

ANA LAURA FAVORETO

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM HÍBRIDOS DE MILHO GENETICAMENTE
MODIFICADO SOB AÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO E INFESTAÇÃO DE
Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Botucatu

2017

ANA LAURA FAVORETO

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM HÍBRIDOS DE MILHO GENETICAMENTE
MODIFICADO SOB AÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO E INFESTAÇÃO DE
Spodoptera frugiperda J. E. SMITH, 1797 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Proteção de Plantas.

Orientadora: Regiane Cristina Oliveira de
Freitas Bueno

Coorientador: Thiago Assis Rodrigues
Nogueira

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F275e Favoreto, Ana Laura, 1992-
Expressão de proteínas em híbridos de milho geneticamente modificado sob ação de estresse hídrico e infestação de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae)/ Ana Laura Favoreto. - Botucatu : [s. n.], 2017
64 p. : fots. color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2017
Orientador: Regiane Cristina Oliveira de Freitas
Bueno
Coorientador: Thiago Assis Rodrigues Nogueira
Inclui bibliografia

1. Milho - Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos. 2. Desidratação (Hídrica). 3. Estresse vegetal. 4. Pragas - Controle. I. Bueno, Regiane Cristina Oliveira de Freitas. II. Nogueira, Thiago Assis Rodrigues. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte."

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

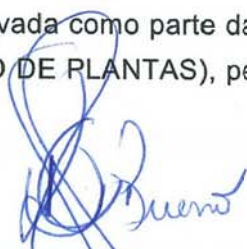
TÍTULO: "EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM HÍBRIDOS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO
SOB AÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO E INFESTAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)"

AUTORA: ANA LAURA FAVORETO

ORIENTADORA: REGIANE CRISTINA OLIVEIRA DE FREITAS BUENO

COORIENTADOR: THIAGO ASSIS RODRIGUES NOGUEIRA

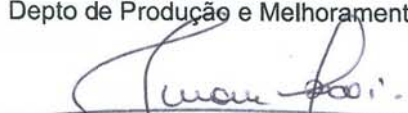
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. REGIANE CRISTINA OLIVEIRA DE FREITAS BUENO
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu



Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA
Depto de Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP



Profa. Dra. SIMONE DE SOUZA PRADO
./ Meio Ambiente/ Embrapa

Botucatu, 21 de fevereiro de 2017.

Ao meu amado avô Angelo (in memoriam)
Por ter me ensinado a enxergar a singela beleza de um cafezal em flor,
Aflorando assim meu amor pela agricultura.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus grandes incentivadores,
meus amadíssimos pais, Sandra e Laudir;

Minha querida grande irmã-amiga e exemplo, Julia e ao meu cunhado Thales;

Ao Murilo “amor, meu grande amor”!

Aos meus admirados mestres e professores, por dividirem o conhecimento:

Profa. Dra. Regiane C. de Freitas Bueno por me orientar e auxiliar em toda essa
trajetória desde 2013;

Prof. Dr. Carlos Gilberto Raetano e Prof. Antônio Carlos Maringoni pelo apoio
estrutural, para realização desse trabalho;

Prof Dr. Edilson Ramos, fera da irrigação, que me mostrou que esse caminho não é
tão árduo quanto pensava,

Prof. Dr. Thiago, pelos conselhos, boas conversas e todo suporte para realização
desse trabalho,

Ao técnico Marcelinho Soman por todos os ensinamentos e prática, todas as horas e
horas desprendidas e dedicadas ao meu trabalho, além do bom humor diário e
laboratório alto astral,

Aos companheiros da equipe AGRIMIP por todas conversas de cunho científico,
trabalhos e amizade.

Aos amigos João Paulo P. Paes, João (Bactéria) César da Silva, Nádia Maebara
Bueno, Felipe “Guandu”, Bruna M. Favetti, Lucas Domingos Miranda, Leandro
Bianchi, Joáz Dornelles e Thiago Ferreira pelas parcerias durante as disciplinas,
cafés, momentos de descontração na padaria, todas as conversas e desabafos, pois
se não houvesse vocês para me encorajar a continuar, o fardo não se tornaria mais
leve.

Aos amados amigos que estão longe, mas perto do coração, Yuri Kacuta Corrêa e
Rafa Tomazini, por tudo!

A Faculdade de Ciências Agronômicas por ser minha segunda casa, por todos que
fazem parte dessa e contribuíram com a formação do meu caráter como profissional.

Ao CNPq grande financiador desse projeto.

Enfim, ao início de uma nova fase!!

“Quando os ventos de mudança sopram, umas pessoas levantam barreiras,
Outras constroem moinhos de vento”

Érico Veríssimo

RESUMO

As mudanças climáticas previstas para os próximos anos indicam incremento na temperatura em 1,4°C a 5,8°C em decorrência, principalmente, do aumento da concentração dos gases de efeito estufa, além de alterações na umidade relativa e taxas de CO₂ da atmosfera terrestre. Essa mudança influenciará diretamente nos regimes de chuvas, promovendo veranicos e/ou excessos em determinadas regiões. Dessa forma, o objetivo da dissertação foi avaliar os efeitos do estresse hídrico em plantas de milho *Bt* sob situações de estresse frente ao ataque de *S. frugiperda*. O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial triplo em blocos casualizados com quatro lâminas de irrigação (estimadas a partir da tensão do solo): L1- 50% da capacidade de campo (CC) considerada estresse severo, L2- 75% CC estresse moderado, L3- 100% CC controle e L4-125% CC excesso de água; três eventos de milho: PowerCore® (Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-ESPS), Herculex® (Cry1F PAT) e Optimum® Intrasect® (Cry1Ab Cry1F PAT CP4-EPSPS) e três infestações (sem infestação, população *S. frugiperda* suscetível ao milho *Bt* e população *S. frugiperda* resistente ao *Bt*). Quando as plantas atingiram o estágio fenológico de V8 (fase considerada mais suscetível ao ataque de *S. frugiperda* e de maior atuação dos mecanismos de ativação de sistema enzimático) foram infestadas artificialmente, por 24h e após este período folhas do terço médio da planta foram coletadas para análise enzimática. Os híbridos que ficaram sob estresses hídricos apresentaram o desenvolvimento menor quando comparados com os demais estudados, por outro lado as análises e determinações de enzimas foram realizadas em laboratório, sendo não significativa para Polifenoloxidase e Fenilalanina-amônia-liase. Significativa para Peroxidase em fatores isolados (água, infestação e milho); interações duplas para Superóxido-dismutase (milho e infestação) e interação tripla para Fenóis (milho e infestação e lâmina de água). As altas taxas das enzimas peroxidase e superóxido dismutase diminuíram as atividades das proteínas, significando que sob estresse as plantas deixam a síntese de proteínas para realizar hidrólise para combater as espécies reativas de oxigênio (ERO's), a produção de proteínas é de extrema significância pois coloca em risco a tecnologia voltada para o controle de lagartas.

Palavras-chaves: enzimas antioxidantes, *Zea mays* L., lagarta-do-cartucho, estresse.

ABSTRACT

The climate changes foreseen for the next years show an increase in temperature of 1.4°C to 5.8°C, mainly due to the increase in the concentration of greenhouse gases, besides relative humidity alterations and CO₂ rates changes of the Earth's atmosphere. This change will directly influence rainfall regimes, promoting summer and / or excess in certain regions. Thus, the objective of the dissertation was to evaluate the effects of water stress in *Bt* maize plants under stress situations facing the attack of *S. frugiperda*. The experimental design used was a randomized triple block design with four irrigation slides (estimated from soil tension): L1- 50% of field capacity (CC) severe stress, L2-75% CC moderate stress, L3 -100% CC control and L4-125% CC water excess; (Cry1A.10 Cry1A PAT C4-EPSPS), Herculex® (Cry1F PAT) and Optimum® Intrasect® (Cry1Ab Cry1F PAT CP4-EPSPS) and three infestations (non-infestation, susceptible *S. frugiperda* population to *Bt* maize and *Bt* resistant *S. frugiperda* population). When plants reached the phenological stage of V8 (phase considered more susceptible to *S. frugiperda* attack and of greater performance of the mechanisms of activation of enzymatic system), they were infested artificially for 24 hours. After this period, leaves of the middle third of the plant were collected for enzymatic analysis. The development of the hybrids that were under water stress was slower than other hybrid studied. On the other hand, the analyzes and determinations of enzymes were carried out in the laboratory, and were not significant for Polyphenoloxidase and Phenylalanine ammonia lyase. They were significant for Peroxidase in isolated factors (water, infestation and corn); for double interactions for superoxide dismutase (corn and infestation) and for triple interaction for phenols (corn and infestation and irrigation). Peroxidase enzymes and superoxide dismutase high rates decreased the proteins activities meaning that under stress the plants stop synthesizing proteins in order to perform hydrolysis to fight the reactive oxygen species (ROS). Therefore, protein production is extremely significant, once it places technology for caterpillar control is at stake.

Keywords: antioxidant enzymes, *Zea mays* L., fall armyworm, stress.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Casa-de-vegetação onde o experimento foi conduzido.....	31
Figura 2- Curva de retenção de água do solo.....	32
Figura 3 - Comportamento das lâminas durante a condução do experimento.....	35
Figura 4 - Infestação artificial, (A) Lagarta <i>S. frugiperda</i> se alimentando do colmo da planta, (B) Danos após 24 h de infestação	36
Figura 5 - Matéria seca e matéria fresca dos híbridos de milho transgênicos sob diferentes tensões de água no solo.	41
Figura 6 – Comportamento das plantas durante hora mais quente do dia (da esquerda para a direita diminui a quantidade de água disponível no solo).	42
Figura 7 - Teor relativo de água nos híbridos de milho.....	43
Figura 8 - Acúmulo de proteínas totais em diferentes híbridos de milho expostos a diferentes infestações de lagartas	44
Figura 9 - Atividade específica da enzima SOD sob diferentes infestações nos três híbridos utilizados no experimento	45
Figura 10 - Atividade da enzima POX nos fatores Capacidade de campo, híbridos de milho e infestação	47
Figura 11 - Expressão de fenóis para os híbridos de milho no desdobramento de diferentes capacidades de campo e infestações	48
Figura 12 - Expressão de fenóis para infestação no desdobramento de diferentes capacidades de campo e híbridos de milho.....	50
Figura 13 - Expressão de fenóis para os níveis de água no desdobramento diferentes híbridos de milho e infestações.....	51

Lista de tabela

Tabela 1 - Parâmetros da equação de Van Genuchten para camada 0 a 0,20 m de solo.	32
Tabela 2 - Caracterização química do solo utilizado no experimento.	33
Tabela 3 - Caracterização física do solo utilizado no experimento.	33

Sumário

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Milho e o manejo de pragas	23
2.2 Características biológicas da espécie <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae)	24
2.3 Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas	26
2.4 Mudanças climáticas	28
2.5 Estresses e Espécies reativas de oxigênio (ERO's).....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Caracterização da área experimental.....	31
3.2 Manejo de irrigação.....	31
3.3 Material vegetal	34
3.4 Criação e manutenção da espécie <i>Spodoptera frugiperda</i>	34
3.5 Delineamento Experimental	34
3.6 Características morfológicas e fisiológicas analisadas nas plantas	36
3.6.1 Teor relativo de água na planta.....	36
3.6.2 Matéria seca.....	37
3.6.3 Análises bioquímicas.....	37
3.6.3.1 Determinação de proteínas totais em tecido vegetal.....	38
3.6.3.2 Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD)	38
3.6.3.3 Atividade da enzima polifenoloxidase (PPO).....	39
3.6.3.4 Atividade da enzima peroxidase (POX).....	39
3.6.3.5 Atividade de fenilalanina-amônia-liase (PAL).....	39

3.6.3.6 Determinação de fenóis totais	40
3.7 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Matéria fresca, matéria seca e teor de água na planta	41
4.2 Análise Bioquímica	43
4.2.1 Proteínas Totais.....	43
4.2.2 Superóxido- dismutase (SOD)	44
4.2.3 Peroxidase (POX)	46
4.2.4 Fenóis	47
4.2.5 Fenilalanina-amônia-liase (PAL)	51
4.5.6 Polifenoloxidase (PPO)	51
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8. APÊNDICE – ESTATÍSTICA	62
8.1 Análises morfológicas	62
8.2 Análises bioquímicas	62

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de milho merece destaque na economia brasileira, pois é o terceiro maior produtor e o segundo maior exportador de grãos (USDA, 2016). Entretanto, a produtividade é altamente prejudicada pela elevada ocorrência de pragas. Dentre essas, destaca-se a espécie *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), que é considerada a praga-chave nessa cultura. Essa lagarta causa danos prioritariamente no cartucho das plantas. Além disso, em altas infestações pode ocorrer sobre o solo atacando também o colo das plantas, assumindo o hábito da lagarta-roscas, *Agrotis ipsilon* Hufnagel, 1766 (Lepidoptera, Noctuidae), ou se alimentando das estruturas reprodutivas, como faz a espécie *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera, Noctuidae).

Dessa forma, a partir da safra 2007/08, o milho geneticamente modificado para o controle de insetos (milho *Bt*) passou a ser utilizado comercialmente por produtores para o controle de *S. frugiperda*. A tecnologia detém representatividade em 80% das lavouras no país (ISAAA, 2016), no entanto, durante a safra 2013/2014 foi necessário realizar em média duas aplicações de inseticida, devido às elevadas infestações de *S. frugiperda*, mesmo em plantios de milho *Bt*, em diversas regiões do país (FARIAS et al., 2014).

A infestação acima do nível de dano econômico nos plantios comerciais de milho na safra 2013/2014 (CONAB, 2013) causou queda na produção brasileira, o que evidenciou a falha no controle da praga por meio da expressão da proteína *Bt*. A falha no controle da lagarta-do-cartucho inicialmente foi creditada a seleção de indivíduos resistentes à tecnologia *Bt* e realmente é um dos fatores que interfere no controle dos insetos (FARIAS et al., 2014).

Entretanto os fatores abióticos também causam interferência na fisiologia das plantas e podem causar distúrbios relacionados à expressão das proteínas inseticidas. As alterações fisiológicas estão relacionadas principalmente a ativação de enzimas de estresse, que atuam na inibição fotossintética, redução da respiração, quebra de paredes celulares, redução da expansão foliar, redução nas atividades metabólicas e celulares e morte celular (SORG, 2004).

