

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE Cry1F, CONTROLE DE *Spodoptera
frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E
PRODUTIVIDADE DE GRÃOS EM HÍBRIDOS DE MILHO
HOMOZIGOTOS E HEMIZIGOTOS TRANSGÊNICOS**

Kian Eghrari Moraes

Engenheiro Agrônomo

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE CRY1F, CONTROLE DE *Spodoptera
frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E
PRODUTIVIDADE DE GRÃOS EM HÍBRIDOS DE MILHO
HOMOZIGOTOS E HEMIZIGOTOS TRANSGÊNICOS**

Kian Eghrari Moraes

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro

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

2017

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que irão tirar proveito deste material.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o Incognoscível.

Agradeço aos meus pais, Susan Eghrari e Antonio José Valls de Moraes, por mostrarem que conhecer e amar a Deus é o verdadeiro propósito da vida.

Agradeço aos meus irmãos, Naim e Nabil, por todos esses anos de convivência que nos fez crescer espiritualmente.

Agradeço aos meus avós maternos, Mahrou Vahdat Eghrari (*in memoriam*) e Djalal Eghrari (*in memoriam*), por ainda jovens terem partido de sua terra natal, Irã, aperfeiçoado seus conhecimentos culturais e científicos na Suíça e Alemanha, e em 1955 desembarcarem no Brasil, entregando ao povo brasileiro a mensagem unificadora revelada por Bahá'u'lláh, que contempla a erradicação de qualquer forma de preconceito, a igualdade de direitos entre mulheres e homens, a harmonia entre ciência e religião, a eliminação dos extremos de riqueza e pobreza, e a educação compulsória. Agradeço especialmente à Maman Mahrou, por ter tido a oportunidade de conviver com ela 26 anos de minha vida, ouvindo sempre com muita atenção os fantásticos acontecimentos de sua vida, que me mostraram como buscar objetivos cada vez mais elevados.

Agradeço aos meus avós paternos, Gladis Valls de Moraes e Alarico Vargas Moraes (*in memoriam*), por terem dado todo o carinho que nós precisávamos. Agradeço mais uma vez à vovó Gladis por não ter se acomodado após ter educado oito filhos, e então, após quatro anos de intenso estudo, ter reconhecido a Revelação de Deus para esta época. Agradeço ao vovô Alarico, exemplo de vitalidade, disciplina, carinho e devoção a Deus.

Agradeço à minha namorada, Roberta Sales Domingues, pelo incentivo nos momentos difíceis, por se alegrar com as nossas vitórias durante esses dois anos, e, principalmente, por estar sempre preocupada para que nossas qualidades se multipliquem cada vez mais, se esforçando para que cada manhã seja melhor do que sua véspera.

Agradeço ao meu orientador durante o mestrado, Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro, e futuro orientador no doutorado, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho,

correções, sugestões e por ter incentivado o trabalho no momento em que tivemos certeza que este seria conduzido.

Agradecimentos especiais aos meus amigos sempre presentes no campo e no laboratório do Núcleo de Estudos em Genética e Melhoramento de Milho (NEGEMM): Carlos Caprio, Sophia Mangussi, Lucas Revolti, Flavia Alves, Camila Amaral, Gustavo Hugo, Carlos Giorgenon, Marcela Marconato, Luiz Bertasello e Élcio Samecina Jr.

Agradeço à Dow AgroSciences pela parceria no projeto e, em especial, ao Dr. André Humberto de Brito por ter fomentado a ideia do trabalho e disponibilizado todo o apoio para o desenvolvimento do mesmo. Agradeço também aos amigos da Dow que me ajudaram durante esses dois anos: Dr. Marcelo Soares, Fábio Medeiros, Fábio Jr, Vandeir Pereira, José Airton, Aline Gardini e Washington Luiz Martins.

Agradeço o Professor Dr. Odair Fernandes por todo o apoio dado na parte entomológica do trabalho.

E, finalmente, agradeço aos meus amigos Carlos Caprio, Felipe Pavani, Murilo Carrocia e Steffan Edward pelo companheirismo durante os dois anos de muita alegria que compartilhamos morando na mesma casa.

EPIGRAFE

“Enfim, essa faculdade interior do homem, escondida da vista, arranca a espada das mãos da natureza e lhe inflige um golpe tremendo. Todos os demais seres, por maiores que sejam, carecem de tais perfeições. O homem tem os poderes da vontade e da compreensão, mas a natureza não os possui. A natureza é circunscrita; o homem, livre. À natureza falta compreensão; o homem compreende. A natureza é inconsciente dos acontecimentos passados, enquanto que o homem os conhece. Nem pode ela prever o futuro, mas o homem, com seu poder de discernimento, vê aquilo que está por vir. A natureza não tem consciência de si própria, ao passo que o homem tudo percebe.

Fosse alguém supor ser o homem apenas uma parte do mundo da natureza, sendo ele dotado dessas perfeições que nada mais seriam que manifestações do mundo natural – vindo assim a natureza a ser considerada a origem de tais perfeições, e não delas privada – à essa pessoa daríamos a seguinte resposta: a parte depende do todo e não pode possuir perfeições das quais o todo é destituído.”

‘Abdu’l-Bahá

M827e Moraes, Kian Eghrari
Expressão de Cry1F, controle de *Spodoptera frugiperda*
(Lepidoptera: Noctuidae) e produtividade de grãos em híbridos de
milho homozigotos e hemizigotos transgênicos / Kian Eghrari Moraes.
-- Jaboticabal, 2017
iii, 32 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Gustavo Vitti Môro
Banca examinadora: Rinaldo Cesar de Paula, Bruno Henrique
Sardinha de Souza
Bibliografia

1. Controle de lagarta do cartucho. 2. Expressão de alelos *Bt*. 3.
Transgenia em homozigose. 4. Transgenia em hemizigose. 5. *Zea*
mays. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 631.52:633.15

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DE Cry1F, CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS EM
HÍBRIDOS DE MILHO HOMOZIGOTOS E HEMIZIGOTOS TRANSGÊNI
COS

AUTOR: KIAN EGHRARI MORAES

ORIENTADOR: GUSTAVO VITTI MÔRO

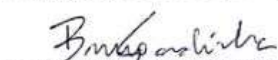
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÔRO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. RINALDO CESAR DE PAULA
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA
Departamento de Entomologia / UFLA - Universidade Federal de Lavras, MG

