, a necessidade de refúgio diminuiu para 5% da área. Considerando que os outros 95% da lavoura serão menos atacados ainda, acredita-se que a mistura sairá mais em conta para o agricultor do que plantar 5% de não transgênico à parte. Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) aprovou a utilização da tecnologia de refúgio no saco para a safra 2012, em híbridos com duas proteínas Bt. Mesmo assim, as empresas produtoras de sementes continuam conduzindo ensaios testando essa tecnologia, tanto nas versões transgênicas mais antigas (uma proteína Bt) quanto nas versões mais novas (duas proteínas Bt).

Algumas vantagens dessa nova tecnologia podem ser descritas: haverá um manejo simplificado do refúgio, não necessitando de técnicas diferentes para cada parte da lavoura; a solução virá em apenas um saco de sementes, evitando assim eventuais problemas que possam vir a ocorrer, como por exemplo, uma mistura na proporção errada das sementes; conveniência, já que o agricultor terá menos trabalho na organização do plantio; aumento da eficiência de plantio, proporcionando melhor aproveitamento do tempo e das condições de plantio no campo; certeza do cumprimento das normas de refúgio, pois as sementes de milho não Bt virão misturadas uniformemente no saco; menor perda de produtividade, pois haverá somente 5% de milho não Bt; afrouxamento na pressão de seleção de indivíduos resistentes, devido à redução no uso de inseticidas; e por último, há uma melhor distribuição do refúgio, proporcionado pela melhor distribuição das plantas não Bt ao longo da área cultivada, aumentando assim a chance das lagartas suscetíveis se cruzarem com as que possam ter adquirido resistência.

Segundo ONSTAD et al. (2011), o uso da mistura de sementes resultará numa tendência de os produtores ignorarem os aspectos do manejo integrado de pragas, crendo que aparentemente está tudo sob controle na lavoura, não realizando o monitoramento do nível de infestação das mesmas. Deve-se enfatizar também que pragas secundárias e inimigos naturais que não são alvo do milho Bt podem responder de maneira diferente, tanto no modelo de refúgio atual, como na mistura de sementes. Outra preocupação dos autores é que, conforme a utilização do refúgio em blocos e faixas for diminuindo, haverá também a diminuição do uso de inseticidas de solo, podendo haver um aumento nos níveis de infestação das pragas de solo. Por outro lado, a mistura de sementes aumenta o cumprimento das normas de utilização do refúgio, que pode ser considerado um ponto positivo.

Uma pesquisa feita com agricultores americanos aponta que no ano de 2009, cerca de 20% dos que plantaram milho transgênico não plantaram a área de refúgio, e que aproximadamente 90% estariam dispostos a usar a mistura de sementes não Bt no saco na proporção de 2 a 5%. No entanto, se a proporção de mistura for de 6 a 10%, o interesse cai para menos de 60% dos entrevistados (GRAY, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manejo experimental e tratamentos utilizados

O experimento foi realizado na área experimental da Fazenda da FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, situada a uma latitude de 21° 15' 22" S e longitude de 48° 18' 58" W, com altitude de 595 m, no ano agrícola 2010/2011. Foram utilizadas as sementes de quatro híbridos de milho simples precoces fornecidos pela empresa Monsanto do Brasil Ltda.: AG 7000YG (transgênico) e AG 7000 (convencional), DKB 390YG (transgênico) e DKB 390 (convencional).

O experimento foi constituído por sete tratamentos para cada híbrido (Tabela 1). Quatro tratamentos na forma de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), um imitando o refúgio convencional (Ref. Conv), um totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e um convencional não transgênico (Conv. não Bt). O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com 19 repetições. As parcelas experimentais foram de quatro linhas de 20 m de comprimento, espaçadas de 0,9 m entre linhas e 0,2 m entre plantas, representando uma população total aproximada de 55.555 plantas por hectare. As sementes transgênicas foram semeadas mecanicamente em sistema de plantio direto, e as não transgênicas foram semeadas manualmente (utilizando-se "matracas"), de acordo com as misturas de sementes estipuladas para cada tratamento. Não foi feita a aplicação de inseticidas químicos em nenhum momento da condução do experimento, e as plantas não transgênicas não foram identificadas na área. A adubação e os tratos culturais foram feitos conforme as recomendações técnicas para a cultura do milho (EMBRAPA, 1997).

Para garantir que houvesse infestação de *Spodoptera frugiperda* (Lagarta-do-cartucho) na área, foram feitas infestações artificiais de lagartas criadas no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP. As lagartas foram obtidas por meio da criação estoque,

mantidas em laboratório, alimentadas com dieta artificial (KASTEN JUNIOR et al., 1978). Foram soltas ao acaso na área cerca de 300 mariposas, aos 3, 5, 10 e 15 dias após o plantio (DAP).

Tabela 1. Tratamentos e respectivas porcentagens de sementes de milho utilizadas, dos híbridos AG 7000YG, AG 7000, DKB 390YG e DKB 390, para as misturas no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e totalmente convencional (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11.

TRATAMENTOS	PORCENTAGEM DE SEMENTE (%)			
	AG 7000YG	AG 7000 conv.	DKB 390YG	DKB 390 conv.
Mistura 2,5%	97,5	2,5	97,5	2,5
Mistura 5,0%	95,0	5,0	95,0	5,0
Mistura 7,5%	92,5	7,5	92,5	7,5
Mistura 10%	90,0	10,0	90,0	10,0
Ref. Conv. *	90,0	10,0	90,0	10,0
Yieldgard Bt	100	0	100	0
Conv. não Bt	0	100	0	100

* Simulando a condição do refúgio atualmente utilizado, plantado numa área adjacente a área com milho Bt.