Na safra 2013/2014 foram registradas mudanças ambientais drásticas, com um longo período de seca e altas temperaturas (CONAB, 2014) e neste período

ocorreram elevadas infestações de insetos em plantas com tecnologia *Bt*, as quais podem ter apresentado alterações na fisiologia das plantas, o que pode ser um indicativo da ativação das enzimas de estresse, que consequentemente pode ter inibido a função das proteínas que agem no controle de *S. frugiperda*.

Diante desse cenário, em que as previsões do aquecimento global relacionam alteração no regime de pluviosidade, fazendo com que algumas áreas estejam sujeitas a receber incremento de chuvas enquanto outras apresentarão a média abaixo da necessidade para o bom desenvolvimento das culturas. O objetivo desse trabalho foi submeter plantas de milho transgênico ao estresse hídrico e ao ataque da praga *S. frugiperda*, para analisar a influência destes na produção de proteínas *Bt*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Milho e o manejo de pragas

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta originária da América Central, cujos primeiros relatos de cultivo datam aproximadamente 9.000 anos a. C. em terras baixas do sudoeste Mexicano (VAN HEERWAARDEN et al., 2011). Ao longo dos anos a cultura se espalhou pela América do Sul, sendo que no Brasil há indícios de que os índios cultivavam o milho antes mesmo da colonização portuguesa em 1.500 (STALLER; TYKOT; BENZ, 2006).

Os maiores países produtores de milho são Estados Unidos, China e Brasil. A produção brasileira de grãos na safra 2015/2016 foi de aproximadamente 84 mil toneladas, cujas estimativas indicam que manterá a mesma produtividade na safra de 2016/2017 (USDA, 2016). Os estados com maiores destaques em produtividade são Mato Grosso, Paraná e Goiás, concentrando 50,72% de toda produção nacional (CONAB, 2016).

O Brasil é o único país que consegue duas safras de milho por ano, sendo a primeira no período chuvoso em meados de agosto (região Sul) até novembro (regiões Sudeste e Centro-Oeste) e a segunda (safra ou safrinha) durante o período de seca, fevereiro-março. O principal destino da produção brasileira de milho é para fabricação de ração animal, seguido pelo consumo industrial e humano (AGRIANUAL, 2016).

Apesar de ser cultivado o ano todo, o milho assim como as demais culturas está suscetível ao ataque de pragas e doenças que causam elevadas perdas de produtividade. As perdas ocasionadas por pragas anualmente podem chegar a 5,7 mil toneladas, causando um prejuízo de 1,9 milhões de dólares na economia do país (OLIVEIRA et al., 2014).

As pragas que ocorrem no início da cultura podem danificar a semente e plântulas (25 a 30 dias após a germinação), sendo responsáveis pela redução de estande, são: *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae), *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). Com o desenvolvimento da cultura a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), torna-se a principal praga, e o fim do ciclo é marcado

pelo aparecimento de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-da-espiga (MENDES; WAQUIL, 2009).

O método de controle mais empregado para a supressão dessas pragas é o químico. O mercado brasileiro consta com 102 ingredientes ativos e 423 produtos catalogados no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo majoritariamente a classificação toxicologia I e II (MAPA, 2016).

Recentemente outra ferramenta de supressão de pragas tem ganhado destaque no mercado, são as plantas geneticamente modificadas (PGM). A representatividade dessa tecnologia coloca o país em posição de destaque, como o segundo maior produtor de transgênicos, sendo que 80% se destina a cultura de milho (ISAAA, 2016). Por meio de técnicas de engenharia genética foi possível introduzir genes de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) que codificam proteínas inseticidas no genoma de plantas cultivadas, que a partir de então passaram a expressar essas proteínas em todos os tecidos atingindo os insetos-praga (KRONER, 1987).

O modo de ação das toxinas envolve ligações em receptores na membrana das células do intestino médio dos insetos suscetíveis, seguido pela formação dos poros, ruptura do epitélio, provocando septicemia seguida da morte (JOHNSON; BISHOP, 1998). As proteínas inseticidas são classificadas em VIP e Cry, essas se distinguem devido ao processo de formação, sendo a primeira secretada durante a fase vegetativa da bactéria – comparada a proteínas solúveis. Diferentemente das proteínas Cry que são sintetizadas durante a fase reprodutiva, na maioria das vezes formando inclusões cristalinas (JACKSON et al., 2007).

As proteínas que designam resistência a insetos disponíveis para comercialização são Cry1Ab, Cry1F, VIP3Aa20, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, mCry3A, eCry3.1Ab, Cry2Ab2 (CTNBIO, 2016). Os materiais resistentes comercializados no Brasil têm sido desenvolvidos para o controle principal da lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*. (SANTOS et al., 2012).

2.2 Características biológicas da espécie *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae)

O gênero *Spodoptera* tem distribuição por todo globo, é adaptado ao clima tropical e temperado, com representatividade de mais de 30 espécies de mariposas. Nos

trópicos já foram relatadas 16 espécies, cuja 15 são de importância econômica agrícola (SCOBLE, 1995).

Dentre elas a espécie *S. frugiperda*, lagarta-do-cartucho, tem se destacado no sistema agrícola brasileiro. O hábito polífago permite que a praga se mantenha no campo com diversa oferta de hospedeiros, tais como plantas cultivadas, soja, algodão, girassol e tomate (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; BOTTON et al., 1998; DE SOUZA et al., 2013; POGUE, 2002; CAPINERA, 2008). Mas, a preferência da espécie é por gramíneas como, milho e arroz (BUSATO, 2005). Além de grandes cultivos, as lagartas também conseguem sobreviver no agroecossistema alimentando-se de plantas não cultivadas, tais como, capim-arroz, braquiária, crotalária, aveia-preta, tremoço e milheto (BOTTON, 1998; BARROS, 2010; DIAS, 2016).

O ciclo biológico da lagarta-do-cartucho varia de acordo com a cultura em que se estabelece, sendo no milho de aproximadamente 25-30 dias (BARROS et al., 2010). Com ciclo considerado curto, e condições ótimas para o desenvolvimento, 25 °C, a espécie consegue ocorrer por 6 a 8 gerações em campos de milho (BUSATO et al., 2005).

Os ovos são de coloração clara e colocados em massas, as lagartas recém-eclodidas são esbranquiçadas, possuem cápsula cefálica escura e mais larga do que o corpo. Mantem-se agrupadas e iniciam a alimentação juntas, raspando o parênquima da folha, deixando a epiderme membranosa do outro lado intacto (GRÜTZMACHER et al. 2000).

A partir do segundo ínstar, as larvas desenvolvem a mandíbula e passam a consumir as folhas. A fase imatura pode chegar a 50 mm de comprimento, o corpo torna-se cilíndrico e de coloração que varia de cinza-escuro a marrom, com faixas longitudinais branco-amareladas, pontos pretos (pináculos) com cerdas e Y invertido na cabeça são muito característicos da espécie, passando de 6 a 7 ínstar. O término do período larval ocorre quando a lagarta penetra no solo e transforma-se em crisálida, coloração avermelhada e aproximadamente 15 mm comprimento (GRÜTZMACHER et al. 2000; GALLO, 2002).

As mariposas apresentam hábitos noturnos, têm asas anteriores variando em tons cinza a marrom e as posteriores de coloração branca, com envergadura de 22 mm a 35 mm. As fêmeas conseguem produzir mais de 1000 ovos durante a vida, esses ovos são colocados em massas e recobertos com fina camada de escamas do corpo da mariposa, não havendo, aparentemente, local preferido na planta para a postura

(GALLO, 2002). A não-preferência por local de oviposição pode estar relacionado à natureza polífaga da larva, ou seja, independentemente de onde os ovos forem colocados, haverá sempre probabilidade de a larva encontrar um alimento adequado (BARROS, 2010).

Os danos causados na cultura do milho pela *S. frugiperda* são preferencialmente nas folhas com nicho preferencial pelo cartucho da planta, sendo o período crítico para o ataque quando a cultura entre 8 a 10 folhas (CRUZ; TURPIN, 1982). A lagarta-do-cartucho também apresenta hábitos de outras pragas, quando ocorrem no início da cultura seccionam o colmo parcial ou totalmente acarretando diminuição no *stand*, como *A. ipisilon*, e mais no fim da cultura se comporta como a lagarta-da-espiga, *H. zea*, causando danos diretos na espiga (GRÜTZMACHER et al. 2000, CRUZ; MONTEIRO, 2004).

2.3 Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas

As plantas geneticamente modificadas (PGM) com expressão de genes com atividade inseticida se tornaram uma ferramenta a supressão de insetos-pragas, além de serem consistente com a filosofia do manejo integrado de pragas (MIP), qual o objetivo é empregar diversas táticas e manter a população de insetos-alvo abaixo do nível de dano econômico.

No cenário agrícola, a resistência de insetos aos cultivos transgênicos ameaça a manutenção das tecnologias. Assim, a evolução de indivíduos resistentes é resultante da pressão de seleção, que pode ocasionar mudanças nas composições genéticas das populações, aumentando a frequência relativa de alguns indivíduos “pré-adaptados”. Em plantas modificadas com expressão de genes de *B. thuringiensis*, uma determinada espécie é considerada resistente quando se desenvolvem, alimentando-se apenas destas plantas sem sofrer danos, chegando ao acasalamento e a produção de descendentes viáveis (ANDOW, 2008).

O primeiro relato de resistência para proteínas inseticidas de *Bt*, ocorreu em 1985, para uma população de *Plodia interpunctella* (Hubner, 1813), em laboratório, a qual apresentou razão de resistência de 100 vezes após 15 gerações em dieta artificial (MCGHAUHEEY, 1985). Estudos bioquímicos comprovaram alterações no sítio de ligação da proteína inseticida no intestino médio da espécie (VAN RIE, 1990).

Em relação às PGM foram reportados recentemente casos de resistência a plantas com expressão de apenas uma proteína (TABASHNIK, 2013), a evolução de resistência no campo para a espécie *H. zea* (Boddie) em 2002 nos EUA (TABASHNIK, 2008), e *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1843) na Índia em 2008, ambas no cultivo de algodão com toxina Cry1Ac e com eficiência da tecnologia de 6 anos, respectivamente (DHURUA; GUJAR, 2011).

A evolução da resistência em populações de *Busseola fusca* (Fuller, 1901) (Lepidoptera: Noctuidae), foi constatada em 2007 na África do Sul, para a proteína Cry1Ab expressa em plantas de milho. Com a população resistente constatada em cultivos de sistema irrigado (fator que pode ter contribuído para aumentar a pressão de seleção, sendo que as mariposas têm preferência por ambientes com alta umidade) (VAN RENSBURG et al., 2011).

A lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, apresenta populações resistentes à proteína Cry1F em Porto Rico (o posicionamento da ilha favorece a população resistente devido ao baixo fluxo gênico), Brasil e EUA (STORER, 2010; FARIAS, 2014;).

A resistência só foi documentada em laboratório para as proteínas Vip e as espécies *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805), *Helicoverpa punctigera* (Wallengren, 1860) e *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781), a alta frequência do alelo para a proteína Vip3A foi constatada em populações de campo na Austrália (DOWNES, 2012).

A capacidade de adaptação não se restringe apenas a ordem Lepidoptera, também há relato de resistência para a ordem coleoptera, *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte à proteína Cry3Bb1, 2009, e mCry3Aa, 2011, em milho nos EUA (GASSMANN, 2011).

Para a maioria dos casos de evolução da resistência há a hipótese de resistência-cruzada, em que há similaridade entre os domínios de ação das toxinas. Os insetos apresentaram mutações em genes envolvidos em qualquer uma das etapas referentes ao mecanismo de ação das toxinas no intestino do inseto. No entanto, alguns insetos selecionados em laboratório e levados a experimentação em campo ou casa de vegetação, apresentaram alteração nos receptores do intestino médio, além de promover a degradação da proteína inseticida e maior eficiência na reposição das células danificadas do intestino médio (CARRIÈRE; FABRICK; TABASHNIK, 2016).

2.4 Mudanças climáticas

Em 1750 as taxas de gás carbônico (CO_2) na atmosfera eram de $278 \mu\text{L. L}^{-1}$. As atividades antrópicas junto da revolução industrial e as intensificações das atividades deste setor e proporcionaram aumento de $2 \mu\text{L. L}^{-1}$ ao ano na emissão de CO_2 até a década de 2000. Em 2010 foi constatado incremento de 39% nas taxas de CO_2 , desde o início da Era industrial (PETERS et al., 2012).

Essa modificação na composição química da atmosfera, somado ao aumento da concentração de outros gases do efeito estufa, tais como, metano (CH_3) e óxidos de nitrogênio (NO), tem reflexo direto nas condições climáticas, como aumento de $0,74^\circ\text{C}$ na temperatura da superfície da Terra durante o século passado (GHINI et al., 2008). E haverá ganho de $1,4^\circ\text{C}$ a $5,8^\circ\text{C}$ na temperatura média global, como mostra o quarto relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas” (IPCC) (IPCC, 2007). Consequentemente, o reflexo ocasionará mudanças nas radiações luminosas e na distribuição de pluviosidade, com aumento na extensão e severidade de secas e inundações (SHEFFIELD; WOOD, 2008, DAI, 2011).

As atividades agrícolas são intrínsecas aos fatores climáticos, sendo que esses determinam a região de cultivo e a produção. Na Austrália, desde 1950 é observado que tem aumentado a temperatura e diminuído o regime de chuvas (HENNESSY, 2010), o mesmo ocorre na Índia, fazendo com que a produção de grão-de-bico a cada ano migre mais para o sul do país, onde as temperaturas são amenas e não comprometem tanto a produção (GOWDA, 2009).

As mudanças climáticas previstas para o Brasil são as mesmas, aumento no tempo de estiagem e temperaturas. Atingindo principalmente as regiões de cerrado, considerada o celeiro brasileiro de grãos, Mato Grosso e MATOPIBA (parte de Goiás e Tocantins). O maior prejuízo do aquecimento global à agricultura brasileira será inviabilizar a produção de duas safras por ano, forçando o agricultor a optar por um cultivo mais produtivo e lucrativo, além de conscientizá-lo que a redução do desmatamento pode protelar esse impacto ambiental (PIRES et al., 2016).