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KIAN EHRARI MORAES – nascido em 02 de julho de 1990, natural de Araguari-MG, filho de Susan Eghrari e Antonio José Valls de Moraes. Viveu até os 16 anos de idade em Catalão-GO e em 2007 se mudou para Uberlândia-MG. No ano de 2011, foi voluntário no Bahá'í World Centre, Haifa, Israel, e trabalhou como jardineiro nos Jardins Bahá'ís – Patrimônio Mundial da UNESCO. Na sua volta para o Brasil, em 2012, se engajou nos estudos de melhoramento de plantas, sendo duas vezes monitor da disciplina durante a graduação. Desenvolveu trabalhos com algodão colorido juntamente com o Prof. Dr. Julio Viglioni Penna, e seu trabalho de conclusão de curso foi com genótipos de feijoeiro-comum do grupo preto, sob a supervisão do Prof. Dr. Maurício Martins. No ano de 2014 foi estagiário na Dow AgroSciences na área de melhoramento de milho geneticamente modificado, sob a supervisão do Dr. André Humberto de Brito. Obteve o título de engenheiro agrônomo pela Universidade Federal de Uberlândia neste mesmo ano. Ao ingressar no mestrado na UNESP/FCAV em Jaboticabal, no ano de 2015, na área de genética e melhoramento de plantas, orientado pelo Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro, adotou como linha de pesquisa o efeito de tecnologias Bt em homozigose e hemizigose em híbridos de milho. Neste seguimento, publicou trabalhos em congressos e foi premiado com o título de melhor resumo expandido na área de agronomia, durante o XII Curso de Genética no ano de 2016, em Jaboticabal, com o trabalho intitulado “Ataque de lepidópteros em híbridos de milho hemizigotos e homozigotos para os alelos transgênicos”. Ministrou o minicurso “Principais marcadores moleculares utilizados no melhoramento de plantas”, publicando-o como capítulo no livro “Tópicos especiais em genética aplicada”, no ano de 2016. Recentemente foi aprovado para cursar o doutorado na UNESP/FCAV sob a orientação do Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro, seguindo a mesma linha de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Cenário mundial e nacional do milho	3
2.2. Melhoramento de milho	3
2.3. Transgenia em homozigose e hemizigose.....	5
2.4. <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e o efeito da tecnologia <i>Bt</i>	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Material genético.....	9
3.2. Experimentos de campo	9
3.3. Bioensaios e teste de ELISA	11
3.4. Análise dos dados.....	12
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS.....	27

**EXPRESSÃO DE Cry1F, CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E PRODUTIVIDADE DE GRÃOS EM HÍBRIDOS
DE MILHO HOMOZIGOTOS E HEMIZIGOTOS TRANSGÊNICOS**

RESUMO - Os híbridos de milho transgênicos, em geral, apresentam o *locus* transgênico em hemizigose. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do número de alelos transgênicos em híbridos de milho em relação à expressão de Cry1F nas folhas, ataque de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e a produtividade de grãos, utilizando cinco híbridos isogênicos nas versões transgênicas homozigota e hemizigota, além da versão convencional de um dos híbridos. O nível de expressão da proteína Cry1F (PRYF) foi quantificado pela técnica de ELISA. Nos experimentos de campo, conduzidos na primeira e segunda safras do ano agrícola 2015/2016, avaliou-se o ataque de *S. frugiperda* em campo (ALC), por infestação natural, e a produtividade de grãos (PG). Dois bioensaios foram realizados em laboratório para avaliar a sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1º instar (SL) alimentadas com as folhas dos híbridos. Os híbridos transgênicos, homozigotos e hemizigotos, não apresentaram silenciamento gênico. Os híbridos homozigotos apresentaram maior concentração de proteína Cry1F. Quando houve elevado ALC, na primeira safra, os híbridos transgênicos foram superiores à testemunha convencional na PG, entretanto, não houve diferença entre os híbridos homozigotos e hemizigotos. Os híbridos transgênicos também foram superiores à testemunha convencional nos bioensaios, sendo que os homozigotos apresentaram as menores médias de SL. A presença de um alelo transgênico a mais nos híbridos homozigotos propiciou comportamento genético aditivo para a expressão de Cry1F e controle de *S. frugiperda*, diminuindo ALC e SL, sem diminuir a capacidade produtiva das plantas. Diante do exposto, não há limitações para a utilização de híbridos de milho homozigotos para o transgene, pois apresentaram melhor controle de *S. frugiperda* em comparação com os híbridos hemizigotos.

Palavras-chave: Controle de lagarta-do-cartucho, Expressão de alelos *Bt*, Transgenia em hemizigose, Transgenia em homozigose, *Zea mays*

Cry1F LEAF EXPRESSION, *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) CONTROL AND GRAIN YIELD IN HOMOZYGOUS AND HEMIZYGOUS TRANSGENIC MAIZE HYBRIDS

ABSTRACT - Genetically modified (GM) maize hybrids, in general, possess the transgenic *locus* in a hemizygous state. The aim of the study was to assess the effect of the number of transgenic alleles in maize hybrids regarding the Cry1F leaf expression, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) attack and grain yield, through the evaluation of five isogenic hybrids in the homozygous and hemizygous transgenic versions and a non-GM hybrid. Cry1F protein expression levels (PRYF) were quantified by ELISA. In field experiments conducted during the summer and autumn seasons of 2015/2016, we assessed the leaf-feeding injury of *S. frugiperda* in the field (LFI) by natural infestation and grain yield (GY). Two bioassays were carried out in the laboratory to evaluate the survival of first-instar *S. frugiperda* larvae (SL) fed with the maize hybrids. Transgenic hybrids did not present gene silencing. Homozygous hybrids presented higher Cry1F expression levels than hemizygous hybrids. With high LFI during the summer season, transgenic hybrids were superior to the non-GM for GY, however, there was no difference between homozygous and hemizygous hybrids. The transgenic hybrids were superior to the non-GM hybrid in the bioassays, and the homozygotes caused the highest mortality of *S. frugiperda*. The addition of one transgenic allele in the homozygous hybrids provided an additive genetic effect, increasing PRYF and *S. frugiperda* control, whereas GY was not affected. In conclusion, there are no limitations to the use of transgenic homozygous maize hybrids, which presented better *S. frugiperda* control comparing to hemizygous hybrids.

Keywords: *Bt* expression level, Fall armyworm control, Hemizygous hybrids, Homozygous hybrids, *Zea mays*

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, atrás dos Estados Unidos e da China. Na safra 2015/16, a produção atingiu 66 milhões de toneladas em aproximadamente 16 milhões de hectares (CONAB, 2016). O cultivo de milho no Brasil é realizado em duas safras, sendo que a segunda é responsável por 2/3 do total (KIST et al., 2016). A adoção de biotecnologia no milho plantado em território brasileiro está presente em mais de 82% da área na primeira safra e 91% na segunda safra (CÉLERES, 2016).