3.2. Avaliações dos caracteres

Foram feitas avaliações visuais através da escala de notas de danos nas plantas e porcentagem de infestação nas espigas para *S. frugiperda*; porcentagem de infestação e porcentagem de dano nas espigas para *Helicoverpa zea* (Lagarta-da-espiga) e estimativas de produtividade de grãos corrigida para 13% de umidade ($t\ ha^{-1}$), conforme descrito a seguir.

As avaliações visuais para *S. frugiperda* foram realizadas segundo a escala de notas de danos nas plantas (Figura 1), adaptada de DAVIS et al. (1992). As plantas foram avaliadas aos 17, 24, 31 e 38 DAP. Foram avaliadas dez plantas na região central de cada linha das parcelas, não sendo necessariamente as mesmas plantas,

nas avaliações sucessivas. A nota de dano de cada parcela foi obtida pela média das quarenta notas individuais, em cada DAP.

As avaliações para porcentagem de infestação nas espigas de *S. frugiperda* e *H. zea* foram feitas em 10 espigas/linha/parcela para cada espécie de lagarta, totalizando 40 espigas, no estágio fenológico de grãos leitosos. Verificou-se a presença ou ausência das lagartas nas espigas e fez-se o cálculo das respectivas porcentagens de infestação, onde zero espigas com lagartas é igual a 0% de infestação e 10 espigas com uma ou mais lagartas em cada espiga é igual a 100% de infestação. As médias de cada parcela foram obtidas através da média das 40 espigas avaliadas.

Para o cálculo das porcentagens de dano de *H. zea* nas espigas, o processo foi semelhante, porém foram feitas estimativas visuais das porcentagens de dano em 10 espigas/linha/parcela, totalizando 40 espigas. As médias de cada parcela foram obtidas através da média das 40 espigas avaliadas.

Para as estimativas de produtividade ($t\ ha^{-1}$), colheram-se os 5 m centrais de cada uma das quatro linhas das parcelas, e posteriormente, a umidade dos grãos foi corrigida para 13%. A correção de umidade dos grãos foi efetuada empregando-se a fórmula $PC = P - (P \times U) / 0,87$. Nesta fórmula, U corresponde ao teor de umidade dos grãos, P é o peso de grãos não corrigido e PC o peso corrigido para 13% de umidade.

3.3. Análises estatísticas

As análises de variância (teste F) foram realizadas através do programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2008). Os dados em porcentagem foram transformados para $\arcsen\sqrt{\%/100}$. As médias foram comparadas pelo teste t, a 5% de probabilidade.



Nota 0: Sem danos



Nota 1: Com pontuações



Nota 2: Com pontuações e 1 a 3 lesões circulares



Nota 3: 1 a 5 lesões circulares, mais 1 a 3 lesões alongadas



Nota 4: 1 a 5 lesões circulares, mais 1 a 3 lesões alongadas



Nota 5: 1 a 3 lesões alongadas em até 2 folhas, mais 1 a 3 furos ou lesões alongadas



Nota 6: 1 a 3 lesões alongadas em 2 ou mais folhas, mais 1 a 3 furos em 2 ou mais folhas



Nota 7: 3 a 5 lesões alongadas em 2 ou mais folhas, mais 3 a 5 furos em 2 ou mais folhas



Nota 8: Mais que 5 lesões alongadas de todos os tamanhos e muitos furos na maioria das folhas



Nota 9: Muitas folhas praticamente destruídas

Figura 1. Escala de notas (0 a 9) para avaliação de danos de *Spodoptera frugiperda* no cartucho do milho (adaptada de DAVIS et al., 1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante ressaltar que em todos os tratamentos dos dois híbridos foi visualizada a presença de *Spodoptera frugiperda*, tanto nas plantas transgênicas como nas não transgênicas (Figura 2).

Os coeficientes de variação (CV %) foram considerados baixos para os dois híbridos em todos os dias após o plantio (DAP), com exceção das avaliações feitas aos 17 DAP, indicando alta precisão experimental (Tabela 2).

A avaliação do dano no cartucho pela escala de notas (0 a 9) possibilitou determinar a evolução e a intensidade do dano de *Spodoptera frugiperda* nos tratamentos avaliados para todos os dias após o plantio (Tabela 2). De maneira geral, todos os tratamentos nos dois híbridos mantiveram a mesma ordem em relação às notas de dano, em todos os DAP. O tratamento convencional não transgênico (Conv. não Bt) apresentou maior intensidade de dano, com notas de 2,95; 6,03; 7,94 e 7,99 para o híbrido AG 7000 convencional e notas de dano de 2,00; 6,00; 7,00 e 8,00 para o híbrido DKB 390 convencional, respectivamente, aos 17, 24, 31 e 38 dias após o plantio. Observa-se que aos 38 DAP, as notas dos dois híbridos para esse mesmo tratamento não diferem estatisticamente entre si, e que quando consideramos a primeira (17 DAP) e a última (38 DAP) avaliação, a nota de dano aumentou cerca de 2,7 vezes no híbrido AG 7000 e 4 vezes no DKB 390. Proporcionalmente, os demais tratamentos tiveram aumentos mais expressivos da primeira para a última avaliação, porém as notas de dano foram inferiores, representando uma menor intensidade de ataque da lagarta-do-cartucho nestes tratamentos (Tabela 2).

Foram observadas diferenças significativas nas notas de danos aos 38 DAP para quase todos os tratamentos dentro dos híbridos AG 7000YG e DKB 390YG (Tabela 2). Comparando-se os tratamentos entre os dois híbridos, percebe-se que houve diferença significativa, com exceção do tratamento convencional não transgênico (Conv. não Bt) e mistura 10%, inferindo que as intensidades de dano foram diferentes nos dois híbridos. No tratamento totalmente transgênico (Yieldgard Bt) os danos não progrediram, como

esperado, com notas de 3,88 e 3,38 para os híbridos AG 7000YG e DKB 390YG, respectivamente. Conforme escala de notas proposta por DAVIS et al. (1992), a nota 3 refere-se a plantas com lesões circulares a alongadas (Figura 1). Os baixos valores das notas de dano obtidos neste trabalho, para o tratamento totalmente transgênico, concordam com os registros existentes na literatura (WILLIAMS et al., 1997; BUNTIN et al., 2001; WAQUIL et al., 2002; FERNANDES et al., 2003).