O primeiro impacto do aquecimento global no Brasil foi observado durante a safra 2013/2014, onde as maiores regiões produtoras de grãos (Centro-Oeste e Sul) não apresentaram a média anual de pluviosidade. No Centro-Oeste não houve precipitação e as temperaturas atingiram recordes de calor, em contrapartida, nos estados do Sul houve excesso de chuvas, inundando as áreas produtivas (CONAB,

2014; INMET, 2014). Contudo impactando a produção, que apresentou redução de 6,8% em relação à safra passada, saindo de 34.576,7 mil toneladas para 32.223,5 mil toneladas (CONAB, 2014).

2.5 Estresses e Espécies reativas de oxigênio (ERO's)

As plantas quando submetidas a estresses, envolvem várias respostas fisiológicas e bioquímicas. As fontes promotoras de estresse são diversas, podem ser bióticas (patógenos, pragas) e abióticas (temperaturas extremas, disponibilidade hídrica - excesso ou déficit, ventos, radiação U.V., salinidade, metais pesados, etc), exigindo adaptações para sobrevivência e produtividade (SCANDALIOS, 2005).

O estresse faz com que a produção agrícola se torne um desafio, comprometendo a produção de alimentos. As lavouras são submetidas constantemente aos fatores que promovem desequilíbrios, e como resposta promovem a produção de defesas antioxidantes, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (SCANDALIOS, 1997).

As ERO's são indicadores celulares de estresse ou mensageiros secundários envolvidos na via de tradução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002; FOYER; NOCTOR, 2005). A principal fonte das ERO's é a fotorrespiração, em que o oxigênio molecular (O_2) neutro e não-reativo, durante o processo metabólico de transferência e transporte de elétrons pode produzir radicais livres, resultando em radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidróxido ($OH^{\cdot}$) e radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FOYER; NOCTOR, 2009).

Quando os radicais estão em altas concentrações são tóxicos a planta, e para amenizar os danos causados pelas ERO's os seres aeróbicos desenvolveram métodos não-enzimáticos e enzimáticos para combater-las. As medidas não-enzimáticas envolvem a produção de β -caroteno, vitaminas C e E. Entretanto, a defesa enzimática induz a produção de enzimas capazes de neutralizar os radicais e/ou oxigênios intermediários, contando com superóxido dismutase (SOD), peroxidase (PPO), catalase (CAT), polifenoloxidase (POD), fenilalanina (PAL), entre outras (SCANDALIOS, 2005).

As mudanças climáticas estão envolvidas com o estresse oxidativo, as ERO's podem interagir com lipídeos das membranas, fragmentar cadeia peptídica, modificar aminoácidos, deleção e mutações no DNA, degradações de bases nucleotídicas e

morte celular. Cada organela tem um alvo potencial para danos ou acúmulo de ERO's e as enzimas tentam manter a homeostase celular, essa ação pode levar a ativação ou desligamento de alguns genes (MUNNÉ-BOSCH; QUEVAL; FOYER, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área experimental

Os bioensaios foram conduzidos em casa-de-vegetação e em laboratórios do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura (AGRIMIP) (Figura 1). Localizados junto ao Departamento de Proteção Vegetal, pertencentes à Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus Botucatu.

Figura 1 - Casa-de-vegetação onde o experimento foi conduzido



3.2 Manejo de irrigação

Realizou-se no dia 2 de fevereiro a coleta de 3 amostras de solo da área da Patrulha, também localizada nas dependências da FCA/UNESP, referente a profundidade de 0,20 m, as quais foram encaminhadas para o Departamento de Solos e Recursos Ambientais da FCA/UNESP para obtenção da curva de retenção de água, no dia 2 de fevereiro de 2016. Empregou-se o método da câmara de pressão de Richards, onde foi determinado umidade no solo para os pontos 3, 6, 10, 30, 100, 500 e 1500 kPa. Os pontos foram processado no software SWRC versão 3.0 de Dourado Neto et al. (1995) para definir os parâmetros de α , n , m , θ_r e θ_s (Tabela 1). Em seguida,

para adequação da curva de retenção aplicou-se a equação proposto por Van Genuchten (1980), equação (1) (Figura 2).

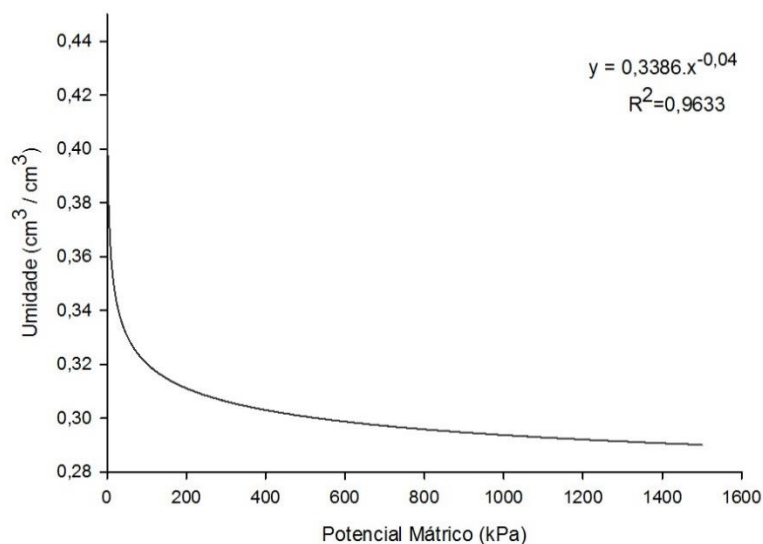
$$\theta = \theta_r + \frac{\theta_s - \theta_r}{[1 + (|\Psi_m| * \alpha)^n]^m} \quad (1)$$

Onde: θ - umidade atual à base de volume ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$); θ_r – umidade residual ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$); θ_s - umidade de saturação ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$); Ψ_m - potencial de água no solo (kPa); α - parâmetro de ajuste (cm^{-1}); m e n - parâmetros empíricos do modelo matemático.

Tabela 1 - Parâmetros da equação de Van Genuchten para camada 0 a 0,20 m de solo.

Camada (m)	θ_r ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$)	θ_s ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$)	α (cm^{-1})	m	n	P (g cm^{-3})
0 - 0,20	0,243	0,442	1,760	0,0564	3,240	1,36

Figura 2- Curva de retenção de água do solo



A irrigação proposta visava manter umidade do solo em capacidade de campo (CC) até início da diferenciação dos tratamentos hídricos. Desse modo, foram estabelecidos os seguintes limites de umidade no solo: tratamento com 125% da necessidade da cultura (tensão média de água no solo de 3 kPa), 100% da necessidade hídrica da cultura (tensão média de água no solo de 15 kPa), 75% da

necessidade hídrica da cultura (tensão média de água no solo de 45 kPa) e 50% da necessidade hídrica da cultura (tensão média de água no solo de 70 kPa).

O controle da umidade do solo foi efetuado no período da manhã (8 a 10 h) para definir o momento de quando e quanto irrigar. Foi instalado um tensiômetro por vaso a 0,15 m de profundidade, em que as tensões de água no solo eram realizadas diariamente com auxílio de um tensímetro digital. As tensões de água no solo foram correlacionadas com a curva de retenção de água do solo para determinar a umidade e depois estabelecer a lâmina de irrigação com base na CAD (Capacidade de água disponível) (Equação 2) e metodologia de Gomes (2015).

$$CAD = (CC - PM) * Z * d \quad (2)$$

Sendo: CAD - capacidade de água disponível (mm); CC – umidade volumétrica na capacidade de campo ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$); PM - umidade volumétrica no momento da leitura ($\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$); Z - profundidade efetiva do sistema radicular (mm); d - densidade do solo.

Para a classificação física e química do solo, foram coletadas amostras da mesma área da Patrulha a 0,20 m de profundidade, e encaminhadas ao Departamento de Solos e Recursos Ambientais da FCA/UNESP. O solo foi caracterizado como Latossolo vermelho de textura média, de acordo com a classificação química e física (Tabelas 2 e 3, respectivamente) (EMBRAPA, 2013). Durante a condução do experimento não foram realizadas adubações de cobertura para o cultivo do milho embasando-se no Boletim 100 e na análise química.

Tabela 2 - Caracterização química do solo utilizado no experimento.

pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%
CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	-----			mmol _c /dm ³			-----	
6,2	47	77	0	16	13,9	42	31	87	103	85

Tabela 3 - Caracterização física do solo utilizado no experimento.

Areia	Argila	Silte	Textura	Densidade (g/cm ³)
87	150	63	Média	0,00

3.3 Material vegetal

Os híbridos de milho utilizados no experimento apresentavam o ciclo precoce e diferentes tecnologias conferindo resistência ao ataque de insetos e a herbicidas. A característica de resistência ao ataque de *S. frugiperda* determinou os tratamentos, sendo formado por: PowerCore™ (Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-ESPS), Herculex® (Cry1F PAT) e Optimum® Intrasect® (Cry1Ab Cry1F PAT CP4-EPSPS).

3.4 Criação e manutenção da espécie *Spodoptera frugiperda*

O estabelecimento da criação da espécie *S. frugiperda* teve início a partir de duas populações oriundas de laboratório, originárias das criações da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. A principal diferença entre as populações era a suscetibilidade à proteína que confere resistência aos eventos transgênicos, como o *Bt*, assim sendo uma população era suscetível e a outra resistente.

A primeira geração (F1) das populações de *S. frugiperda* estabelecida nos laboratórios do AGRIMIP foram apenas para multiplicação e manutenção. Para o desenvolvimento dos insetos foram utilizadas salas climatizadas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$, UR $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas), onde separou as fases de mariposas e lagartas.

Os adultos (mariposas) foram mantidos em gaiolas confeccionadas com tubos de PVC (21,5 cm de altura x 10 cm de diâmetro) e alimentadas com solução de mel a 30%. A parte superior da gaiola foi vedada com tecido tipo “voile” e a parte interna revestida com papel tipo jornal, que serviram como substrato para a oviposição.

O papel e tecido com ovos foram recolhidos diariamente, e alocados em copos plásticos (7 cm x 4,5 cm) até a eclosão das lagartas, quando essas atingiram o segundo instar foram transferidas para cápsulas individuais com dieta artificial (Greene et al. (1976) e modificada por Parra (2001)), onde permaneceram até a pupação.

3.5 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial triplo ($3 \times 3 \times 4$), sendo três híbridos de milho (PowerCore™, Herculex

e Optimum® Intrasect®), três infestações de lagartas (sem infestação, lagarta suscetível ao *Bt* e lagarta resistente ao *Bt*) e quatro lâminas de irrigação (50%, 75%, 100% e 125% da CC).

Foram cultivadas 648 plantas, cada bloco foi composto por 216 plantas e cada tratamento representado por 6 plantas, cada uma considerada uma unidade experimental (repetição). O início do experimento foi em 26 fevereiro de 2016 quando fez-se a semeadura de bandeja de isopor de 128 células.

Quando ocorreu a germinação e emergência, as plântulas foram transplantadas (2 de março) para vasos de 40 L - cada vaso comportou três plantas. As plantas foram conduzidas sob a capacidade de campo até dez dias após o transplante, depois houve a diferenciação da irrigação (Figura 3).

As plantas ficaram sob diferentes estresses hídricos por dez dias, e quando atingiram o estágio fenológico de V8, ("cartucho – primário"), a fase mais suscetível ao ataque da praga (CRUZ; TURPIN, 1982), foram infestadas artificialmente com uma lagarta de 3º ínstar da espécie *S. frugiperda* (F3), proporcionando o ataque por 24 horas (SINGH et al., 2013 - adaptado). Após, foram retiradas amostras das plantas para análises fisiológicas e bioquímicas (Figura 4).

Figura 3 - Comportamento das lâminas durante a condução do experimento

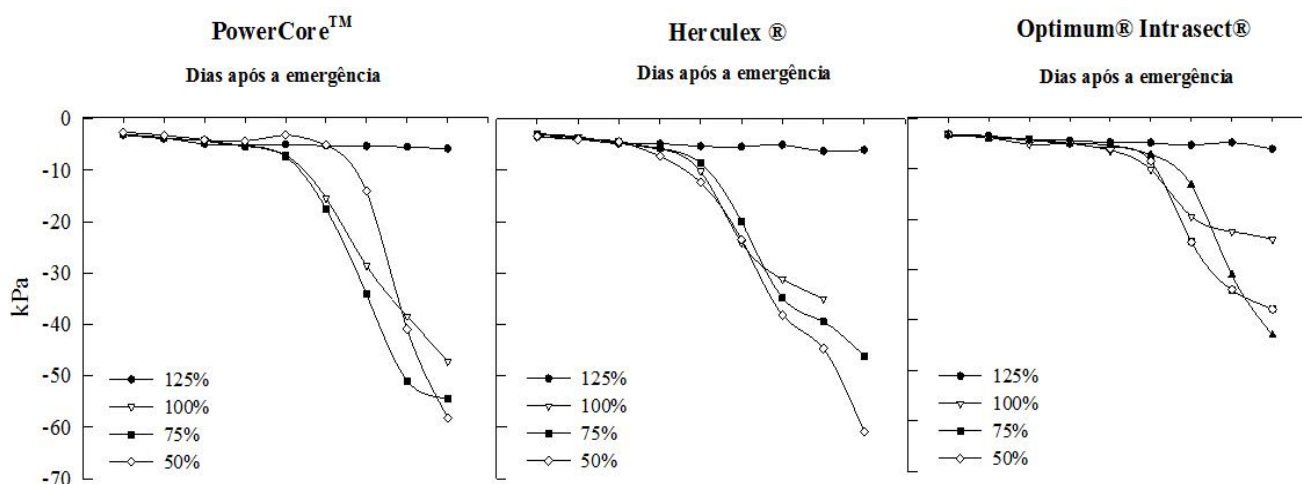
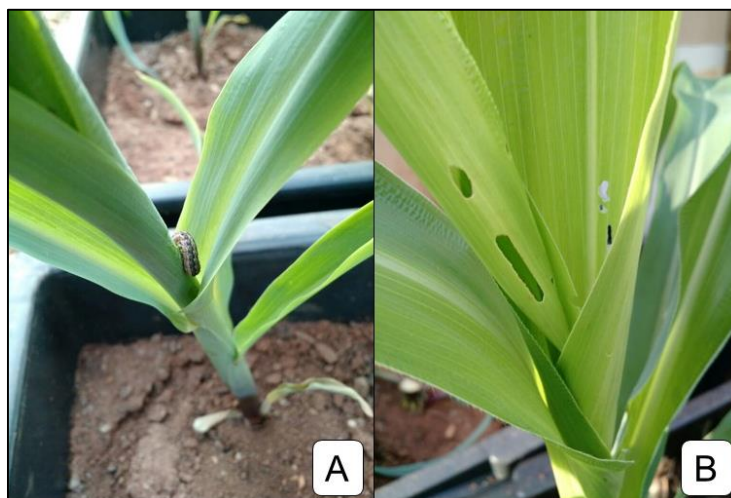


Figura 4 - Infestação artificial, (A) Lagarta *S. frugiperda* se alimentando do colmo da planta, (B) Danos após 24 h de infestação



3.6 Características morfológicas e fisiológicas analisadas nas plantas

3.6.1 Teor relativo de água na planta

Para determinar o teor relativo de água (TRA), utilizou-se a metodologia de Barrs 1968, coletou-se seis discos foliares por planta em cada tratamento (10 mm). Os discos foram pesados (Pf) em balança com precisão de 0,001g, e em seguida, mantidos em água deionizada e levados à geladeira ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) para saturação do tecido. Após seis horas, os discos foliares foi removido o excesso de água em papel toalha e pesados (Pt), e para finalizar o material foi colocado em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por 24 horas, para obtenção do peso de matéria seca (Ps). Os valores foram submetidos a Equação (3) para o cálculo do TRA.

$$\text{TRA}\% = \frac{(P_f - P_s)}{(P_t - P_s)} \times 100 \quad (3)$$

Em que: TRA - Teor relativo de água (%); Pf - Peso fresco do disco foliar (g); Ps - Peso seco do disco foliar (g); Pt - Peso saturado do disco foliar (g).