A maioria dos híbridos de milho transgênicos desenvolvidos pelas empresas de melhoramento são hemizigotos para a transgenia, isto é, possuem apenas um alelo no *locus* que caracteriza o evento transgênico. Isso ocorre porque na obtenção do híbrido transgênico são cruzadas duas linhagens: uma homozigota para a transgenia e outra que não possui o evento transgênico (linhagem convencional). Em decorrência disso, os híbridos obtidos contêm um alelo transgênico e um alelo alternativo nulo, caracterizando a hemizigose (GUADAGNUOLO et al., 2006).

Para a introgressão de um transgene em uma linhagem convencional de milho, utiliza-se o método do retrocruzamento, que envolve o cruzamento entre um parental doador e um parental recorrente. A cada geração de retrocruzamento e seleção dos genótipos com maior expressão de proteína transgênica, a quantidade de proteínas codificada pelo “trait” aumenta, mesmo mantendo as linhagens em hemizigose para a transgenia. Após a recuperação do parental recorrente com o “trait” desejado é realizada uma autofecundação da linhagem para a obtenção do *locus* transgênico em homozigose, e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de expressão das proteínas transgênicas. Após isso, cruzam-se duas linhagens com a transgenia em homozigose para a formação de um híbrido, que apresentará acumulação máxima de proteínas por ser homozigoto para o transgene (HOWARD; HOOD, 2014). A expressão do transgene pode ser mantida ou até aumentada por meio do melhoramento de plantas (HOOD et al., 2003). A autofecundação da planta promovendo *loci* em homozigose combinada com a melhoria das características agrônômicas contribuem para o aumento da quantidade de proteína expressa (HOOD et al., 2007).

O incremento do número de cópias do transgene no genoma da planta, diferentemente do aumento da dose do gene por meio da adição de um alelo no *locus*,

não contribui para a elevação da quantidade de proteína transgênica expressa, ou seja, em alguns casos múltiplas inserções do transgene no genoma costumam resultar em menor expressão gênica do que uma única inserção (HOBBS et al., 1990; LAW et al., 2006). O aumento de proteína transgênica que é expressa na planta pode ser obtido por meio da seleção de plantas mais produtivas pelo melhoramento genético e também por meio de plantas homozigotas para o evento (STREATFIELD et al., 2002; CLOUGH et al., 2006). A homozigose do transgene pode ser benéfica em alguns casos, quando aumenta a concentração de proteína na planta; em outros, no entanto, pode ter o mesmo desempenho dos hemizigotos, causar silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional, e até ser letal (JAMES et al., 2002; HOOD et al., 2012).

Alguns eventos transgênicos *Bt* são responsáveis pelo controle de lepidópteros pragas (ISAAA 2016), entre eles a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), uma das principais pragas desfolhadoras da cultura do milho (NIU et al., 2014). Em experimentos realizados no Brasil com infestação de *S. frugiperda*, a perda na produtividade de milho variou de 17 a 57,6% (CRUZ; TURPIN, 1983; CRUZ et al., 1999; WAQUIL et al., 2002). A dose de proteínas *Bt* produzida por plantas geneticamente modificadas tem grande influência na mortalidade de *S. frugiperda* (WAQUIL et al., 2004). Com o advento dos cultivares de milho geneticamente modificados com a tecnologia *Bt*, o nível de ataque de *S. frugiperda* nas folhas foi menor e os danos na produtividade diminuíram em até 18% em comparação com cultivares convencionais (SIEBERT et al., 2012; STORER et al., 2012; FRIZZAS et al., 2014; MORAES et al., 2014; SANTOS-AMAYA et al., 2015), além de reduzir o uso de inseticidas (MEISSLE et al., 2010; BENBROOK, 2012). Na última década aumentou o número de casos de resistência de *S. frugiperda* à proteínas *Bt* (STORER et al., 2010; TABASHNIK et al., 2013; JAKKA et al., 2014). Algumas estratégias que contribuem para a eficácia do manejo de resistência de *S. frugiperda* são a piramidação de proteínas *Bt* (HUANG et al., 2014; FARIAS et al., 2015) e a utilização da área de refúgio (SHELTON et al., 2000).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivos avaliar o efeito do número de alelos transgênicos em híbridos de milho na expressão de Cry1F, no nível de ataque de *S. frugiperda* e na capacidade produtiva das plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cenário mundial e nacional do milho

A produção mundial de milho é de 1,03 bilhão de toneladas, assumindo o posto de cereal mais produzido no mundo (FAO, 2017). Os Estados Unidos são os maiores produtores de milho, com produção estimada em 386 milhões de toneladas, seguidos da China, com 216 milhões, e do Brasil, com expectativa de produzir aproximadamente 84 milhões de toneladas na safra 2016/2017. Nos últimos cinco anos a produção americana de milho cresceu mais de 110 milhões de toneladas, superando a produção total brasileira (CONAB, 2017), que teve aumento de 25 milhões de toneladas desde 2010, mais de 30% do total produzido pelo país (FAO, 2017).

Após a instabilidade climática na safra 2015/2016 pela falta de chuvas nas principais regiões produtoras de milho e o atraso no plantio da soja, a produção de milho caiu em aproximadamente 17,5 milhões de toneladas em relação ao ano anterior, reduzindo a produtividade de milho em cerca de 28% (CONAB, 2016). Para a safra 2016/2017, a tendência é de recuperação da produção e produtividade de grãos de milho, sendo a última em torno de 5249 kg ha⁻¹. A segunda safra de milho é responsável por mais de 65% da produção total, isto é, aproximadamente 56 milhões de toneladas. A preferência do cultivo de milho na segunda safra é devido à maior rentabilidade e plasticidade da cultura da soja, sendo esta plantada na primeira safra, durante a época das chuvas (CONAB, 2017).

2.2. Melhoramento de milho

O melhoramento genético e as práticas culturais são ferramentas essenciais para o aumento da produtividade de milho. Desde a domesticação da espécie há milhares de anos, plantas foram selecionadas de acordo com as necessidades de cada civilização, adaptando a cultura a vários ambientes. A partir do século XX, o rendimento de milho cresceu devido à introdução de variedades melhoradas e ao

advento dos híbridos. Nos últimos 50 anos, o uso de fertilizantes, o controle de pragas e plantas daninhas, a mecanização agrícola e a maior densidade de semeadura também contribuíram para aumentar o rendimento de milho (DUVICK, 2005).