Tabela 2. Notas de dano causadas por *Spodoptera frugiperda*, obtidas aos 17, 24, 31 e 38 dias após o plantio, nos híbridos de milho AG 7000YG e DKB 390YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11¹.

Tratamentos	Dias após o plantio							
	17		24		31		38	
	AG7000YG	DKB390YG	AG7000YG	DKB390YG	AG7000YG	DKB390YG	AG7000YG	DKB390YG
Conv. não Bt	2,95 aA	2,00 bA	6,03 aA	6,00 aA	7,94 aA	7,00 bA	7,99 aA	8,00 aA
Mistura 10%	1,32 aBC	0,74 bC	3,37 bB	3,63 aB	4,39 aB	4,71 bB	5,41 aB	5,24 aB
Ref. Conv.	1,51 aB	0,99 bB	3,23 aBC	3,43 aBC	4,45 aB	4,53 aCB	5,10 aC	4,75 bC
Mistura 7,5%	1,22 aCD	0,78 bC	2,96 bCD	3,34 aC	4,19 aBC	4,37 aC	4,90 aC	4,51 bD
Mistura 5,0%	1,24 aCD	0,67 bCD	2,92 bD	3,25 aC	3,99 aCD	4,01 aD	4,55 aD	4,16 bE
Mistura 2,5%	1,12 aCD	0,63 bCD	2,62 bE	2,94 aD	3,73 aD	3,57 aE	4,16 aE	3,69 bF
Yieldgard Bt	1,02 aD	0,53 bD	2,42 bE	2,81 aD	3,38 aE	3,41 aE	3,88 aF	3,38 bG
C.V (%)	25,00	32,73	12,93	9,71	9,72	7,86	7,97	6,38

¹ Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t ($P > 0,05$), para cada época de avaliação.

Considerando o tratamento que imitou o refúgio convencional (Ref. Conv.) aos 38 DAP (Tabela 2), pode-se observar que este não difere estatisticamente do tratamento mistura 7,5% (nota 4,90) no híbrido AG 7000YG (nota 5,10), porém estes tratamentos diferem estatisticamente no híbrido DKB 390YG (nota 4,75 e 4,51). Estes tratamentos nos dois híbridos tiveram maior infestação do que todos os outros tratamentos onde se utilizou a mistura de sementes, com exceção do tratamento mistura 10% nos dois híbridos. SILOTO (2002), avaliando danos de lagarta-do-cartucho em 12 cultivares de milho não transgênicos, verificou que em Florínea, no estágio de 6 a 8 folhas, a nota de dano média foi de 4,8.



Figura 2. Presença de *Spodoptera frugiperda* em plantas não transgênicas nos tratamentos com mistura de sementes.

O híbrido AG 7000YG aos 38 dias após o plantio apresentou uma maior intensidade de ataque de *S. frugiperda* quando comparado ao híbrido DKB 390YG, com exceção apenas do tratamento convencional não transgênico. Quando se observa o tratamento Mistura 10%, percebe-se que este foi mais infestado do que todos os outros tratamentos, com exceção apenas do tratamento convencional não transgênico. Este fato confirma a afirmação de que se fosse utilizada uma proporção de 10% de mistura de sementes não transgênicas, seria uma quantia muito alta e poderia ocasionar em uma maior perda para os agricultores (SILVEIRA, 2010). Portanto, quando se utilizou uma mistura de sementes com uma porcentagem de 2,5% ou 5,0%, foi observado menor intensidade de dano nas plantas, e o mais importante, detectou-se a presença de lagartas nas plantas não transgênicas (Figura 3).

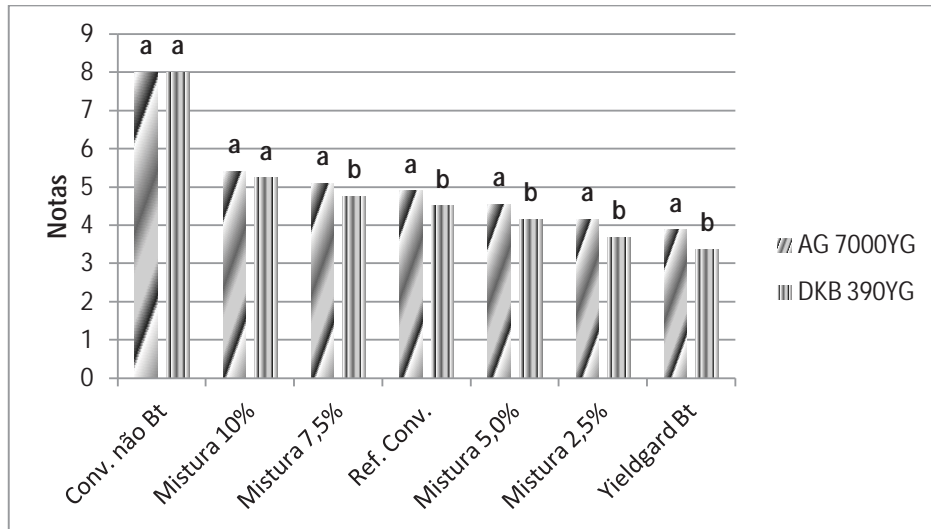


Figura 3. Comparação das escalas de notas de dano acumuladas causadas por *Spodoptera frugiperda*, obtidas aos 38 dias após o plantio nos híbridos de milho AG 7000YG e DKB 390YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11.