3.6.2 Matéria seca

Para a determinação de matéria seca, metodologia de Rodrigues 2010, foram coletadas três plantas por tratamento, as amostras foram pesadas em uma balança de precisão de 0,1g para determinação da massa fresca (MF) e em seguida levadas para uma estufa de ar forçado a 60 °C. O tempo de secagem foi de 72 horas (MS), após esse tempo foram novamente pesadas para determinar a percentagem massa seca (MS%), equação (4).

$$MS\% = \frac{MS}{MF} \times 100 \quad (4)$$

Em que: MS - Massa da matéria seca (g); MF - Massa da matéria fresca (g).

3.6.3 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas foram utilizadas três plantas por tratamento, as folhas foram retiradas do terço médio da planta (V4) para a composição de uma amostra, em seguida o material vegetal foi depositado em um envelope de papel alumínio e rapidamente congelado em nitrogênio líquido para preservação da atividade enzimática. Até o início das análises todo o material foi mantido em freezer.

A determinação da concentração de proteína foi empregado o método de Bradford (1976), utilizando-se a albumina de soro bovina (BSA) como padrão proteico.

As extrações enzimáticas do material vegetal foram realizadas em cadinho, onde se adicionou N₂ líquido e macerando até formar uma farinha, no qual após se adicionou o tampão de extração (1 g tecido/3 mL tampão). As amostras foram homogeneizadas (3:1 volume do tampão de extração para o peso fresco do tecido) com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 3 mM de ditioneitol (DTT) e 5% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Gratão et al., 2008). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 30 min e o sobrenadante foi mantido estocado em alíquotas separadas a -80 °C para as análises de peroxidase, polifenoloxidase, superóxido dismutase.

Para a análise de fenóis utilizou-se acetona a 50% para a extração do material vegetal (0,5 g tecido/ 5 mL acetona a 50% v/v). O homogeneizado ficou em banho ultrassom e depois foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 min, retirado o sobrenadante o processo é repetido, e centrifugado por 20 min, formando assim uma alíquota que foi mantida em freezer até ser analisada.

As extrações para a quantificações da enzima fenilalanina-amônia-liase, o material vegetal foi macerado com N₂ até a formação de um extrato fino, adicionado o tampão de extração borato (0,1M; 10 mL) contendo 50g de PVP (5%) ajustar o pH para 8,8 com HCl e adicionar 1,2 mL de β-mecaptoetanol. O homogeneizado é centrifugado por 20 min a 12.000 rpm, o sobrenadante é filtrado em lã-de-vidro, formando a alíquota.

Todas as extrações foram realizadas em triplicada para melhor homogeneidade dos dados.

3.6.3.1 Determinação de proteínas totais em tecido vegetal

Para se determinar a concentração de proteínas nas amostras de milho utilizou-se o método de Bradford (1976). A extração se deu pela maceração das amostras em N₂ líquido, depois 300 mg desse material vegetal foi adicionado ao tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,7) e novamente macerado. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min, depois extraindo o sobrenadante. Cada amostra foi composta por 50 µL e 2,5 mL solução de Bradford, a reação ocorreu em 15 min e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

3.6.3.2 Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD)

A atividade enzimática da SOD (EC; 1.15.1.1) utilizou 50 µL de extrato bruto com solução contendo 13 mM de metionina, 75 µL de NBT, 100 nM de EDTA e 2 µL de riboflavina e tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,8). A reação teve início com a iluminação dos tubos (15 W a 25 °C) por 5 min, depois o final da catálise foi determinado com a interrupção da luz. O composto formado pela redução do NBT, formazana, foi determinado pela absorção de 560 nm em espectrofotmetro. Os tubos brancos (não há reação) são mantidos cobertos com papel alumínio. A atividade

específica da SOD foi dada em U. μg^{-1} proteína e a metodologia proposta por Giannopolitis et al. (1977) e Koshiba (1999), modificada por Peixoto et al. (1999).

3.6.3.3 Atividade da enzima polifenoloxidase (PPO)

A polifenoloxidase (EC; 1.10.3.1) foi determinada com 0,3 mL da solução de amostra extraída com tampão fosfato e 1,85 mL de catecol a 0,1M. Para a reação ocorrer as amostras foram levadas ao banho-maria a 30 °C por 30 min e para final da catálise utilizou 0,8 mL de ácido perclórico. A leitura em espectrofotometro foi a 395 nm e a unidade específica da polifenoloxidase se deu em $\mu\text{KAT. } \mu\text{g proteína}^{-1}$ (LIMA, 1999; KAR, MISHRA, 1976).

3.6.3.4 Atividade da enzima peroxidase (POX)

A atividade enzimática da peroxidase (POX; EC 1.11.1.7) foi determinada pela metodologia de Lima (1999), a leitura em espectrofotômetro a 505 nm. As amostras são preparadas com 0,5 mL de extrato bruto, 0,5 mL de tampão fosfato de potássio e 0,5 mL de solução fenol e aminoantipirina (APP) levadas para o banho-maria a 30 °C por 5 min, a reação chegou ao fim com a adição de álcool etílico absoluto. A unidade específica da peroxidase se deu em $\mu\text{KAT. } \mu\text{g proteína}^{-1}$.

3.6.3.5 Atividade de fenilalanina-amônia-liase (PAL)

A quantificação da PAL (EC;4.3.1.5) foi realizada com 1 mL da alíquota, 1 mL tampão borato (0,2M) colocado em banho-maria 36 °C por 5 minutos (para que ocorra o aquecimento da solução) depois foi acrescentado 1 mL de fenilalanina, deixando as soluções por 1 hora no banho – agitando de vez em quando para evitar que bolhas de ar ficassem acumuladas. A reação foi parada quando acrescentou 0,1 mL de HCl (6N), a leitura realizada em espectrofotômetro em 290 nm, deve-se usar cubetas de quartzo (deixa passar somente as ondas na faixa da UV), a unidade específica foi dada em $\mu\text{KAT. } \mu\text{g proteína}^{-1}$ (PEIXOTO et al., 1999).

3.6.3.6 Determinação de fenóis totais

Para a determinação de compostos fenólicos foram empregados 0,1 mL do sobrenadante, 0,9 mL de água deionizada, 0,5 mL de Folim e 2,5 mL de Na₂Cl₃ a 20%. Após uma hora de reação fez-se as leituras em espectrofotometro a 725nm (SINGLETON et al., 1965; SINGLETON et al., 1999).

3.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos às análises exploratórias para avaliar as pressuposições de normalidade dos resíduos (SHAPIRO, 1965), a homogeneidade de variância dos tratamentos (BARTLETT, 1937) e a aditividade do modelo para permitir a aplicação da ANOVA. Posteriormente, as médias referentes às características morfofisiológicas, e infestações artificiais de insetos-praga e as atividades enzimáticas foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A análise estatística foi realizada usando o programa Sisvar e SigmaPlot versão 11.

4. RESULTADOS

4.1 Matéria fresca, matéria seca e teor de água na planta

As características morfológicas dos híbridos sob diferentes estresses hídricos foram submetidas a análise estatística, sendo significativa para a interação milho e capacidade de campo, para os fatores matéria seca ($GL_{6,35} = 0,0031$; $p = 0,0049$) e matéria fresca ($GL_{6,35} = 0,0445$; $p = 0,00$), CV% 15,20 (Figura 5).

De maneira geral, os híbridos que permaneceram sob os tratamentos de capacidade de campo e acima desta (100% e 125%) apresentaram os maiores acúmulos de matéria fresca e, conseqüentemente, de matéria seca. A disponibilidade de água no solo permitiu que as plantas se desenvolvessem normalmente, com expansão da área foliar sem danos na morfologia.

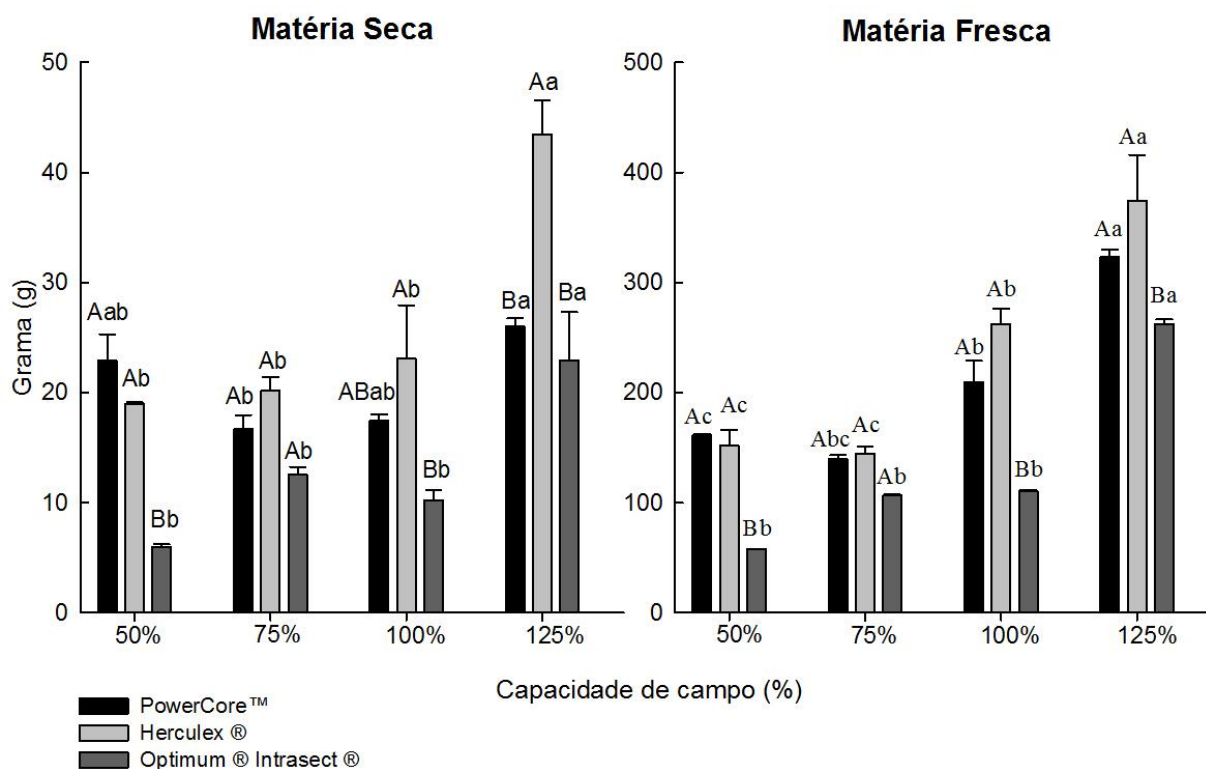
Enquanto as plantas sob estresses moderado e severo por déficit (75% e 50% CC) ficaram menores, baixo acúmulo de biomassa e durante as horas mais quentes do dia apresentavam o comportamento de enrolar as folhas (Figura 6).

Os híbridos Herculex®, Optimum® Intrasect® e PowerCore™ apresentaram acúmulos crescente de biomassa conforme aumentou a água disponível no solo nas CC, sendo 50%, 75%, 100% e 125%. As tecnologias Herculex® e PowerCore™ sob os níveis de água de 50%, 100% e 125% da CC apresentaram acúmulo 2 vezes maiores de matéria fresca que o híbrido Optimum® Intrasect®, diferenciados estatisticamente.

Mesmo em diferentes níveis de estresses hídricos, os híbridos Herculex® e PowerCore™ conseguiram se desenvolver diferenciando-se do Optimum® Intrasect®, que apresentou comportamento e desenvolvimento retardado, exceto sob 75% da CC.

Para o teor relativo de água na planta (TRA) não houve interação estatística significativa entre milho e capacidade de campo, sendo significativo apenas para o fator isolado híbrido de milho ($GL_{3,35} = 0,0003$) CV% 11,42 (Figura 7). Em que o híbrido Optimum® Intrasect® apresentou o maior teor de água nos tecidos diferenciando-se das tecnologias PowerCore™ e Herculex®.

Figura 5 - Matéria seca e matéria fresca dos híbridos de milho transgênicos sob diferentes tensões de água no solo.