Darwin (1878) contribuiu para o entendimento da heterose ou vigor híbrido, em seu estudo sobre endogamia e polinização aberta ao relatar que o cruzamento entre duas plantas advindas de sucessivas autofecundações apresentava desempenho superior ao dos parentais, o que era inesperado até então. A explosão de produtividade ocorrida no último século com o advento dos híbridos simples, triplos e duplos, tomou forma com Shull (1908) em seu trabalho intitulado, em tradução livre, “A composição de um campo de milho”. Neste trabalho, Shull mostrou que plantas de milho autofecundadas por sucessivas gerações, ou seja, linhagens endogâmicas, apresentavam queda brusca no seu desempenho produtivo e vigor, sendo estes recuperados imediatamente na geração seguinte após o cruzamento dessas linhagens, obtendo-se o híbrido simples. Na época, a viabilidade para a obtenção de híbridos simples era muito baixa, devido ao alto custo e baixa produção de sementes pela linhagem parental feminina. Jones (1922) mostrou que o cruzamento entre dois híbridos simples, ou seja, entre quatro linhagens, produzindo híbridos duplos, apesar de produzir menos que o híbrido simples foi a alternativa viável para a adoção dos híbridos pelos produtores, graças à considerável heterose, maior produção e menor variabilidade fenotípica que estes apresentavam frente às variedades de polinização aberta.

Contribuindo para o melhoramento genético de plantas, em meados da década de 90, pesquisas tornaram viável a introdução de proteínas *Bt* nas plantas, através da engenharia genética. Mais de 10 genes codificando várias proteínas foram identificados, contendo toxinas na forma de cristal (Cry), tóxicas à espécies de lepidópteros, dípteros e coleópteros. As proteínas Cry são ingeridas pelos insetos e se tornam ativas no intestino médio, sendo uma alternativa para a diminuição do uso de agrotóxicos (SCHULER, 1998; SCHNEPF et al., 1998).

A transformação genética tem como objetivo conferir novas características a determinado indivíduo que não as possuía, podendo ser de tolerância a herbicidas, resistência à pragas e patógenos. Pode ocorrer redução na capacidade produtiva da planta ao introduzir genes de resistência, devido à alteração da fisiologia e rotas metabólicas. Por outro lado, o custo energético com a replicação do DNA para a síntese de novas enzimas é desprezível nas plantas, diferentemente do que ocorre

nas bactérias (PURRINGTON; BERGELSON, 1997). Embora o milho seja uma cultura de grande importância econômica, poucos estudos foram feitos comparando o efeito do transgene na produtividade de híbridos transgênicos. Guadagnuolo et al. (2006) mostrou que a transgenia não interfere na capacidade produtiva da planta.

A introdução de novas características em plantas de milho através da transformação genética vai além da tolerância à herbicidas e resistência a insetos. O milho encaixa-se em uma categoria em que não é mais visto apenas como alimento, à medida que seu potencial produtivo está sendo direcionado para a obtenção de moléculas de alto custo para a produção de fármacos, enzimas industriais, nutrientes e combustíveis. Por ser a cultura mais disseminada no mundo, encontra-se na dianteira da nova revolução verde, na qual as plantas não são mais utilizadas apenas para a produção de alimentos (NAQVI et al., 2011).

2.3. Transgenia em homozigose e hemizigose

Em relação ao emprego de transgênicos na cultura do milho, a partir de 2005 foi aprovada a importação e comercialização de milho geneticamente modificado no Brasil para alimentação animal, com genes de tolerância a herbicidas e resistente a insetos (CTNBIO, 2005). A partir de 2008, o interesse do produtor rural no milho transgênico começou a crescer devido a maior facilidade em cultivá-lo em relação ao milho convencional. Como consequência, a taxa de adoção de milho transgênico no Brasil cresceu mais de 10 vezes desde 2008 (CÉLERES, 2014), representando hoje mais de 85% dos cultivares de milho plantados, dos quais 82% na safra de verão e 91% na segunda safra (CÉLERES, 2016).

Os híbridos de milho transgênicos desenvolvidos pelas empresas de melhoramento, dentre elas a Dow Agrosiences Industrial Ltda., são hemizigotos para o transgene, isto é, possuem apenas um alelo contendo o evento transgênico. Isso ocorre, pois na obtenção do híbrido transgênico são cruzadas duas linhagens, sendo uma delas homozigota para o transgene e a outra sem transgenia, denominada de linhagem convencional (GUADAGNUOLO et al., 2006). A obtenção do híbrido com a transgenia em homozigose é realizada através do cruzamento de duas linhagens transgênicas, formando híbridos que terão acumulação máxima de proteínas transgênicas por possuírem dois alelos no *locus* transgênico (HOWARD; HOOD, 2014).

Quando o “trait” está em hemizigose, apresenta dosagem genética de $\frac{1}{2} N$, enquanto indivíduos com o *locus* em homozigose podem chegar à dosagem de $2 N$, ou seja, é possível atingir uma superexpressão do transgene até quatro vezes maior em relação ao hemizigoto, quando o evento está em homozigose (HOOD et al., 2012). Caligari et al. (1993) compararam duas linhagens de tabaco, Xanthi e Samsun; a linhagem Xanthi, que teve menor expressão do transgene GUS (marcador de seleção visual em tecidos transformados), apresentou os mesmos resultados de expressão para os genótipos com transgenia em homozigose e hemizigose. Em contrapartida, a linhagem Samsun, que teve expressão de GUS muito maior, apresentou genótipos com o dobro de proteína transgênica expressa nos homozigotos quando comparada com os hemizigotos. Sendo assim, a concentração de proteína transgênica não depende apenas da quantidade de alelos transgênicos no *locus*, mas também do genótipo de cada indivíduo. Nota-se que a quantidade de proteína expressa e a concentração de mRNAs podem aumentar ao adicionar mais um alelo transgênico no *locus* da planta (LAW et al., 2006; RAMESSAR et al., 2008).

2.4. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e o efeito da tecnologia *Bt*

Conhecida como lagarta-do-cartucho e lagarta-militar, *S. frugiperda* é a principal praga da cultura do milho no Brasil. Com o aumento do cultivo de milho no país, a disponibilidade de alimento para *S. frugiperda* aumentou, o que contribuiu para seu aumento populacional, tornando-a praga não só das folhas, mas também das espigas, além de apresentar comportamento semelhante ao da lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) de cortar plântulas rente ao solo. Períodos de seca favorecem este tipo de comportamento das lagartas. Quando o ataque é muito severo, nota-se uma quantidade elevada de excreções sobre as folhas, ocasionando total destruição do cartucho do milho. O dano na produção de milho é em torno de 20% e o maior ataque é registrado próximo do início do estágio reprodutivo (GALLO et al., 2002).

O nível de ataque de lagartas de *S. frugiperda* nas folhas de milho é aferido pela escala de notas de Davis et al. (1992). Esta escala varia de 0 a 9, onde a nota 0 representa a planta não atacada; 1: pontuações de raspagens nas folhas; 2: pontuações de raspagens e menos de três raspagens circulares até 1,5 cm; 3: uma a cinco raspagens menores que 1,5 cm e de uma a três raspagens maiores que 1,5 cm;

4: plantas apresentando raspagens de 1,5 a 3,0 cm; 5: plantas com até três raspagens maiores que 3,0 cm e apresentando furos de até 1,5 cm em até duas folhas; 6: furos maiores que 1,5 cm em mais de duas folhas; 7: raspagens maiores que 5 cm e furos de 1,5 cm em mais de duas folhas; 8: raspagens de mais de 5 cm e furos com mais de 3,0 cm em várias folhas; 9: planta com o cartucho destruído.