Numa área de refúgio convencional, onde o milho não é transgênico, a chance de sobrevivência e multiplicação da lagarta-do-cartucho é muito alta, uma vez que ela não ingere a toxina ao se alimentar das plantas. Portanto, a praga pode completar vários ciclos durante o ciclo da cultura. Por sua vez, quando se utiliza mistura de sementes, somente as lagartas que acertarem ao acaso as plantas não transgênicas sobreviverão, uma vez que não há evidências de que as mesmas conseguem distinguir as folhas de milho Bt e não Bt com base nos compostos voláteis das plantas, porém apresentam não-preferência para alimentação em milho Bt quando submetidas ao contato físico com o hospedeiro (COSTA et al., 2009; MENDES et al., 2011). As toxinas Bt são deterrentes para as larvas de lepidópteros, e essas larvas são capazes de evitar plantas com toxinas Bt em caso de existência de áreas de refúgio próximas. No entanto, as larvas nos primeiros ínstares são mais sensíveis aos efeitos da toxina, o que reduz a migração de larvas do milho Bt para o não Bt (DUTTON et al., 2005). Desta forma, a mistura de sementes proporciona ao mesmo tempo um controle satisfatório da praga e

a sobrevivência de uma quantidade de indivíduos suscetíveis que possam se reproduzir, diminuindo a pressão de seleção a favor de indivíduos resistentes, contribuindo com as práticas de MIP e MRI.

Os coeficientes de variação (CV %) para as médias de produtividade também foram considerados baixos, indicando uma alta precisão experimental (Tabela 3). As médias para o híbrido DKB 390YG foram maiores em comparação com o híbrido AG 7000YG, sendo que, os dois tratamentos que apresentaram a maior quantidade de plantas não transgênicas (Ref. Conv e Conv. não Bt), foram os que menos produziram (Figura 4).

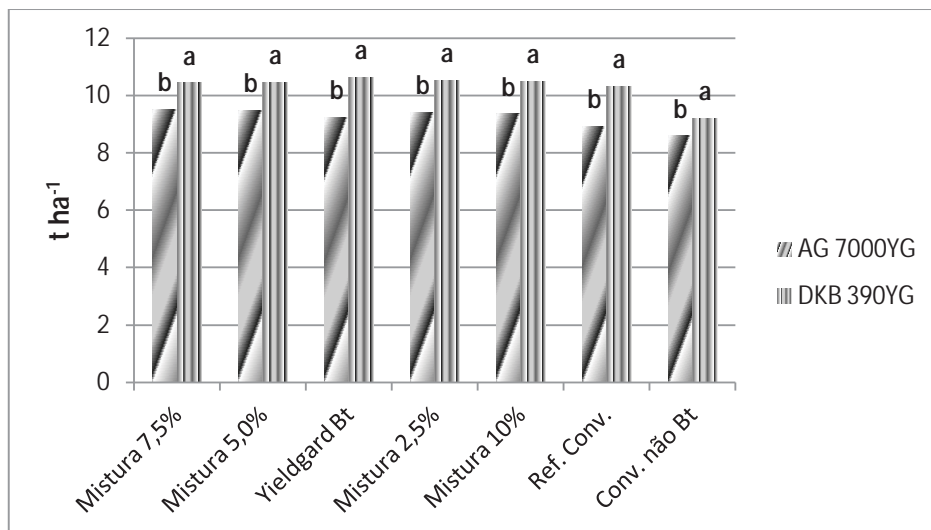


Figura 4. Comparação das médias de produtividade ($t\ ha^{-1}$) nos híbridos de milho AG 7000YG e DKB 390YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11.

As médias de todos os tratamentos no DKB 390YG não diferiram estatisticamente entre si, com exceção do tratamento convencional não transgênico (Conv. não Bt). A maior média obtida foi a do tratamento totalmente transgênico (Yieldgard Bt) com $10,63\ t\ ha^{-1}$, produzindo cerca de 13% a mais que o tratamento convencional não transgênico ($9,20\ t\ ha^{-1}$). As produtividades dos tratamentos com mistura de sementes variaram de $10,43\ t\ ha^{-1}$ (mistura 7,5%) a $10,53\ t\ ha^{-1}$ (mistura

2,5%). O tratamento que imitou o refúgio convencional (Ref. Conv.) apresentou menor média (10,30 t ha⁻¹) que os tratamentos com mistura de sementes, porém não diferiram estatisticamente (Tabela 3).

Para o híbrido AG 7000YG, os tratamentos mais produtivos foram o de mistura 7,5%, com média de 9,50 t ha⁻¹ e o de mistura 5,0%, com média de 9,47 t ha⁻¹, diferindo estes estatisticamente apenas do tratamento que imita o refúgio convencional (Ref. Conv) e do tratamento convencional não transgênico (Conv. não Bt) (Tabela 3). Estes dois últimos foram os tratamentos menos produtivos, com médias de 8,92 e 8,58 t ha⁻¹, respectivamente (Tabela 3). A variação de produtividade do tratamento menos produtivo (Conv. não Bt) para o mais produtivo (mistura 7,5%) foi de cerca de 10%.

Tabela 3. Médias de produtividade (t ha⁻¹) nos híbridos de milho DKB 390YG e AG 7000YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11¹.

Tratamentos	HÍBRIDOS	
	DKB390YG	AG7000YG
Mistura 7,5%	10,43 aA	9,50 bA
Mistura 5,0%	10,46 aA	9,47 bA
Yieldgard Bt	10,63 aA	9,24 bAB
Mistura 2,5%	10,53 aA	9,41 bAB
Mistura 10%	10,49 aA	9,35 bAB
Ref. Conv.	10,30 aA	8,92 bBC
Conv. não Bt	9,20 aB	8,58 bC
CV (%)	6,49	8,86

¹ Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t ($P > 0,05$).