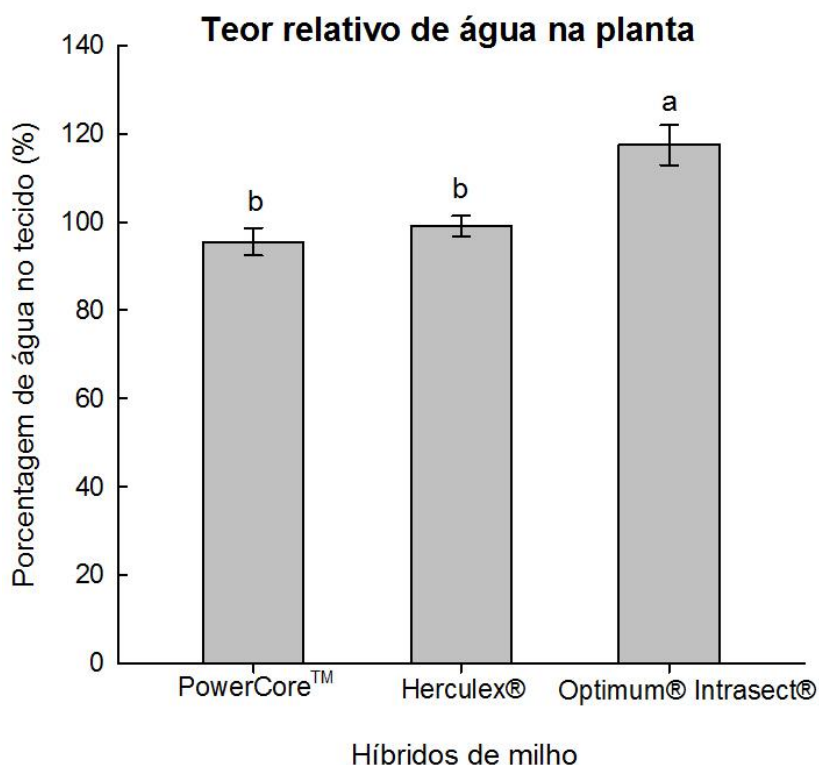


Obs: As letras maiúsculas comparam diferentes híbridos na mesma lâmina de água, e letras minúsculas comparam os mesmos híbridos em diferentes lâminas de água.

Figura 6 – Comportamento das plantas durante hora mais quente do dia (da esquerda para a direita diminui a quantidade de água disponível no solo).



Figura 7 - Teor relativo de água nos híbridos de milho



4.2 Análise Bioquímica

4.2.1 Proteínas Totais

A produção de proteínas totais apresentou significância estatística para a interação híbridos de milho e as infestações ($GL_{4,72} = 2,760$; $p = 0,0340$) e CV% 49,56 (Figura 8).

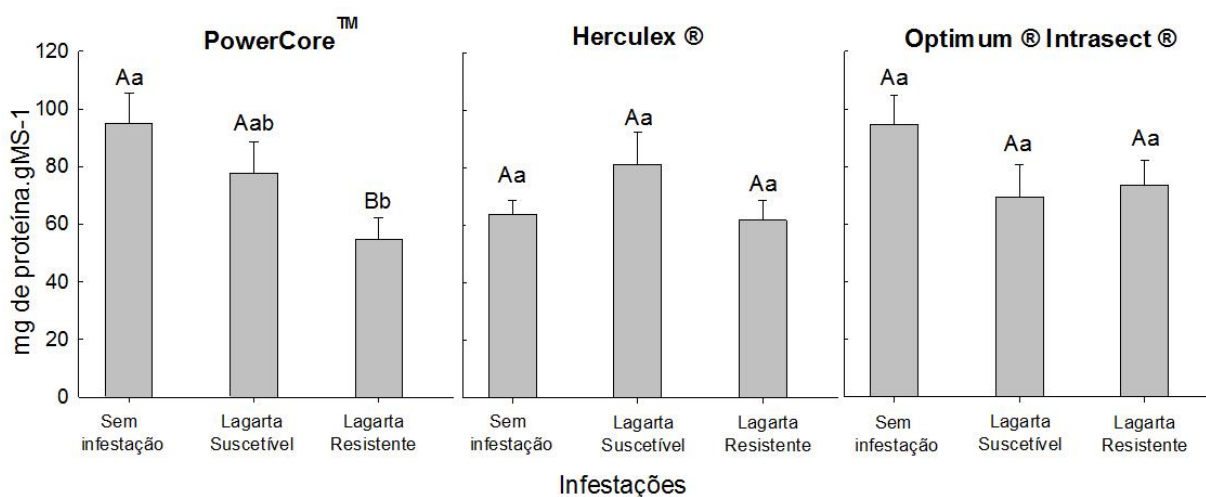
O acúmulo de proteínas para o híbrido PowerCore™ foi linear e decrescente, com significância para as diferentes infestações. A alta taxa de proteína ocorreu em plantas que não sofreram ataques de lagartas (94,92 mg de proteína. gMS⁻¹), diferindo das plantas que foram infestadas com lagartas resistentes por apresentarem a menor produção de proteínas (54,84 mg de proteína. gMS⁻¹), as plantas que sofreram danos com o ataque de lagartas suscetíveis a tecnologia *Bt* não se diferenciaram de ambas (77, 82 mg de proteína. gMS⁻¹).

O comportamento do híbrido Herculex® para proteínas totais não houve diferença significativa entre as infestações, sendo o menor acúmulo para as plantas sem infestação (50,16 mg de proteína. gMS⁻¹), seguida com pequeno incremento por plantas infestadas com lagartas suscetíveis (61,64 mg de proteína. gMS⁻¹) e lagarta suscetível (81,06 mg de proteína. gMS⁻¹). Entre as infestações do híbrido Optimum®

Intrasect® também não houveram diferenças estatísticas entre as infestações sendo que a maior taxa de produção de proteínas ocorreu em plantas que não foram infestação (94,92 mg de proteína. gMS⁻¹), com diminuição para ambas as plantas com danos de lagartas, resistente (73,5 mg de proteína. gMS⁻¹) e suscetível (69,4 mg de proteína. gMS⁻¹), respectivamente.

Entre os híbridos estudados a diferença estatística encontrada foi para a infestação de lagartas resistentes na tecnologia PowerCore™, sendo a menor taxa de proteínas totais, os demais não diferiram.

Figura 8 - Acúmulo de proteínas totais em diferentes híbridos de milho expostos a diferentes infestações de lagartas



Obs: As letras maiúsculas comparam as mesmas infestações nos três híbridos, enquanto as letras minúsculas comparam as diferentes infestações no mesmo híbrido

4.2.2 Superóxido- dismutase (SOD)

A expressão da enzima SOD foi significativa para a interação híbrido de milho (GL_{4,72} = 5,923; p = 0,0042) e infestações (GL_{4,72} = 7,718; p = 0,0009) e CV% 49,65.

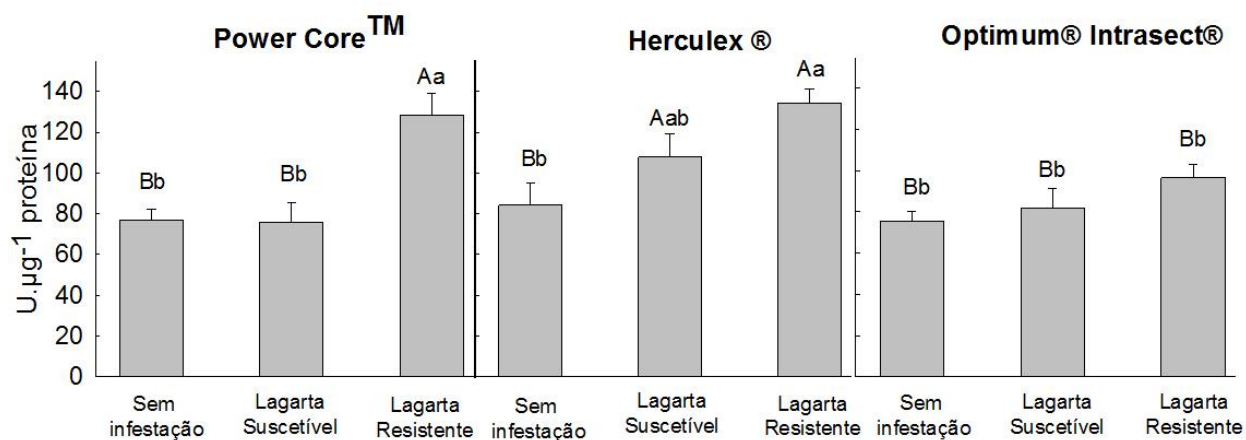
A taxa da enzima foi crescente de acordo com o tipo de infestação, o mesmo comportamento é observado nos três híbridos de milho. A concentração da enzima aumenta conforme o dano causado nas folhas das plantas, isso é, as lagartas suscetíveis aos transgênicos consomem menos área foliar quando comparadas às lagartas resistentes (Figura 9). Portanto, haverá maior atividade enzimática do sistema oxidativo quanto maior o dano gerado.

Comparando a atividade da SOD no híbrido PowerCore™, não houve diferença estatística entre plantas com infestação de lagarta suscetível (75,64 U.µg⁻¹ proteína) e o tratamento controle (sem infestação, 76,71 U.µg⁻¹ proteína), mas ambos se diferenciam da infestação com lagarta resistente que teve maior atividade (126,7 U.µg⁻¹ proteína).

A atividade enzimática na tecnologia Optimum® Intrasect® apesar de ter uma crescente expressão da SOD não apresentou diferença estatística entre os tipos de infestações. Por outro lado, o híbrido Herculex® apresentou significância as infestações, com baixa atividade de SOD para as plantas sem infestação (84,13 U.µg⁻¹ proteína) e alta atividade da enzima para as plantas atacadas por lagartas resistentes (136,19 U.µg⁻¹ proteína), sendo que a infestação de lagarta suscetível obteve atividade foi mediana (107,85 U.µg⁻¹ proteína), não diferindo de ambas.

A comparação da atividade da SOD nos três híbridos de milho considerando o tipo de infestação, não apresentou diferença estatística significativa para as plantas sem infestação, sendo a média entre os híbridos foi 78 U.µg⁻¹ proteína. Para as plantas infestadas com lagartas suscetíveis houve diferença significativa sendo a tecnologia Herculex® com maior atividade da SOD, diferente das outras duas estudadas. Sob a infestação da lagarta resistente, os híbridos PowerCore™ e Herculex® tiveram altas atividades da enzima diferenciando-se estatisticamente da tecnologia Optimum® Intrasect®.

Figura 9 - Atividade específica da enzima SOD sob diferentes infestações nos três híbridos utilizados no experimento



Obs: as letras minúsculas comparam as diferentes infestações no mesmo híbrido de milho, enquanto as letras maiúsculas comparam as mesmas infestações nos diferentes híbridos de milho.

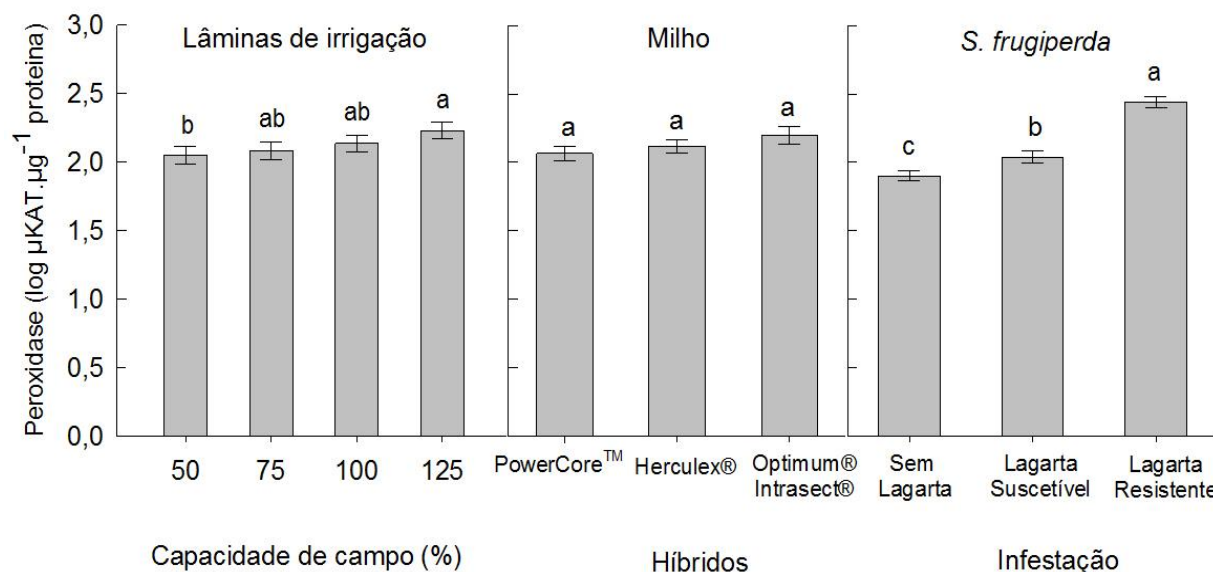
4.2.3 Peroxidase (POX)

A atividade enzimática da POX não apresentou interação estatística entre os fatores estudados, mas foi significativa para cada fator separadamente, sendo capacidade de campo ($GL_{3,72} = 3,050$; $p = 0,0340$), híbridos de milho ($GL_{2,72} = 2,840$; $p = 0,0650$) e infestação ($GL_{2,72} = 50,932$; $p = 0,000$) CV% 51,36 (Figura 10).

A produção da POX sob as diferentes CC tem o comportamento de aumento linear conforme o aumento das lâminas aplicadas, isso é, conforme mais água disponível no vaso, maior a atividade específica da enzima (diferenças significativas). Quando analisado os híbridos de milho não houve diferença estatística entre eles, mas a tecnologia Optimum® Intrasect® ($2,06 \log\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}\text{proteína}$) apresentou a maior atividade, seguida pelo Herculex® ($2,11 \log\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}\text{proteína}$) e PowerCore™ ($2,2 \log\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}\text{proteína}$), com menor atividade – as médias foram transformadas na base de log pois eram valores extremamente pequenos.

A comparação da expressão de POX entre as infestações fica claro que quanto maior o dano causado pela alimentação da lagarta maior a produção das enzimas oxidativas, havendo diferença significativa entre elas. A infestação com lagarta resistente proporcionou maior consumo de área foliar quando comparada com as outras infestações, assim houve maior estresse oxidativo, isso é, maior produção de POX ($2,43 \log\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}\text{proteína}$), seguido pelos danos causados com lagarta suscetível ($2,03 \log\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}\text{proteína}$) e plantas sem danos ($1,9 \log\mu\text{KAT}.\mu\text{g}^{-1}\text{proteína}$).