Desde a liberação comercial de tecnologias transgênicas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) no Brasil em 2008, vários genes *Bt* foram introduzidos no milho com o objetivo de controlar a principal praga da cultura, a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*. Entre as proteínas codificadas por genes *Bt* estão Cry1Ab, Cry1F, Vip3Aa20, Cry2Ab2 e Cry1A.105, e as empresas responsáveis pela introdução destas proteínas nas plantas são Monsanto Company, Dow AgroSciences LLC, Syngenta e DuPont (Pioneer Hi-Bred International Inc.) (ISAAA, 2016).

Em 2010, a CTNBIO aprovou o milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante à herbicidas da Dow AgroSciences Industrial Ltda., denominado PowerCore™, para liberação no meio ambiente, comercialização e consumo animal e humano. O milho PowerCore™ é composto de três eventos: MON89034, TC1507 e NK603, com os respectivos organismos doadores *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces viridochromogenes* e *Agrobacterium tumefaciens*. A tecnologia codifica três proteínas para resistência a insetos lepidópteros (Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F) e duas proteínas para tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato (PAT e CP4-EPSPS, respectivamente) (CTNBIO, 2010).

Siebert et al. (2012) avaliaram a eficiência de controle de *S. frugiperda* em campo por infestação natural utilizando híbridos de milho convencionais e transgênicos, com eventos piramidados e individuais. As injúrias nas folhas foram avaliadas pela escala de notas de 0-9 (DAVIS et al., 1992), demonstrando que os híbridos convencionais tiveram a maior nota de ataque (4,4), sendo mais atacados em relação aos transgênicos, que demonstraram menor presença de lagartas e menor injúria nas folhas. Os híbridos com múltiplas proteínas *Bt*, isto é, piramidados, não se diferenciaram daqueles que possuíam somente uma proteína, apesar de terem apresentado menores números de lagartas presentes nas plantas e quantidades de injúria nas folhas. Em trabalho similar, Rule et al. (2014) infestaram artificialmente as plantas com *S. frugiperda* e concluíram que os híbridos com eventos *Bt*, piramidados ou individuais, sofreram menos ataque de lagartas nas folhas do que os não *Bt*. O uso de eventos piramidados retarda a evolução da resistência às proteínas *Bt* e promove

melhor controle de pragas do que os eventos individuais (STORER et al., 2012; NIU et al., 2014). Estudos recentes de resistência cruzada e de adoção de manejo de resistência de pragas aprovam o uso de eventos piramidados (NIU et al., 2013; HUANG et al., 2014). Zhao et al. (2003) recomendam o uso de eventos *Bt* piramidados, pois a resistência da planta a lepidópteros será mais longa do que eventos dissociados. Em bioensaios com *S. frugiperda*, Hardke et al. (2011) alimentaram lagartas com folhas de híbridos convencionais e *Bt*, observando no segundo caso menor sobrevivência de lagartas e menor injúria nas folhas, concluindo que proteínas piramidadas apresentam melhor controle de *S. frugiperda*.

2.6. Teste de ELISA

ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) é um teste imunoenzimático que parte do princípio de interação entre antígeno e anticorpo. Na presença do anticorpo, a proteína específica, chamada de antígeno, reage. Após a reação, outro anticorpo é colocado para que em contato com o substrato altere a coloração do meio, e assim, detecte a presença da proteína. A técnica também pode ser utilizada para a quantificação de proteínas, por meio da formação de uma curva padrão formada por quantidades conhecidas da proteína de interesse (MARCELINO-GUIMARÃES, 2013).

A fim de detectar e quantificar as proteínas transgênicas expressas nas plantas, a técnica de ELISA é uma opção bastante utilizada. Para eventos mais comuns, como é o caso da EPSPS, Cry1F, Cry1A e Cry2A, kits para a detecção destas proteínas estão disponíveis no mercado e são aceitos mundialmente (MARCELINO-GUIMARÃES, 2013).

Para determinar a concentração de Cry1F em folhas de milho, Su et al. (2014) utilizaram a técnica de ELISA e encontraram níveis diferentes de expressão em quatro estádios da planta. Os estádios foram: V3, V6, pendramento e floração. Relatou-se que quanto mais nova a planta maior foi a concentração de Cry1F nas folhas, sendo os estádios vegetativos V3 e V6 os que apresentaram concentrações da proteína Cry1F superiores aos estádios reprodutivos de pendramento e floração. Ao quantificar a concentração de Cry1F nas folhas de milho nos estádios V1, V3, V5, V7, V10 e reprodutivo, Tian et al. (2012) relataram que o estádio em que a planta apresentou maior expressão de proteína Cry1F foi o V3.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético

Foram utilizados 11 híbridos simples de milho pertencentes à empresa Dow AgroSciences Industrial Ltda, 10 deles com a tecnologia POWERCORE™ (PW), que confere resistência a lepidópteros (genes: *cry1Fa2*, *cry1A.105* e *cry2Ab2*) e tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio (genes: *cp4 epsps* e *pat*, respectivamente), sendo cinco deles com transgenia em homozigose (HO), cinco hemizigotos (HE) e um convencional (CO). Por motivos de confidencialidade, os híbridos foram designados de A, B, C, D e E, e, portanto, os genótipos avaliados foram AHO, AHE, ACO, BHO, BHE, CHO, CHE, DHO, DHE, EHO e EHE.

Cada híbrido foi obtido de maneira específica a fim de apresentar uma, duas ou nenhuma cópia do “trait” PW. Os híbridos homozigotos transgênicos foram obtidos através do cruzamento de duas linhagens elite homozigotas transgênicas enquanto os híbridos hemizigotos foram obtidos a partir do cruzamento de uma linhagem elite homozigota para a transgenia com uma linhagem elite convencional. Para a obtenção dos híbridos convencionais, cruzou-se duas linhagens elite convencionais. Sendo assim, a formação de cada híbrido foi feita utilizando as mesmas linhagens, isto é, a única diferença entre as linhagens foi a presença ou ausência de alelos transgênicos (Fig. 1).