Os resultados apontam que, independentemente da proporção de mistura utilizada e dos danos causados, a produtividade nos tratamentos com mistura de sementes e de refúgio convencional não diferiu estatisticamente no híbrido DKB 390YG. Por sua vez, no híbrido AG 7000YG as proporções de mistura de 5 e 7,5% diferem estatisticamente do método de refúgio convencional

Para que um híbrido transgênico expresse todo o seu potencial, recomenda-se a aplicação de inseticidas como medida adicional de controle, quando 20% das plantas atingirem a nota de dano 4 (LOURENÇÃO et al., 2009). Apesar das intensidades de dano terem sido estatisticamente diferentes em quase todos os tratamentos, as médias de produtividade praticamente não diferiram entre si. Sendo assim, mesmo nos tratamentos com notas de dano superiores a 4 (lesões circulares pequenas, lesões alongadas e pequenos furos circulares), não haveria a necessidade de se aplicar inseticidas. Assim, o custo de produção não seria aumentado e, também, não se aumentaria a pressão de seleção de indivíduos resistentes. Logo, devem ser feitos mais estudos sobre qual o nível de controle ideal caso a mistura de sementes no saco (Tecnologia de Refúgio no Saco) seja adotada pelas empresas produtoras de sementes de milho.

O efeito no percentual de espigas infestadas por *S. frugiperda* e *H. zea*, e porcentagem de dano nas espigas causadas por *H. zea* podem ser observados na Tabela 4. Os coeficientes de variação (CV %) foram considerados altos, com exceção da característica porcentagem de dano para *H. zea*. Este fato pode ser considerado normal quando se trabalha com dados em porcentagem (Tabela 4).

O percentual de espigas infestadas (INFS) por *S. frugiperda* para o híbrido AG 7000YG variou de 4,16% a 12,69% para os tratamentos Mistura 5% e convencional não transgênico (Conv. não Bt), respectivamente. Este último não difere estatisticamente dos tratamentos com proporções de mistura de 2,5 e 10%, e do tratamento que imita o refúgio convencional (Ref. Conv.).

Tabela 4. Valores médios de porcentagem de infestação na espiga causada por *Spodoptera frugiperda* (INFS), porcentagem de infestação na espiga causada por *Helicoverpa zea* (INFH), porcentagem de dano na espiga causada por *Helicoverpa zea* (DANH), nos híbridos de milho AG 7000YG e DKB 390YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11¹.

Tratamentos	INFS		INFH		DANH	
	AG7000YG	DKB390YG	AG7000YG	DKB390YG	AG7000YG	DKB390YG
Conv. não Bt	12,69 aA	5,29 bA	45,4 aA	59,1 aA	0,88 aA	1,83 aA
Ref. Conv.	8,48 aAB	2,97 bA	40,8 aAB	36,5 aAB	0,74 aAB	0,87 aAB
Mistura 10%	8,48 aAB	4,89 aA	24,7 aAB	54,4 aA	0,52 aAB	1,11 aAB
Mistura 2,5%	5,49 aAB	6,37 aA	21,2 aAB	28,2 aAB	0,51 aAB	0,51 aBC
Mistura 7,5%	5,29 aB	6,15 aA	6,85 aB	21,2 aAB	0,40 aAB	0,63 aBC
Yieldgard Bt	4,67 aB	5,34 aA	24,6 aAB	9,09 aB	0,61 aAB	0,35 aBC
Mistura 5,0%	4,16 aB	5,29 aA	11,6 aAB	9,31 aB	0,27 aB	0,21 aC
C.V (%)	72	67	63	54	19	29

¹ Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste t ($P > 0,05$), para cada característica avaliada. ANAVA de dados em porcentagem transformados para $\arcsen\sqrt{\%/100}$.

Os tratamentos que apresentaram menores porcentagens de infestação foram o totalmente transgênico (Yieldgard Bt), com 4,67%, e os tratamentos com proporções de mistura de 5 e 7,5%, com 4,16 e 5,29%, respectivamente, sendo que estes não diferem estatisticamente entre si. Já para o híbrido DKB 390YG, observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados. Quando se comparam os mesmos tratamentos entre os dois híbridos, nota-se que, com exceção do tratamento convencional não transgênico e refúgio convencional, os demais tratamentos sofreram infestações semelhantes, e não diferentes estatisticamente entre si. MICHELOTTO et al. (2011) observaram que para os híbridos de milho não Bt a porcentagem de espigas com danos da lagarta na espiga foi de 15,25%, enquanto que nos híbridos Bt a porcentagem foi de 8,25%.

O percentual de espigas infestadas (INFH) causadas por *Helicoverpa zea* (Lagarta-do-espiga) não apresentou diferenças significativas quando se compara os dois híbridos utilizados, ou seja, os dois híbridos tiveram a mesma intensidade de

infestação de espigas (Tabela 4). Para o híbrido AG 7000YG, a infestação variou de 6,85% a 45,4%, para os tratamentos Mistura 7,5% e convencional não transgênico (Conv. não Bt), respectivamente, e somente estes dois foram estatisticamente diferentes. Quando se compara os tratamentos de mistura de sementes com o tratamento de refúgio convencional, pode se observar que nenhum tratamento foi significativamente diferente. Dentro do híbrido DKB 390YG os tratamentos convencional não transgênico (Conv. não Bt) e Mistura 10% foram mais infestados que o totalmente transgênico e Mistura 5%, com valores de 59,1% e 54,4%, respectivamente. Os com menores intensidades de infestação foram os tratamentos totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e Mistura 5%, com valores de 9,09 e 9,31, respectivamente. Os demais tratamentos com mistura de sementes apresentaram valores intermediários de porcentagem de infestação de espigas.