Figura 10 - Atividade da enzima POX nos fatores Capacidade de campo, híbridos de milho e infestação



4.2.4 Fenóis

Os compostos fenólicos apresentaram interação tripla significativa ($GL_{12,72} = 3,683$; $p = 0,0002$) e CV% 15,82. Nesse caso, as variáveis foram desdobradas para analisar o comportamento de cada fator dentro dos níveis dos demais. Assim, foram analisados a interação das capacidades de campo junto das infestações nos três híbridos estudados (Figura 11).

Em condição de estresse severo por déficit (50% CC), as plantas sem infestações dos híbridos Optimum® Intrasect® e PowerCore™ apresentaram diferenças significativas, com as maiores taxas do composto ($1,03$ e $0,89$ mg.gMS⁻¹, respectivamente), diferenciando-se da tecnologia Herculex® ($0,59$ mg.gMS⁻¹). Quando infestadas com lagartas suscetíveis a maior produção de fenóis proveio do Optimum® Intrasect®, diferenciando-se dos demais. Sob infestação de lagartas resistentes não houve diferenças significativas para nenhum híbrido.

Sob estresse moderado, 75% da CC, e sem danos de insetos a tecnologia Herculex® apresentou a menor taxa de produção de fenóis ($0,65$ mg.gMS⁻¹) diferenciando-se significativamente da PowerCore™ e Optimum Intrasect® ($0,89$ e $0,91$ mg.gMS⁻¹, respectivamente), quando sob ataques das lagartas suscetíveis os híbridos de milho não se diferenciaram significativamente. E as plantas sob ataques

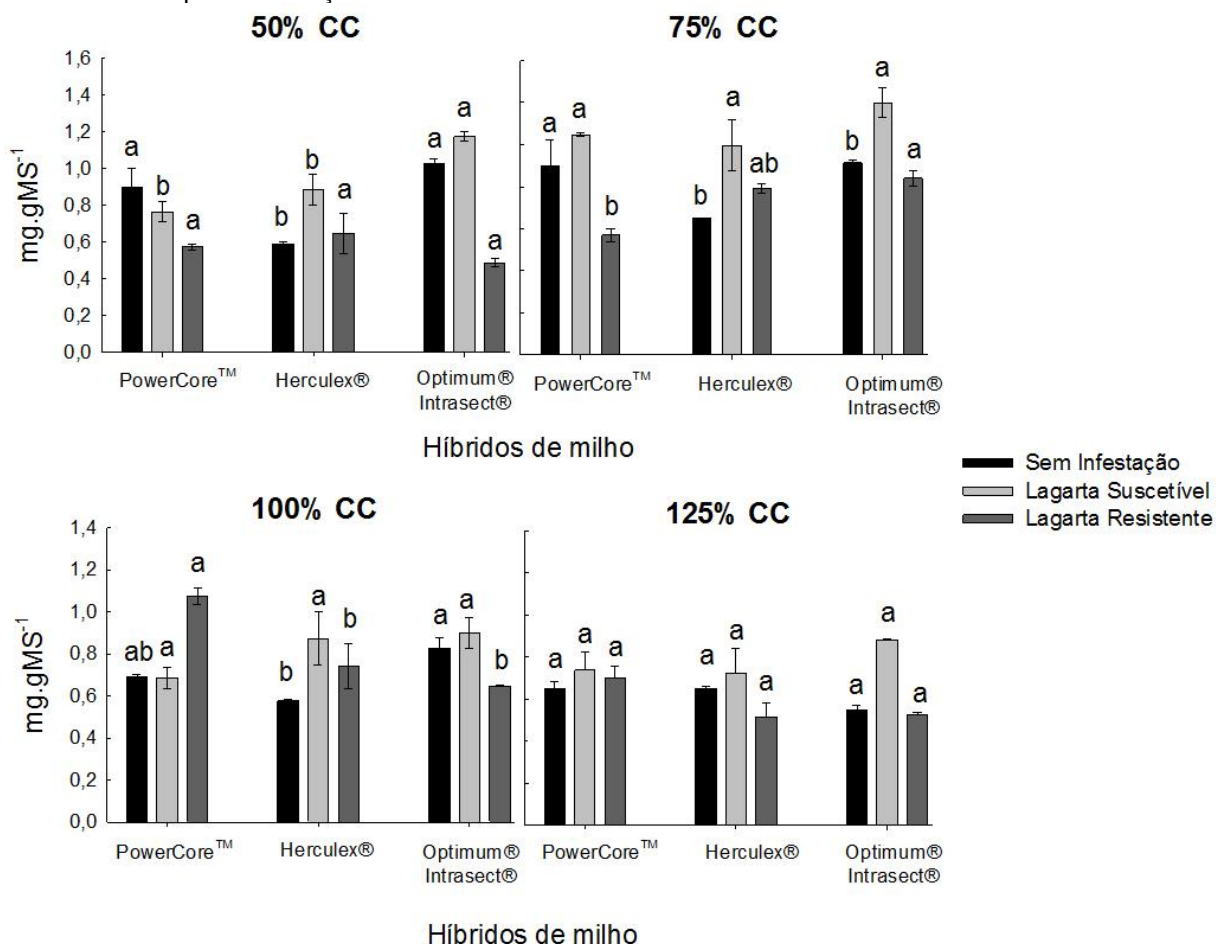
de insetos resistentes foram significativamente diferenciadas entre si, a maior produção foi para a tecnologia Optimum Intrasect® (0,84 mg.gMS⁻¹) e a menor para PowerCore™ (0,57 mg.gMS⁻¹), o Herculex® não se diferenciou de ambas.

Em condição hídrica ideal (100%) sem infestação o híbrido Optimum® Intrasect® (0,83 mg.gMS⁻¹) teve a maior produção de fenol, diferenciando-se do PowerCore™ (0,69 mg.gMS⁻¹), o Herculex® teve produção intermediária não diferenciando-se de ambos.

Para a infestação com lagartas suscetíveis não houve diferenças significativas entre os híbridos e para a infestação com lagartas resistentes o PowerCore™ se diferenciou dos demais com a maior produção de fenóis (1,07 mg.gMS⁻¹).

A liberação de fenóis acima da CC (125%) não diferenciou-se em nenhum aspecto, ou seja, sob as diferentes infestações nos diferentes híbridos não houve diferenças significativas.

Figura 11 - Expressão de fenóis para os híbridos de milho no desdobramento de diferentes capacidades de campo e infestações



Obs: as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente (Tukey $p < 0,05$) nas colunas de mesma cor, dentro de cada híbrido

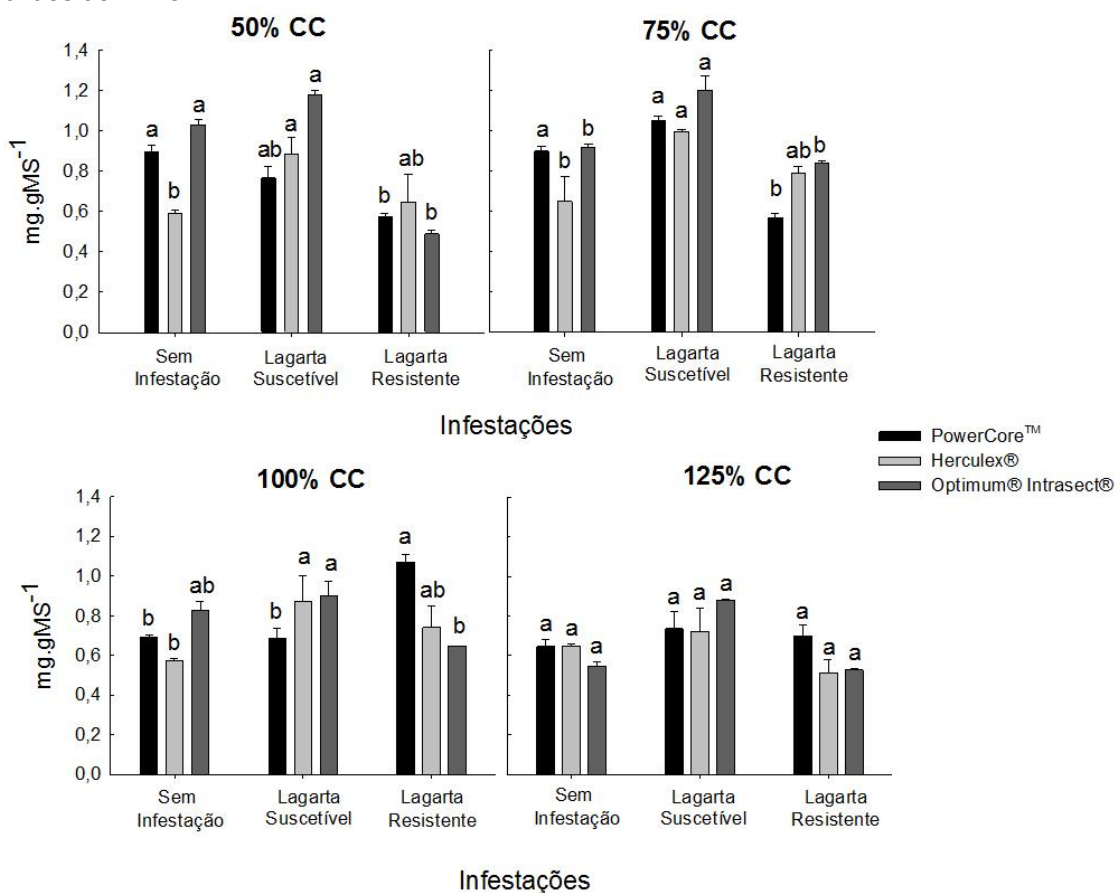
Quando sob estresse severo (50% CC), o híbrido PowerCore™ apresentou diferença significativa entre as três infestações, com maior produção sem sofrer danos de ataques ($0,89 \text{ mg.gMS}^{-1}$) e menor quando infestado com lagartas resistentes ($0,57 \text{ mg.gMF}^{-1}$), os ataques de lagartas suscetíveis não se diferenciaram dos extremos. Para o híbrido Herculex® foi observada significância, com menor produção de fenóis em plantas não infestadas ($0,59 \text{ mg.gMS}^{-1}$) e a maior em plantas sob ataque de lagartas suscetíveis ($0,88 \text{ mg.gMS}^{-1}$), as plantas infestadas com lagartas resistentes não se diferenciaram das demais. Para o milho Optimum® Intrasect® houve significância para as plantas sem infestação e as plantas submetidas ao ataque de lagartas suscetíveis ($1,02$ e $1,2 \text{ mg.gMS}^{-1}$, respectivamente) que foram as maiores taxas.

Quando submetidas ao déficit moderado (75% CC), o híbrido PowerCore™ teve diferenças significativas entre as infestações, para as plantas que tiveram ataque das lagartas suscetíveis e sem infestação com altas taxas de fenóis ($1,05$ e $0,89 \text{ mg.gMS}^{-1}$, respectivamente) e a menor sob ataque de lagarta resistente ($0,57 \text{ mg.gMS}^{-1}$). A resposta do Herculex® à produção de fenóis também foi significativa, a menor taxa foi obtida em plantas sem infestação ($0,65 \text{ mg.gMS}^{-1}$) e a maior em plantas infestadas com lagartas suscetíveis ($1,0 \text{ mg.gMS}^{-1}$) – as plantas sob ataques das lagartas resistentes não se diferenciaram de ambas.

Na capacidade de campo de 100%, as plantas de milho PowerCore™ se diferenciaram significativamente quando atacadas por lagartas resistentes ($1,07 \text{ mg.gMS}^{-1}$) com a maior produção de fenóis do que quando submetida as outras infestações. O híbrido Herculex® também foi significativo as infestações, a menor taxa de fenóis foi obtida quando não infestado ($0,58 \text{ mg.gMS}^{-1}$) e a maior sob danos de lagartas suscetíveis ($0,87 \text{ mg.gMS}^{-1}$), os ataques de lagartas suscetíveis não se diferenciaram dos demais. Para a tecnologia Optimum Intrasect® houve diferenças significativas, a maior produção de fenóis ocorreu quando as plantas foram submetidas ao ataque de lagartas suscetíveis ($0,90 \text{ mg.gMS}^{-1}$) e a menor para ataque de lagartas resistentes ($0,65 \text{ mg.gMF}^{-1}$ ataque de lagartas suscetíveis) – plantas que não sofreram infestação não se diferenciaram das demais.

Em estresse hídrico em excesso (125%) para as tecnologias PowerCore™ e Herculex® não houve significância entre os diferentes tipos de infestação. O híbrido Optimum® intrasect® apresentou diferenças significativas, produzindo altas taxas de fenóis quando infestados por lagartas suscetíveis ($0,88 \text{ mg.gMS}^{-1}$) (Figura 12).