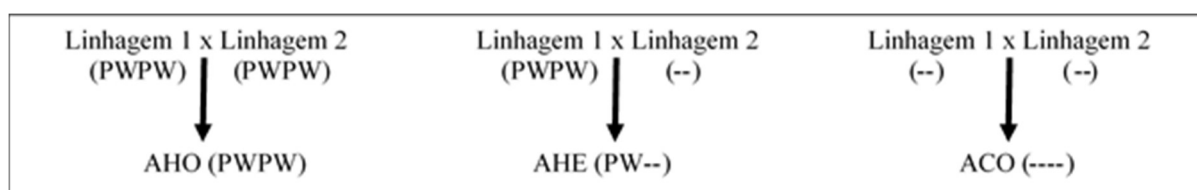


Figura 1. Esquema de obtenção das três versões do híbrido A, com a presença do alelo transgênico POWERCORE™ (PW) ou sua ausência (--): homozigoto (AHO), hemizigoto (AHE) e convencional (ACO) a partir das mesmas linhagens parentais (Linhagem 1 e Linhagem 2).

3.2. Experimentos de campo

Foram conduzidos dois experimentos de campo, um na primeira safra (semeadura: 30/09/2015) e outro na segunda safra (semeadura: 02/02/2016) do ano

agrícola de 2015/2016, na Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) (coordenadas geográficas: latitude 21° 14' S e longitude 48° 17' O), a qual possui clima Aw com verão chuvoso e inverno seco (RUBEL; KOTTEK, 2010). Os dados meteorológicos foram fornecidos pela estação agroclimatológica da FCAV/UNESP, a qual fica há aproximadamente 1 km de distância da Fazenda Experimental onde os experimentos foram conduzidos (Tabela 1).

Tabela 1. Temperatura máxima (Tmax), temperatura mínima (Tmin), temperatura média (Tmed), umidade relativa do ar (UR), precipitação (PRE) e número de dias com chuva (NDC) do ano agrícola 2015/2016.

Mês	Tmax	Tmin	Tmed	UR	PRE	NDC
Setembro/15	31,3	18,1	23,8	64,5	120,2	12
Outubro/15	34,1	19,9	25,8	62,1	149,7	8
Novembro/15	31,1	20,3	24,8	78,0	255,8	16
Dezembro/15	31,0	20,9	24,8	78,6	372,3	17
Janeiro/16	29,9	20,6	24,4	82,0	449,4	18
Fevereiro/16	31,9	21,1	25,2	78,8	201,0	14
Março/16	31,4	20,2	24,6	79,3	132,9	17
Abril/16	31,5	18,0	24,0	65,6	9,1	2
Mai/16	27,4	15,0	20,1	74,9	118,2	9
Junho/16	25,7	12,9	18,1	75,3	115,8	8

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com três repetições. Cada parcela possuiu quatro linhas de cinco metros, espaçadas em 50 cm e com 60 plantas por parcela, o que representa uma população de 60.000 plantas ha⁻¹. O manejo dos experimentos foi realizado de acordo com a recomendação para a cultura do milho (FORNASIERI FILHO, 2007). Para a confirmação de que as plantas apresentaram o evento PW fixado e controle de plantas daninhas foram realizadas duas aplicações de herbicidas, sendo a primeira aos 15 dias após a emergência das plântulas (DAE), com a aplicação de glifosato (2,5 L ha⁻¹) e a segunda aos 22 DAE, com a aplicação de glufosinato de amônio (1,2 L ha⁻¹). As aplicações foram realizadas somente nas parcelas que continham plantas transgênicas, isolando a área de aplicação para evitar que eventual deriva do produto pudesse atingir plantas das parcelas convencionais. As avaliações para identificar a ocorrência de suscetibilidade das plantas aos herbicidas foram realizadas sete dias após as aplicações. O controle de plantas daninhas nas parcelas convencionais foi realizado com herbicidas seletivos à cultura do milho. O ataque de *S. frugiperda* em campo (ALC) foi avaliado por meio da avaliação das injúrias nas folhas utilizando a escala de notas de 0-9, onde a nota

mais baixa representa a ausência de ataque de lagartas e a nota mais alta é referente à total destruição da planta (DAVIS et al., 1992). Para a análise dos dados utilizou-se a média de 10 plantas aleatórias das duas linhas centrais de cada parcela, que foram avaliadas no estágio vegetativo V6/V7, aproximadamente 35 dias após a semeadura de cada experimento. A infestação da lagarta *S. frugiperda* nos experimentos foi natural e não houve aplicação de inseticidas na área experimental. Ao final do ciclo da cultura, cada parcela foi colhida integral e separadamente e identificada. Posteriormente, a umidade dos grãos de cada parcela foi corrigida para 13% e o peso de grãos para toneladas ha⁻¹, obtendo-se a produtividade de grãos (PG, kg ha⁻¹).

3.3. Bioensaios e teste de ELISA

Os bioensaios foram instalados e conduzidos no laboratório de Ecologia Aplicada do Departamento de Fitossanidade na FCAV/UNESP, aproximadamente 30 dias após a semeadura de cada experimento. Massas de ovos de *S. frugiperda* foram coletadas em cultivos de milho na Fazenda Experimental da FCAV/UNESP cinco dias antes da semeadura dos experimentos de campo, para que ocorresse sincronia das plantas em estágio V6/V7 e a realização dos bioensaios no laboratório, coincidindo também com as avaliações de ALC. Esse período foi adequado para que as lagartas pudessem completar uma geração e então utilizar a segunda geração de lagartas no primeiro ínstar da população originária do campo.

As massas de ovos coletadas no campo foram destinadas ao laboratório e mantidas à temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 12:12h (C:E) durante todas as fases dos bioensaios. Com as lagartas de primeiro ínstar eclodidas, as mesmas foram alimentadas com a dieta de Oliveira et al. (2006) até a fase de pupa. Realizou-se a separação das pupas por sexo e estas foram depositadas em gaiolas de cruzamento (10 cm de diâmetro x 22 cm de altura) contendo cinco casais. A alimentação dos adultos nas gaiolas foi solução de água e mel na proporção de 9:1, respectivamente. Após a eclosão das lagartas da segunda geração da população de campo, os bioensaios foram instalados. Para tanto, coletou-se as folhas dos 11 híbridos em cada um dos experimentos, destacando a primeira folha fora do cartucho até atingir quantidade suficiente para compor os bioensaios, devido à diferença de tamanho das folhas. A coleta foi realizada a partir de plantas tomadas ao acaso nas parcelas, e as folhas foram mantidas em sacos de papel identificados. Cada folha coletada no campo

foi levada até o laboratório e imersa em solução de água com NaClO a 0,5%, depois lavada em água corrente e seca com papel toalha para evitar a contaminação das lagartas por patógenos presentes nas folhas. As folhas foram cortadas em pedaços de 5,0 cm por 3,5 cm.