A alta infestação de espigas pela lagarta-da-espiga em alguns tratamentos não refletiu no tamanho dos danos ocasionados. Na Tabela 4, podem ser observados os valores referentes às porcentagens de dano (DANH) causadas por *H. zea*. Para o híbrido AG 7000YG os únicos tratamentos significativamente diferentes são o convencional não transgênico (Conv. não Bt), com a maior porcentagem de dano, e Mistura 5%, com a menor, com valores de 0,88% e 0,27%, respectivamente. No híbrido DKB 390YG, a maior nota de dano foi a do tratamento convencional não transgênico, com 1,83% das espigas danificadas. Este tratamento não difere significativamente dos tratamentos Mistura 10% e refúgio convencional, com valores de 1,11 e 0,87%. O tratamento Mistura 5% possuiu a menor porcentagem de dano na espiga (0,21%), e não difere estatisticamente dos tratamentos totalmente transgênico (Yieldgard Bt), Mistura 2,5 e 7,5%.

Os percentuais de ataque de *H. zea* observados nesse estudo discordam parcialmente dos resultados encontrados por BUNTIN (2008), quanto ao milho convencional, no qual encontrou praticamente 100% das espigas atacadas por essa espécie. Porém, os resultados concordam quanto ao fato do percentual de ataque de *H. zea* ter sido menor no milho Bt, do que no convencional.

A pequena diferença entre o valor do dano de *H. zea* em milho convencional, Bt, e nas misturas de sementes está de acordo com os resultados obtidos por CASTRO (2002). Este autor não observou diferenças entre milho convencional e Bt no que diz respeito ao dano, especialmente em condições de alta infestação dessa espécie. A pequena diferença também pode ser explicada pelos resultados de CHILCUTT et al. (2007), que encontraram lagartas de terceiro e quarto ínstar em densidades semelhantes no milho convencional e no Bt, o que indica, segundo esses autores, que as lagartas de quinto ínstar, que causam menos da metade dos prejuízos, são afetadas pela toxina Bt tardiamente. Portanto, algumas lagartas podem ter chegado até ínstar mais avançados, para só posteriormente morrerem, já tendo assim causado as injúrias.

Ao se observar as Figuras 5, 6 e 7, nota-se que os tratamentos em ambos os híbridos não apresentam um grau de similaridade quanto à ordem e quanto às proporções de mistura utilizadas, como acontece com os dados de produtividade da Figura 4. Não houve um híbrido que fosse mais infestado que o outro ou então com valores similares para os mesmos tratamentos. Logo, as proporções de mistura não interferiram no nível de infestação e de danos ocasionados tanto pela *S. frugiperda* como pela *H. zea*. Essa variação provavelmente foi devida a outros fatores, como por exemplo, interações entre planta, praga e ambiente, e intensidades de infestação diferentes nas micro-regiões do experimento. Vale ressaltar novamente que há a presença de lagartas vivas em diferentes ínstar em toda a área, e que estas localizaram as plantas não transgênicas em todos os tratamentos com porcentagens de misturas (Figura 2).

Portanto, a escolha da proporção de sementes para a implantação da Tecnologia de Refúgio no Saco deve ser feita com base na sobrevivência e reprodução das pragas na lavoura. Todavia, ainda existe a necessidade de se realizar estudos focando principalmente a biologia e o ciclo de vida das principais pragas do milho, verificando como estas se comportam quando a Tecnologia de Refúgio no Saco é utilizada. Dessa forma poderá se chegar a uma conclusão se as pragas se reproduzem de forma satisfatória.

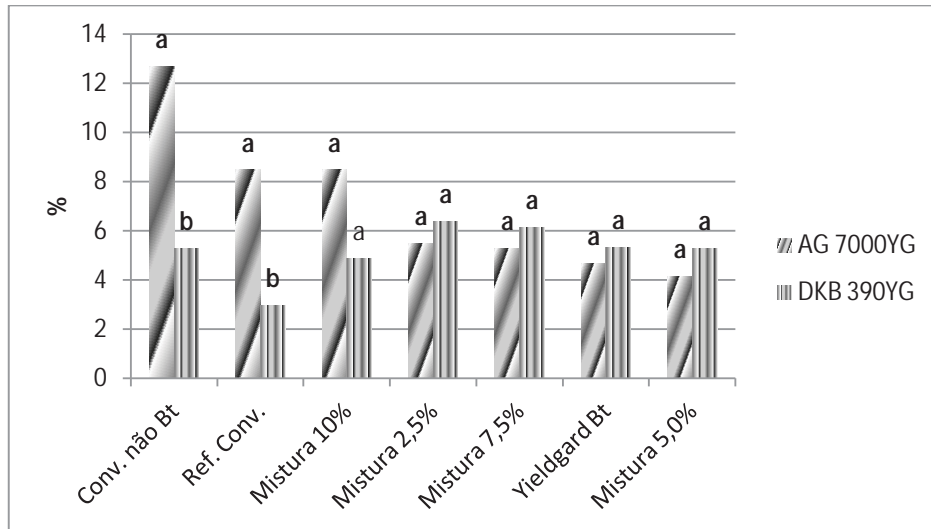


Figura 5. Comparação das porcentagens de infestação na espiga causadas por *Spodoptera frugiperda*, nos híbridos de milho AG 7000YG e DKB 390YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11.