Figura 12 - Expressão de fenóis para infestação no desdobramento de diferentes capacidades de campo e híbridos de milho



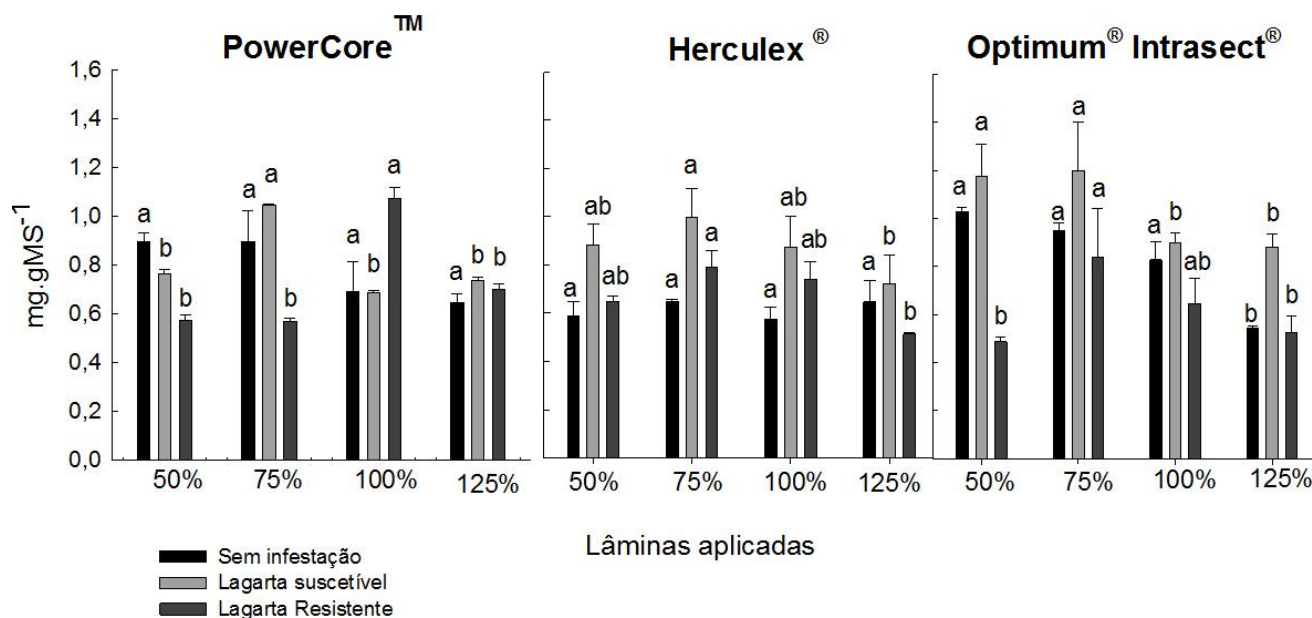
Obs: as médias seguidas pelas mesmas letras não se diferem estatisticamente (Tukey $p < 0,05$) nas colunas de mesma cor dentro de cada tipo de infestação

Para finalizar, a última análise da produção de fenóis se deu sob as capacidades de campo no desdobramento de híbridos de milho e infestações (Figura 13). O híbrido PowerCore™ não apresentou diferenças significativas sob as capacidades de campo quando não infestado. Sob ataque das lagartas suscetíveis houve diferença significativa, a maior taxa de fenóis foi a 75% CC (1,05 mg.gMS⁻¹), as demais não se diferenciaram. Em infestação de lagartas resistentes a significância se deu na lâmina ideal (100% CC) em que houve a maior liberação de fenóis (0,07 mg.gMS⁻¹) quando comparadas com as outras lâminas.

Para a tecnologia Herculex®, as plantas que não sofreram danos não apresentaram significância entre as lâminas. Em plantas infestadas com lagartas suscetíveis, houve significância, a maior produção de fenóis se deu sob a lâmina de 75% (1,0 mg.gMS⁻¹) e a menor taxa foi sob estresse por excesso de água a 125% CC – as lâminas 100% e 50% não diferiram dos extremos. A infestação com lagartas resistentes apresentou o mesmo comportamento da infestação suscetível, também foi

significativa, em que maior taxa foi na CC de 75% ($0,79 \text{ mg.gMS}^{-1}$) e a menor a 125% ($0,51 \text{ mg.gMS}^{-1}$), as outras duas não se diferenciaram das demais.

Figura 13 - Expressão de fenóis para os níveis de água no desdobramento diferentes híbridos de milho e infestações



Obs: as médias seguidas pelas mesmas letras não se diferem estatisticamente (Tukey $p < 0,05$) nas colunas de mesma cor, capacidades de campo (%)

4.2.5 Fenilalanina-amonia-liase (PAL)

A atividade enzimática não apresentou significância para nenhum dos fatores estudados e nem para as interações, a interação tripla ($GL_{12,72} = 0,898$; $p = 0,5531$) e CV% 8,19.

4.5.6 Polifenoloxidase (PPO)

A atividade enzimática não apresentou significância para nenhum dos fatores estudados e nem para as interações, a interação tripla ($GL_{12,72} = 0,465$; $p = 0,928$) e CV% 23,77.

5. DISCUSSÃO

As respostas das culturas aos estresses hídricos podem ser complexos e variam de acordo com a duração do mesmo (LIU, 2010). O presente estudo demonstrou que as diferentes capacidades de campo afetaram a produção de matéria fresca e seca. As plantas que foram submetidas aos déficits hídricos (estresse severo 50% e estresse moderado 75% CC) apresentaram os menores acúmulos de biomassa. A baixa disponibilidade hídrica no solo proporciona menor absorção de nutrientes e reduz as trocas gasosas, gerando impacto direto no processo fisiológico e metabólico das plantas.

Quando a escassez de água ocorre, as primeiras respostas metabólicas para amenizar as perdas de água para o ambiente são o fechamento dos estômatos e a diminuição da transpiração. Com isso, o processo de assimilação de carbono e outros nutrientes é afetado, fazendo com que o desenvolvimento da cultura seja lento ou mesmo que as plantas apresentem menor porte, reduzindo o tamanho dos entrenós e a área foliar – com menor expansão foliar, há redução na taxa de fotossíntese líquida e nas quantidades de fotossistemas presentes na folha, assim induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio. A característica morfológica para evitar a perda de água é o fechamento e enrolamento das folhas durante as horas mais quentes do dia (YAN; ZHONG; SHANGGUAN, 2015 ;TAIZ, ZEIGER, 2013; GE et al., 2012; TERZI, 2010; FAROOQ 2009). Quando as plantas são submetidas a déficit hídrico a parte aérea tem menor desenvolvimento, investindo os fotoassimilados no crescimento e expansão radicular para maior absorção de água (DE SOUZA et al., 2016).

Quanto ao teor relativo de água na planta, o híbrido Optimum® Intrasect® apresentou o maior destaque em relação as demais tecnologias. Apesar do pouco desenvolvimento e baixo acúmulo de biomassa esse milho apresentou a maior quantidade de água nos tecidos, isto foi possível pois a grande absorção de água demonstrou a capacidade de turgidez das células que estavam desidratadas (MARECO et al., 2013).

A imposição de déficits hídricos para plantas de milho em estágio fenológico de V8, promove alteração bioquímicas iniciando a produção de compostos secundários e de ERO's, como o acúmulo de peróxido em cloroplastos e no mesófilo (ZHAO et al., 2016). Além das ERO's, os compostos secundários formados como os fenóis, têm a função primordial no metabolismo de proteção das plantas, como de proteger as

plantas quando atacadas por insetos liberam esses compostos que são deterrentes aos herbívoros, também podem estar co-relacionados as enzimas de estresses como PPO e POX apresentando um efeito sinérgico a resposta de defesa.

A interação dos híbridos de milho, infestações e os estresses hídricos demonstraram diversas liberações de fenóis, de modo geral as plantas sob baixas CC e ataque de lagartas apresentaram maior expressão quando comparada com as plantas com maior disponibilidade de água, sugerindo assim que os déficits apresentem um efeito sinérgico junto aos danos dos herbívoros. Dentre as tecnologias estudadas, o Optimum® Intrasect® obteve as maiores taxas de fenóis, isso pode ter correlação a fragilidade da tecnologia exposta ao déficit hídrico, sendo potencializada quando ocorre o ataque de lagartas.

Com a explosão oxidativa causada por várias fontes de estresses, os fatores abióticos e/ou bióticos promoveram o aumento da atividade da SOD que é instantaneamente ativada, pois é considerada a primeira enzima na linha de defesa. A SOD é responsável pela dismutação dos radicais $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2 (BREUSEGEM et al., 2001). O aumento da SOD nos híbridos de milho em estudo ativou o sistema de defesa das plantas, o mesmo foi constatado por Swiatek (2014), em que os híbridos de milho transgênicos expostos ao déficit hídrico e ao ataque de ácaros rajados (*Tetranychus urticae*) (KOCH, 1836), também apresentaram elevação na taxa de produção da SOD.

A ação da SOD produz o substrato para ativação de outras enzimas, como a peroxidase, que degrada o peróxido de hidrogênio, e a atividade dessa enzima é caracterizada pela interação inseto-planta, sendo um dos principais meios de defesa das plantas (VAN LOON, 2006; KEHR, 2006).

Singn et al. (2013) demonstraram que plantas de feijão caupi, tomate e algodão quando infestadas artificialmente com insetos mastigadores, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera, Noctuidae), e sugadores, *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera, Aleyrodidae), permitindo o ataque por 48h e depois analisada a atividade da peroxidase, apresentou as maiores taxas para as plantas que tiveram ataques de *Spodoptera* sp. Sendo assim, neste estudo todos os híbridos apresentaram expressão de peroxidase, mas quando a planta infestada com uma lagarta resistente ao milho *Bt* apresentou as maiores taxas de enzimas comparando com a infestada com uma lagarta da mesma espécie, mas suscetível à tecnologia. A maior atividade pode estar

correlacionada com a capacidade de alimentação dos indivíduos resistentes, por não desenvolverem os sintomas de infecção, permaneceram alimentando-se da planta. Assim como as plantas, quando sob estresses, os insetos também produzem ERO's para mitigar possíveis danos celulares (ALI et al., 2016).

Dessa forma, fica expresso que as plantas transgênicas apresentam altas taxas de peroxidase (comparadas com plantas convencionais) mesmo quando não são atacadas por insetos, isso implica que a atividade da enzima peroxidase pode afetar a expressão de outros genes envolvidos na resistência de pragas (SUZUKI et al., 2012)

Com toda a produção de enzimas de estresse para amenizar e controlar os efeitos adversos das ERO's no metabolismo das plantas, a produção de proteínas nos vegetais foi afetada. As plantas limitaram a síntese de proteína e passaram a aumentar a atividade de enzimas relacionadas ao combate de ERO's – resultante da transição do metabolismo da síntese proteica para hidrólise (BILGIN et al., 2010; LOWER, 2009).

Além do ataque de insetos, em cultivos transgênicos quando sob estresse abiótico, tal qual déficit hídrico, há a diminuição de proteínas solúveis contidas nas folhas afetando a produção de proteínas *Bt* (DONG; LI, 2007). A expressão de proteínas também pode variar de acordo com a idade da planta, e são mais ativas em tecidos verdes, assim decrescem na fase reprodutiva (RAO, 2005).

Sendo assim, os híbridos estudados apresentaram as menores quantidades de proteínas quando atacados por lagartas resistentes, devido a capacidade de ingestão sem que haja o efeito do *Bt*, enquanto as plantas que não foram infestadas apresentaram quantidades consideráveis de proteínas. A alta expressão da atividade das enzimas peroxidase e superóxido-dismutase foram suficientes no combate de ERO's inviabilizando outras como polifenoloxidase e fenilalanina-amônia-liase. Entretanto também limitaram a produção de proteínas totais que são primordiais quando as plantas são transgênicas.

6. CONCLUSÕES

Os híbridos de milho (PowerCore™, Herculex® e Optimum® Intrasect®) quando submetidos ao estresse hídrico apresentaram a conversão da energia da planta para a produção de defesas antioxidantes, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) afim de minimizar o estresse oxidativo nos tecidos.

Assim, plantas com a tecnologia Herculex® conseguiu o maior acúmulo de massa seca mesmo sob déficit hídrico, e quando comparada ao crescimento das tecnologias estudadas. No entanto, as plantas Optimum® Intrasect® apresentaram o desenvolvimento limitado e com baixa produção de matéria seca.

As consequências do estresse hídrico junto a infestação artificial das lagartas promoveram aumento das enzimas de estresses, tais como a superóxido-dismutase (SOD) e peroxidase (POX) nos três híbridos de milho. Assim, a atividade enzimática proporcionou diminuição das atividades das proteínas totais, que são de suma importância por estarem relacionadas com a produção das proteínas *Bt* que realizam o controle da fase imatura dos lepidópteros.

Portanto, durante a safra 2013/14 as condições meteorológicas favoreceram a extensão de veranicos, causando estresses nas tecnologias que estavam em campo. Promovendo a diminuição no controle das populações de inseto-praga, *Spodoptera frugiperda*, além de favorecer espécies resistentes a tecnologia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL 2016. **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP – Consultoria & Agroinformativos, 2016, p. 409-444.
- ALI, A. et al. Response of antioxidant enzymes in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to thermal stress. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1–9, 2016.
- ANDOW, David A. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, v. 4, p. 142-199, 2008.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996–1001, 2010.
- BILGIN, D. D.; ZAVALA, J. A.; ZHU, J. IN, Clough, SJ, Ort, DR, and Delucia, EH (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. **Plant Cell Environ**, v. 33, p. 1597-1613.
- BOTTON, M. et al. Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 2, p. 207–212, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–59, 1976.
- BREUSEGEM, F.V., VRANOVÁ, E., DAT, J.F. & INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161. p. 405-414. 2001.
- BUSATO, G.R. et al. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, v.34, p.743-750, 2005.
- BUSATO, G. R. et al. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações do biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, p.329-335, 2005.
- CAPINERA, J. L. Encyclopedia of entomology. **Springer**, Dordrecht, The Netherlands. 2nd ed., v. 1-4, p. 4346, 2008.
- CARRIÈRE, Y.; FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to Bt Crops? Trends in Biotechnology. **Elsevier Ltd**, 2016.
- CONAB. **Estimativa de safra**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 6 dez. 2016.

CONAB. **Perspectiva para a agropecuária safra 2013/2014**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_13_14_55_32_perspectivas_da_agropecuaria_2013.pdf>. Acessada em: 18 dez 2016.

CONAB. **Levantamento safra 2014/2015**. 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acessada em: 18 dez 2016.

CTNBIO. **Transgênicos**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/>>. Acesso em: 7 dez. 2016.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum*. Sete Lagoas, Embrapa Milho e Sorgo, 4p. (Comunicado Técnico 98) (2004).

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**, v.76, p. 1052-1054, 1983.

DAI, A. Drought under global warming: a review. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change**, v. 2, n. 1, p. 45-65, 2011.

DE SOUZA, B. H. S. et al. Feeding non-preference by *spodoptera frugiperda* and *spodoptera eridania* on tomato genotypes. **Revista Ceres**, v. 60, n. 1, p. 21–29, 2013.

DE SOUZA, T. C. et al. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 330–339, 2016.

DHURUA, S.; GUJAR, G. T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Management Science**, v. 67, n. 8, p. 898–903, 2011.

DONG, H. Z.; LI, W. J. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 193, n. 1, p. 21–29, 2007.