Cada parcela foi composta por uma bandeja de plástico de maneira que cada célula desta bandeja (5,0 cm x 3,5 cm x 4,0 cm) continha uma lagarta de primeiro instar e um pedaço de folha de mesma área da célula. O bioensaio da primeira safra teve três repetições e 10 lagartas por parcela, somando 330 lagartas, enquanto o bioensaio da segunda safra foi realizado com cinco repetições, utilizando 16 lagartas por parcela e totalizando 880 lagartas. O delineamento experimental dos bioensaios foi o de blocos ao acaso. Depois de sete dias da instalação de cada bioensaio avaliou-se a sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1º instar (SL, %) e a porcentagem de lagartas com comprimento maior que 1,5 cm em cada parcela, como indicativo de desenvolvimento.

O nível de expressão da proteína Cry1F (PRYF, ng cm⁻²) foi quantificado a partir de amostras foliares de 10 plantas de cada híbrido transgênico, no estágio vegetativo V6/V7. Os híbridos foram submetidos à análise quantitativa da proteína transgênica Cry1F pelo método de ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) utilizando o kit QualiPlate para detecção de Cry1F em milho e algodão (Envirologix, Portland, ME, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. Análise dos dados

A análise conjunta das safras foi realizada para as variáveis ALC, PG e SL, desdobrando-se os graus de liberdade da fonte de variação “híbridos” e “híbridos x safras” em três subdivisões: híbridos homozigotos (HO), híbridos hemizigotos (HE) e a combinação dos três grupos (homozigoto, hemizigoto e convencional), nomeada de “Grupos” (G) no quadro de análise de variância conjunta. Dois contrastes ortogonais foram realizados a partir dos três grupos: O primeiro contraste comparou o grupo dos híbridos transgênicos (homozigoto e hemizigoto) com a testemunha convencional, seguindo o modelo: $Y_1 = m_1 + m_2 - 2m_3$. O segundo contraste, $Y_2 = m_1 - m_2$, comparou os transgênicos homozigotos e hemizigotos. Os contrastes ortogonais também foram utilizados para o híbrido A, que foi o único genótipo a possuir os

isogênicos homozigoto, hemizigoto e convencional. O teste t foi utilizado para comparar as médias da primeira e segunda safras dos híbridos homozigotos, hemizigotos e convencional, e também para comparação entre as versões homozigotas e hemizigotas de cada híbrido. A diferença entre os híbridos foi analisada por teste de Tukey. A correlação fenotípica de Pearson foi realizada a partir da média de cada variável. Todas as análises foram desenvolvidas no software R (R CORE TEAM, 2016).

4. RESULTADOS

As quatro variáveis ataque de *S. frugiperda* em campo (ALC), produtividade de grãos (PG), sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1º instar (SL) e o nível de expressão da proteína Cry1F (PRYF) apresentaram normalidade na distribuição dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Nas duas safras, tanto os híbridos transgênicos homozigotos como os hemizigotos não apresentaram susceptibilidade aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio, confirmando a presença dos genes *cp4 epsps* e *pat*, respectivamente, inseridos na tecnologia PW.

As fontes de variação “safras”, “híbridos” e a interação “híbridos x safras” da análise conjunta foram significativas para ALC, PG e SL (Tabela 2). Ao desdobrar os graus de liberdade da fonte de variação “híbridos”, o desdobramento “hemizigotos” foi significativo para a variável PG, indicando que pelo menos um dos híbridos difere dos demais. Para a mesma fonte de variação, o desdobramento “grupos”, que compara os homozigotos, hemizigotos e a testemunha convencional, foi significativo para a ALC, PG e SL, demonstrando que pelo menos um dos grupos difere dos demais. Em relação ao desdobramento dos graus de liberdade da interação “híbridos x safras”, o desdobramento do grupo “homozigotos x safras” foi significativo para a variável PG e o desdobramento “hemizigotos x safras” foi significativo para a variável SL. Considerando a mesma variável, o desdobramento “grupos x safras” foi significativo para as variáveis ALC e SL, em que pelo menos um dos grupos apresenta comportamento diferente nas safras em relação à essas características.

Nos contrastes ortogonais da primeira safra (Tabela 3), as diferenças entre os ALC foram altamente significativas para os dois contrastes. No contraste entre os híbridos transgênicos e a testemunha convencional, os híbridos transgênicos apresentaram média de notas de 2,78, enquanto a média do convencional (MCO) foi de 6,58, isto é, o ataque sofrido pelos híbridos transgênicos foi menos que a metade do que o sofrido pela testemunha convencional. O resultado do contraste entre os híbridos homozigotos e hemizigotos demonstrou menor ataque sofrido pelos híbridos homozigotos em relação aos híbridos hemizigotos. Nesse caso, a presença de apenas um alelo *Bt* nos indivíduos hemizigotos resultou em um ataque 30% maior que nos híbridos homozigotos, que tiveram médias de notas de 3,25 e 2,31, respectivamente. A variável PG teve apenas o contraste dos transgênicos com a testemunha significativo. Observa-se que os híbridos transgênicos, com média de

7430,16 kg ha⁻¹, foram superiores ao tratamento convencional, com 5663,75 kg/ha⁻¹ de média. Não houve diferença entre a média dos homozigotos (MHO) e a média dos hemizigotos (MHE) no segundo contraste da PG. Para a SL, o contraste entre os transgênicos e a testemunha convencional foi altamente significativo, rejeitando a hipótese de que os híbridos com alelos *Bt* têm o mesmo comportamento que o híbrido que não apresenta os genes de resistência às lagartas. A média de SL nos híbridos transgênicos foi de 15%, enquanto que em MCO foi de 80%. O contraste entre os homozigotos e hemizigotos também apresentou alta significância para SL, ou seja, a presença de um alelo *Bt* a mais no genótipo dos híbridos homozigotos foi suficiente para aumentar a resistência ao ataque de lagartas. Nota-se que a média da porcentagem de *S. frugiperda* sobreviventes ao se alimentarem dos híbridos homozigotos foi de 9,33%, e a porcentagem de sobrevivência nos hemizigotos foi mais do que o dobro desse valor.

Tabela 2. Análise conjunta das duas safras de milho com os graus de liberdade (GL) e seus desdobramentos para a fonte de variação híbridos (H) e híbridos x safras (H x S); coeficientes de variação (CV, %) das variáveis ataque de *S. frugiperda* em campo (ALC), produtividade de grãos (PG, t ha⁻¹) e sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1º instar (SL, %).

Fonte de variação	Quadrados Médios		
	ALC	PG	SL
Safras (S)	18,14**	11220695**	0,1408**
Híbridos (H)	3,0**	2633973**	0,1045**
Homozigotos (HO)	0,22	1200288	0,0044
Hemizigotos (HE)	0,16	4061381**	0,0024
Grupos (G)	16,25**	2646528*	0,5087**
H x S	1,93**	2226856**	0,0097*
HO x S	0,54	2602389*	0,0025
HE x S	0,43	1881764	0,0125*
G x S	7,72**	2165972	0,0184**
Resíduo	0,27	746645	0,0043
CV	19,84	11,25	21,21
Médias	2,60	7681,9	30,91

*,**Significativo a 5 e 1% de probabilidade para o teste de F, respectivamente.