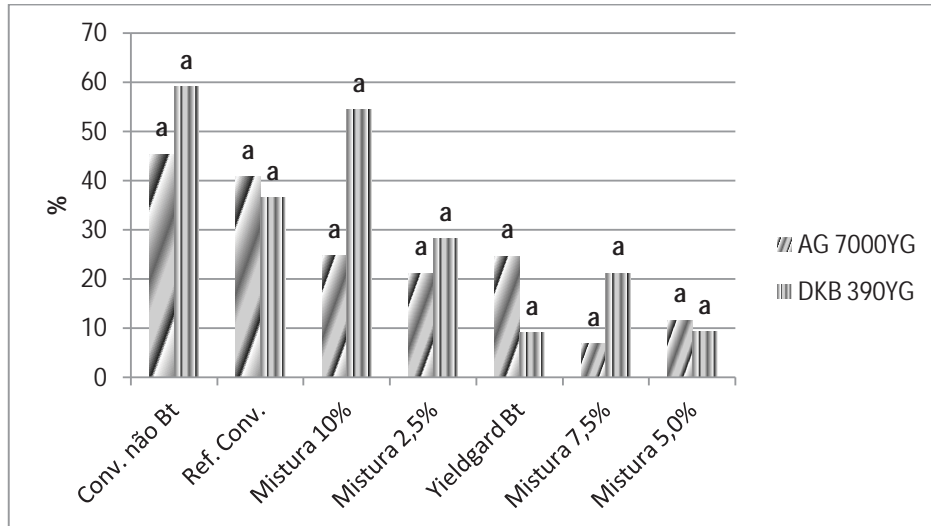


Figura 6. Comparação das porcentagens de infestação na espiga causadas por *Helicoverpa zea*, nos híbridos de milho AG 7000YG e DKB 390YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11.

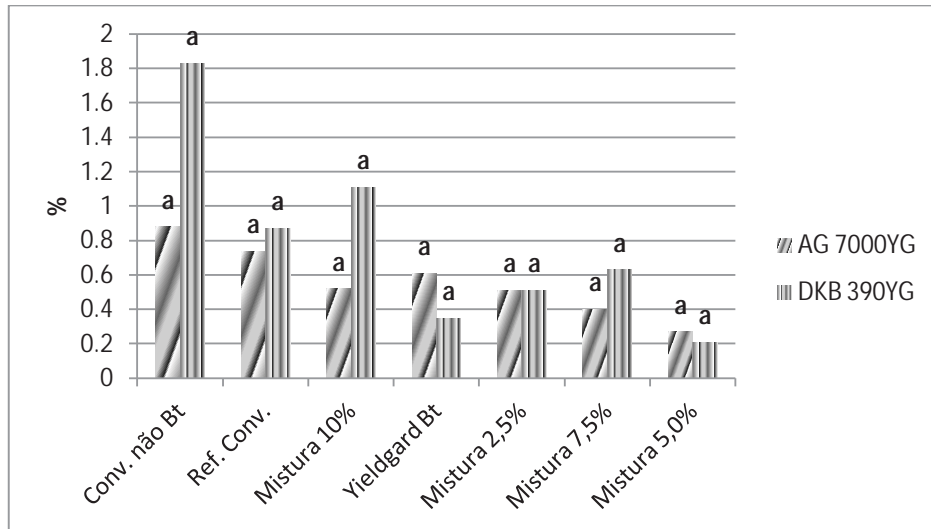


Figura 7. Comparação das porcentagens de dano na espiga causadas por *Helicoverpa zea*, nos híbridos de milho AG 7000YG e DKB 390YG, nos tratamentos com as porcentagens de mistura no saco de sementes não transgênicas com as transgênicas (Mistura 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), refúgio convencional (Ref. Conv.), totalmente transgênico (Yieldgard Bt) e convencional não transgênico (Conv. não Bt). Jaboticabal, SP, 2010/11.

5. CONCLUSÕES

As proporções de mistura não apresentam influência nas porcentagens de infestação e de dano na espiga ocasionadas por *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*.

As lagartas localizam as plantas não transgênicas e nelas sobrevivem nos tratamentos de refúgio no saco, em todas as proporções testadas.

A tecnologia de Refúgio no Saco proporciona um menor uso de inseticidas químicos na lavoura, diminui a pressão de seleção a favor do aparecimento de insetos-alvo resistentes, e conseqüentemente, diminui o risco de contaminação ambiental.

A tecnologia de Refúgio no Saco é uma alternativa interessante e que deve ser considerada para substituir o método de refúgio convencional utilizado atualmente, na tentativa de retardar a evolução da resistência ao Bt nas principais pragas da cultura do milho.

6. REFERÊNCIAS

ARGENTA, G.; SANGOLI, L.; SILVA, P. R. F. Potencial de rendimento de grãos de milho em dois ambientes e cinco sistemas de produção. **Scientia Agrária**, v.4, p.27-34, 2003.

BOURGUET, D.; DESQUILBET, M.; LEMARIE, S. Regulating insect resistance management: the case of non-Bt corn refuges in the US. **Journal of Environmental Management**, v.76, n.3, p. 210-220, 2005.

BUNTIN, G. D. Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 4, p. 523-530, 2008.

BUNTIN, G. D.; LEE, D.; WILSON, D. M.; McPHERSON, R. M. Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. **Florida Entomologist**, v. 84, n. 1, p. 37-42, 2001.

CASTRO, B. A. **Evaluation of *Bacillus thuringiensis* transgenic field corn for management of Louisiana corn pests**. 2002. 190 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Department of Entomology, Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University, Baton Rouge.

CÉLERES. **Relatório Biotecnologia: 1º acompanhamento da adoção da biotecnologia na safra 2011/12**. Uberlândia, 09 p, 2011.

CHILCUTT, C. F. et al. Effects of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn on corn Earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) densities. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 2, p. 327-334, 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos: primeiro levantamento, janeiro 2012**. Brasília, 40p, 2012.