DOURADO NETO, D. et al. Programa SWRC (Version 3.0): Soil-Water Retention Curve (Software). Piracicaba: ESALQ; Davis: University of Califórnia, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PEAQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: EMBRAPA Produção de Informação; Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, p. 412, 2013.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. **Antioxid Redox Signal**, v.11, p. 862–905, 2009.

GALLO, D. N. et al. **Entomologia agrícola**. Fundacao de Estudos Agrários Luiz de

Queiroz, 2002.

GASSMANN, A. J. et al. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22629, 2011.

GE, T. et al. Effects of water stress on growth, biomass partitioning, and water-use efficiency in summer maize (*Zea mays* L.) throughout the growth cycle. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 3, p. 1043–1053, 2012.

GHINI, R. et al. Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre as doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 16, p. 1-37, 2008.

GIANNOPOLITIS, C. N. et al. Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Phys.**, v. 59. p. 309-314, 1977.

GOMES, E. R. et al. Efeito da fertirrigação com potássio sobre o solo e produtividade do morangueiro, **Irriga, Edição Especial, 20 anos Irriga + 50 anos FCA**, p, 107-122, 2015.

GREENE, G. L. et al. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J Econ Entomol**, v.69, p. 487-488, 1976.

GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. S. & DA CUNHA, U. S. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B (Coord.). **Produção de milho e sorgo em várzea**. 2000, p. 87-102.

HENNESSY, E. J.; PARKER, A. E.; O'NEILL, L. A. J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 4, p. 293-307, 2010.

INMET. **Instituto nacional de meteorologia**. Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em 10 dez. 2016.

ISAAA. **The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications**. Disponível em <<http://www.isaaa.org>> Acesso em 20 dez. 2016.

IPCC. Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas. Disponível em <<https://www.ipcc.ch/>>. Acesso em 21 dez. 2016.

JACKSON, R. E. et al. Cross-resistance responses of CryIAc-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein vip3A. **Journal of economic entomology**, v. 100, n. 1, p. 180–186, 2007.

JOHNSON, C.; BISHOP, A. H. *Bacillus thuringiensis*. **Mortality**, v. 144, n. 71, p. 138–144, 1998.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.

KEHR, J. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. **Journal of Experimental Botany**. v. 57.

n. 4. p. 767-774, 2006.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Phys.**, v. 34. p. 713-721, 1999.

KRONER, K. H. © 19 8 7 Nature Publishing Group
<http://www.nature.com/naturebiotechnology>. **Nature**, p. 7–9, 1987.

LIMA, G. P. P. et al. Polyamines and peroxidase activity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under saline stress. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 01, 1999.

MAPA AGROFIT. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_
 >. Acesso em: 6 dez. 2016.

MARECO, R. A.; LOPES, N. F. Fisiologia vegetal (p. 486). **Viçosa: Ed. UFV**, 2013.

MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. Pragas: manejo integrado de pragas em lavouras plantadas com milho geneticamente modificado com gene bt (Milho Bt). In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MUNNÉ-BOSCH, S.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. The Impact of Global Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance 1 [W]. v. 161, n. January, p. 5–19, 2013.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50–54, 2014.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba, Fealq, 134 p. 2001.

PEIXOTO, H. P. P. et al. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev.Bras. Fis. Vegetal**, v. 11. n. 03. p. 137-43, 1999.

PETERS, G. P. et al. Rapid growth in CO₂ emissions after the 2008-2009 global financial crisis. **Nature Climate Change**, v. 2, n. 1, p. 2-4, 2012.

PIRES, G. F. et al. Increased climate risk in Brazilian double cropping agriculture systems: Implications for land use in Northern Brazil. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 228–229, p. 286–298, 2016.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Mem Am Entomol Soc.** v.43, p.1-202, 2002.

SCANDALIOS J. G. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005.

SHEFFIELD, J.; WOOD, E. F. Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. **Climate dynamics**, v. 31, n. 1, p. 79-105, 2008.

SINGH, H. et al. Differential peroxidase activities in three different crops upon insect feeding. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 9, p. 1–7, 2013.

STALLER, J.; TYKOT, R.; BENZ, B. Histories of Maize Multidisciplinary Approaches to the Prehistory, Linguistics, Biogeography, Domestication, and Evolution of Maize. n. October 2014, p. 705, 2006.

STORER, Nicholas P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

SUZUKI, H. et al. Effects of Elevated Peroxidase Levels and Corn Earworm Feeding on Gene Expression in Tomato. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 10, p. 1247–1263, 2012.

TABASHNIK, Bruce E. et al. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 199-202, 2008.

TERZI, R.; SAGLAM, A.; KUTLU, N.; NAR, H.; KADIOGLU, A. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photo- system II and antioxidant enzyme activities of Phaseolus vulgaris cultivars. **Turk J Bot.**, v. 34. p. 1–10. 2010.

USDA. **Statistics of grain and feed.** Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2015/Chapter01.pdf>. Acesso em: 6 dez. 2016.

VAN GENUTCHEN, M. T. H. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of insaturated. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 41, p. 892 – 898, 1980.

VAN HEERWAARDEN, J. et al. Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 3, p. 1088–1092, 18 jan. 2011.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN RENSBURG, J. B. J. First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal (p. 918). **Porto Alegre: Artmed**, 2013.

YAN, W.; ZHONG, Y.; SHANGGUAN, Z. Evaluation of physiological traits of summer maize under drought stress. v. 4710, n. October, 2015.

ZHAO, F. et al. The Difference of Physiological and Proteomic Changes in Maize Leaves Adaptation to Drought, Heat, and Combined Both Stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. October, p. 1471, 2016.

8. APÊNDICE – ESTATÍSTICA

8.1 Análises morfológicas

Massa fresca

Capacidade Campo	PowerCore™	Herculex®	Optimum® Intrasect®
50%	91,63 Ab	93,19 Ab	117,98 Aa
75%	95,28 Aa	94,51 Aa	109,09 Aa
100%	95,15 Ab	105,95 Ab	131,13 Aa
125%	99,98 Aa	102,49 Aa	111,59 Aa

Massa seca

Capacidade Campo	PowerCore™	Herculex®	Optimum® Intrasect®
50%	22,87 Aab	18,98 Ab	5,97 Bb
75%	16,16 Bb	20,18 Bb	12,52 Bb
100%	17,46 ABab	23,09 Ab	10,18 Bb
125%	25,99 Ba	43,43 Aa	22,95 Bb

Teor de água relativo na planta

Híbridos	Médias
PowerCore	95,51 b
Herculex	99,04 b
Optimum Intrasect	117,44 a

8.2 Análises bioquímicas

Proteínas totais

Híbridos	Sem infestação	Lagarta suscetível <i>Bt</i>	Lagarta resistente <i>Bt</i>
PowerCore™	94,92 ± 10,38 Aa	77,82 ± 10,8 Aab	54,84 ± 7,3 Bb
Herculex®	50,16 ± 5,02 Aa	81,06 ± 11,28 Aa	61,64 ± 6,81 Aa
Optimum® Intrasect®	94,92 ± 10,05 Aa	69,43 ± 11,15 Aa	73,50 ± 8,5 Aa
F	0,0340		
CV (%)	49,56		

*médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas = linha

** médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas = coluna

Superóxido-dismutase (SOD)

Híbridos	Sem infestação	Lagarta suscetível <i>Bt</i>	Lagarta resistente <i>Bt</i>
PowerCore™	76,71 ± 5,75 Bb	75,64 ± 9,45 Bb	126,7 ± 10,59Aa
Herculex®	84,13 ± 10,73 Bb	107,85 ± 11,27 Aab	136,19 ± 7,32 Aa
Optimum® Intrasect®	75,64 ± 4,71 Bb	81,13 ± 9,77 Bb	96,59 ± 6,27 Bb
F	0,0009		
CV (%)	49,65		

*médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas = linha

** médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas = coluna

Peroxidase (POX)

Capacidade Campo	Médias	Híbridos	Médias	Infestação	Médias
50%	2,05 ± 0,06 b	PowerCore™	2,06 ± 0,05 a	Sem infestação	1,90 ± 0,04 c
75%	2,08 ± 0,06 ab	Herculex®	2,12 ± 0,05 a	Lagarta suscetível Bt	2,04 ± 0,04 b
100%	2,14 ± 0,05 ab	Optimum® Intrasect®	2,20 ± 0,06 a	Lagarta resistente Bt	2,44 ± 0,04 a
125%	2,23 ± 0,06 a				
F	3.050		2.840		50.932
CV%	11.02				

Fenóis

Híbrido PowerCore™			
Capacidade Campo	Sem infestação	Lagarta suscetível Bt	Lagarta resistente Bt
50%	0,894 ± 0,03 a	0,77 ± 0,01 b	0,57 ± 0,02 b
75%	0,897 ± 0,12 a	1,05 ± 0,00 a	0,57 ± 0,01 b
100%	0,693 ± 0,00 a	0,69 ± 0,00 b	0,69 ± 0,04 b
125%	0,677 ± 0,03 a	0,74 ± 0,01 b	1,07 ± 0,02 a
F	3,47	5,25	11,24
Híbrido Herculex®			
Capacidade Campo	Sem infestação	Lagarta suscetível Bt	Lagarta resistente Bt
50%	0,59 ± 0,05 b	0,88 ± 0,08 ab	0,65 ± 0,02 ab
75%	0,65 ± 0,00 b	0,99 ± 0,12 a	0,79 ± 0,06 a
100%	0,58 ± 0,04 b	0,87 ± 0,12 ab	0,74 ± 0,00 ab
125%	0,65 ± 0,08 b	0,72 ± 0,11 b	0,51 ± 0,00 ab
Híbrido Optimum® Intrasect®			
Capacidade Campo	Sem infestação	Lagarta suscetível Bt	Lagarta resistente Bt
50%	1,03 ± 0,01 a	1,17 ± 0,13 ab	0,48 ± 0,02 b
75%	0,95 ± 0,03 a	1,19 ± 0,20 a	0,84 ± 0,20 a
100%	0,83 ± 0,03 a	0,90 ± 0,10 ab	0,65 ± 0,00 ab
125%	0,55 ± 0,05 b	0,88 ± 0,05 b	0,53 ± 0,06 b
F	2,64	3,42	12,40

Capacidade de Campo 125%			
Híbridos	Sem infestação	Lagarta suscetível <i>Bt</i>	Lagarta resistente <i>Bt</i>
PowerCore™	0,89 ± 0,03 a	0,77 ± 0,01 b	0,57 ± 0,02 b
Herculex®	0,59 ± 0,05 b	0,88 ± 0,08 b	0,65 ± 0,02 b
Optimum® Intrasect®	1,03 ± 0,01 a	1,17 ± 0,13 a	0,49 ± 0,02 b
Capacidade de Campo 100%			
Híbridos	Sem infestação	Lagarta suscetível <i>Bt</i>	Lagarta resistente <i>Bt</i>
PowerCore™	0,89 ± 0,12 a	1,05 ± 0,00 b	0,57 ± 0,01b
Herculex®	0,65 ± 0,00 b	0,99 ± 0,12 b	0,79 ± 0,06 ab
Optimum® Intrasect®	1,03 ± 0,03 a	1,19 ± 0,35 b	0,84 ± 0,00 a
Capacidade de Campo 75%			
Híbridos	Sem infestação	Lagarta suscetível <i>Bt</i>	Lagarta resistente <i>Bt</i>
PowerCore™	0,69 ± 0,00 ab	0,68 ± 0,00 b	1,07 ± 0,04 a
Herculex®	0,57 ± 0,04 b	0,87 ± 0,12 b	0,74 ± 0,07 b
Optimum® Intrasect®	0,83 ± 0,03 a	0,90 ± 0,10 b	0,65 ± 0,00 b
Capacidade de Campo 50%			
Híbridos	Sem infestação	Lagarta suscetível <i>Bt</i>	Lagarta resistente <i>Bt</i>
PowerCore™	0,65 ± 0,03 b	0,74 ± 0,01 b	0,69 ± 0,02 b
Herculex®	0,65 ± 0,08 b	0,72 ± 0,11 b	0,51 ± 0,00 b
Optimum® Intrasect®	0,55 ± 0,05 b	0,88 ± 0,06 b	0,52 ± 0,01 b
F	2,64	3,428	12,402
Capacidade de Campo 50%			
Infestação	PowerCore™	Herculex®	Optimum® Intrasect®
Sem infestação	0,89 ± 0,10 a	0,59 ± 0,05 b	1,03 ± 0,01 a
Lagarta suscetível <i>Bt</i>	0,77 ± 0,01 ab	0,88 ± 0,05 a	1,18 ± 0,10 a
Lagarta resistente <i>Bt</i>	0,57 ± 0,02 b	0,65 ± 0,02 ab	0,49 ± 0,02 b
Capacidade de Campo 75%			
Infestação	PowerCore™	Herculex®	Optimum® Intrasect®
Sem infestação	0,89 ± 0,12 a	0,65 ± 0,00 b	0,92 ± 0,03 b
Lagarta suscetível <i>Bt</i>	1,05 ± 0,00 a	0,99 ± 0,12 a	1,20 ± 0,20 a
Lagarta resistente <i>Bt</i>	0,57 ± 0,01 b	0,79 ± 0,06 ab	0,84 ± 0,03 b
Capacidade de Campo 100%			
Infestação	PowerCore™	Herculex®	Optimum® Intrasect®
Sem infestação	0,69 ± 0,00 b	0,58 ± 0,04 b	0,83 ± 0,03 ab
Lagarta suscetível <i>Bt</i>	0,68 ± 0,00 b	0,87 ± 0,12 a	1,20 ± 0,10 b
Lagarta resistente <i>Bt</i>	1,07 ± 0,04 a	0,74 ± 0,07 ab	0,84 ± 0,00 b
Capacidade de Campo 125%			
Infestação	PowerCore™	Herculex®	Optimum® Intrasect®
Sem infestação	0,64 ± 0,03 b	0,65 ± 0,08 b	0,54 ± 0,0 b
Lagarta suscetível <i>Bt</i>	0,73 ± 0,01 b	0,72 ± 0,11 b	0,88 ± 0,0 a
Lagarta resistente <i>Bt</i>	0,69 ± 0,02 b	0,51 ± 0,00 b	0,53 ± 0,01 b
F	6,734	10,999	8,942
CV%	15,82		