COSTA, M. C. A; MENDES, S. M.; WAQUIL, M. S.; BOREGAS, K. G. B; FERMINO, T. C.; LOPES, M. E.; WAQUIL, J. M. Avaliação da não - preferência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) entre híbridos de milho Bt e não Bt. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 4, São Lourenço. **Anais**. EMBRAPA MILHO E SORGO, 2009.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica 21, 45p, 1995.

CRUZ, I. Manejo de Pragas da Cultura de Milho. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA. Barretos, SP. **Cursos para agricultores**. Campinas: CATI/IAC/IEA, p.27-56, 1999.

CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS C. A. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal. v.25, n.2, p.293-297, 1996.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Yield impact of larval infestation of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) to mid-whorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.76, n.5, p.1052-1054, 1983.

DAVIS, F. M.; NG, S. S.; WILLIAMS, W. P. **Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworm**. Mississippi: Agricultural and Forest Experiment Station, 1992. 9p. (Technical Bulletin, 186).

DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, v.114, p.161-169, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Áreas de Refúgio – Recomendações de uso para o plantio de milho transgênico Bt**. Sete Lagoas, MG, 2011. 04p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Recomendações técnicas para a cultura do milho**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1997. 204p.

FERNANDES, O.; PARRA, J. R. P.; NETO, A. F.; PÍCOLI, R.; BORGATTO, A. F.; DEMÉTRIO, C. G. B. Efeito do milho geneticamente modificado mon810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.2, n.2, p.25-35, 2003.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501-533, 2002.

FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/technology**, London, v.5, p.807-813, 1987.

GRAY, M. **Establishment of Refuges Critical in Maintaining Long-Term Durability of Bt Hybrids**. University of Illinois, The Bulletin, Issue No. 2, article 1. April 9, 2010.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.3, p.1085-1089, 2001.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v.53, p.242-255, 1989.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010**. ISAAA Brief No. 42. ISAAA: Ithaca, NY, 2010. 30p.

KASTEN JUNIOR, A.A.; PRECETTI, C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v.53, n.1-2, p.68-78, 1978.

LEMESLE, V.; MAILLERET, L., VAISSAYRE M. Role of spatial and temporal refuges in the evolution of pest resistance to toxic crops. **Acta Biotheoretica**, n 58, p.89-102, 2010.

LERECLUS, D. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. **Bulletin de I.Institut Pasteur**, Paris, v.86, p.337-371, 1988.

LOURENÇÃO, A. L. F.; BARROS, R.; MELO, E. P. de. Milho Bt: Uso Correto da Tecnologia. **Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Culturas de Inverno**. Maracaju: Fundação MS, 2009. p. 79-89.

MACHADO, D.; FIÚZA, L. M. Manejo da Resistência: Na era das plantas transgênicas. **Oecologia Australis**, v.15, n.2, p.291-302, 2011.

MATRANGOLO, W. J. R. **Associações entre artrópodos nos estilos-estigma e nas espigas de milho (*Zea mays*), enfatizando *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 1995. 71p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

MICHELOTTO, M. D.; FINOTO, E. L.; MARTINS, A. L. M.; DUARTE, A. P. Interação entre transgênicos (Bt) e inseticidas no controle de pragas-chave em híbridos de milho-safrinha. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.1, p.71-79, 2011.

ONSTAD, D.W.; MITCHELL, P.D.; HURLEY, T.M.; LUNDGREN, J.G.; PORTER, R.P.; KRUPKE, C.H.; SPENCER, J.L.; DIFONZO, C.D.; BAUTE, T.S.; HELLMICH, R.L.; BUSCHMAN, 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**, v. 104(2), p.343-352, 2011.

PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. Transformação genética de plantas. In: FREITAS, L.B.; BERED F. (Eds). **Genética Vegetal**. Porto Alegre : UFRGS, 2002.

PATERNIANI, E.; NASS, L.L.; SANTOS, M.X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil – uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: Udry, C.V.; Duarte, W. (Org.). Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos. Brasília: Ed. Paralelo 15, p.11-41, 2000.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.15, p.173-177, 1997.

SAS INSTITUTE. SAS OnlineDoc, Version 9.1.3, **SAS Institute**, Cary, NC, 2008.

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.78, p.2893-2897, 1981.

SIEGEL, J.P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.77, p.13-21, 2001.

SILOTO, R. C. **Danos e biologia de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SILVEIRA, L. Monsanto vai usar semente comum na lavoura transgênica. Brasil Econômico. 2010. Disponível em: <http://www.brasileconomico.com.br/noticias/monsanto-vai-usar-semente-comum-na-lavoura-transgenica_76248.html>. Acesso em: 23 de outubro de 2010.

TSUNECHIRO, A.; OLIVEIRA, M. D. M.; FURLANETO, F. P. B.; DUARTE, A. P. Análise técnica e econômica de sistemas de produção de milho safrinha, região do Médio Paranapanema, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.36, n.9, 2006.

USSAMI, A.J. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Milho e Sorgo - Histórico. In: **Contribuições das Câmaras Setoriais e Temáticas à Formulação de Políticas Públicas e Privadas para o Agronegócio**. Vilela, D.; Araújo, P.M.M. (Org.). Brasília: MAPA/SE/CGAC, 2006.

WAQUIL, J. M. Introdução dos híbridos Bt: uma revolução no Manejo Integrado de Pragas na cultura do milho. **Jornal Eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo**. Sete Lagoas – MG. Ano 3, Ed. 14, 2009.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2002.

WEISE, E. **Farmers growing genetically engineered corn break rules**. Usa Today. 2009. Disponível em: <http://www.usatoday.com/tech/science/2009-11-05-genetically-engineered-corn_N.htm>. Acesso em: 24 de outubro de 2010.

WILLIAMS, W. P.; SAGERS, J. B.; HANTEN, J. A.; DAVIS, F. M.; BUCKLEY, P. M. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. **Crop Science**, v. 37, p. 957-962, 1997.