Para os contrastes ortogonais da segunda safra (Tabela 3), houve diferença significativa somente no contraste dos transgênicos com a testemunha convencional para ALC, observando maior resistência ao ataque de lagartas nos híbridos transgênicos em relação à testemunha convencional, com médias de notas de 1,98 e 2,97, respectivamente. A variação das médias de notas de ALC ficou entre 1,87 e 2,97 para os híbridos hemizigotos e convencional, respectivamente. Não houve diferença significativa nos contrastes para PG. As médias de cada grupo ficaram próximas entre si, variando de 7942,65 a 8243,39 kg ha⁻¹ entre MHE e MHO, respectivamente. O

contraste ortogonal entre os transgênicos e o híbrido convencional para SL foi altamente significativo, de modo que os híbridos transgênicos foram superiores ao convencional, sendo que o último apresentou sobrevivência de lagartas de 100%, assinalando a influência das proteínas *Bt* no controle de lagartas. O contraste entre os homozigotos e hemizigotos para SL também foi significativo e os híbridos homozigotos apresentaram aproximadamente três vezes menos lagartas sobreviventes que o encontrado no grupo hemizigoto.

Na combinação das duas safras (Tabela 3), a variável ALC teve somente contraste significativo entre os híbridos transgênicos e a testemunha convencional, com médias de 2,38 e 4,75, respectivamente. Os contrastes da variável PG não foram significativos. Os dois contrastes para a variável SL foram significativos. O contraste entre os híbridos transgênicos e os convencionais apresentaram médias de sobrevivência de 24,75 e 92,5%, respectivamente. No contraste entre os homozigotos e hemizigotos, a SL em MHO foi menos da metade que em MHE. A adição de um alelo *Bt* confere mortalidade de lagartas 50% maior nos híbridos homozigotos em comparação com os híbridos hemizigotos.

Para o teste de t, que compara as médias de cada variável entre a primeira e segunda safras, a variável ALC apresentou médias de MHE e MCO significativas. A variável PG apresentou apenas a MCO significativa, e para SL, as médias de MHO e MHE foram significativas.

Tabela 3. Contrastes ortogonais entre os três grupos de híbridos de milho (homozigotos, hemizigotos e testemunha convencional) da primeira safra (1ªS), segunda safra (2ªS) e análise conjunta (C) das variáveis ataque de *S. frugiperda* em campo (ALC), produtividade de grãos (PG, t ha⁻¹) e sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1º ínstar (SL, %). Contraste ortogonal Y₁: contraste entre os híbridos transgênicos, homozigotos e hemizigotos, e a testemunha convencional. Contraste ortogonal Y₂: contraste entre os híbridos homozigotos e os hemizigotos. Média dos híbridos homozigotos (MHO); média dos híbridos hemizigotos (MHE); média da testemunha convencional (MCO).

	ALC			PG			SL		
	1ªS	2ªS	C	1ª S	2ªS	C	1ªS	2ªS	C
Y ₁	0,00**	0,00**	0,00**	0,03*	0,98	0,09	0,00**	0,00**	0,00**
Y ₂	0,00**	0,14	0,13	0,61	0,36	0,38	0,02*	0,00**	0,00**
MHO ^a	2,31	2,09	2,20	7551	8243	7897	9,33*	16,45	13,78
MHE ^a	3,25**	1,87	2,56	7310	7943	7626	20,67**	44,75	35,72
MCO ^a	6,53**	2,97	4,75	5664**	8106	6885	80,00	100,00	92,50

*,**Significativo a 5 e 1% de probabilidade para o teste de F e t, respectivamente. ^aSempre que há diferença significativa no teste de t entre a primeira e a segunda safras, esta está indicada na média da variável da primeira safra.

Nos contrastes ortogonais do híbrido A (Tabela 4) para a variável ALC, houve diferença entre os híbridos transgênicos e convencional na primeira safra, em que a média de notas dos transgênicos foi de 2,72, enquanto a ACO foi de 6,53. Na segunda safra, a diferença entre os transgênicos e o convencional também foi significativa, mesmo o ataque tendo sido menor do que na primeira safra. Os híbridos AHO e AHE não se diferiram em relação ao ALC em ambas as safras. Não houve contraste significativo para a variável PG. As médias de PG do híbrido A variaram de 6885,99 kg ha⁻¹ a 8065,78 kg ha⁻¹ para ACO e AHE, respectivamente. Os híbridos transgênicos e convencional apresentaram diferença significativa para SL, sendo a média dos transgênicos de 21,95% e a de ACO maior que 90%. No contraste entre o híbrido homozigoto e o hemizigoto também houve diferença significativa, sendo que o último teve sobrevivência de lagartas 50% maior.

Tabela 4. Contrastes ortogonais entre os três isogênicos do híbrido A de milho nas duas safras, para as variáveis ataque de *S. frugiperda* em campo (ALC), produtividade de grãos (PG, t ha⁻¹) e sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1º instar (SL, %). Contraste ortogonal Y₁: contraste ortogonal entre os híbridos transgênicos, homozigoto e hemizigoto (AHO e AHE, respectivamente), e a testemunha convencional (ACO). Contraste ortogonal Y₂: contraste ortogonal entre os híbridos AHO e AHE.

	Safras ^a			
	ALC ^b	ALC ^c	PG	SL
Y ₁	0,00**	0,00**	0,17	0,00**
Y ₂	0,22	0,56	0,19	0,048*
AHO	2,50	1,93	7227	14,37
AHE	2,93	2,07	8066	29,53
ACO	6,53	2,97	6885	92,50

*,**Significativo a 5 e 1% de probabilidade para o teste de F, respectivamente. ^aPara PG e SL, como não houve interação híbrido x safra, os contrastes e as médias foram obtidos para a análise conjunta. Para ALC, como a interação híbrido x safra foi significativa, os contrastes e as médias foram obtidos para cada safra separadamente; ^bPrimeira safra; ^cSegunda safra.

Além de fornecer a sobrevivência de lagartas, nos bioensaios também foi possível verificar o nível de desenvolvimento das lagartas sobreviventes. Observou-se que a sobrevivência de lagartas em ACO apresentou pelo menos 85% das lagartas com mais de 1,5 cm de comprimento após os sete dias de avaliação. Por outro lado, esse não foi o mesmo resultado encontrado na sobrevivência de lagartas dos híbridos AHO e AHE, em que todas as lagartas foram menores que 1,5 cm de comprimento (Figura 2). Os demais híbridos transgênicos BHE, BHO, CHE, CHO, DHE, DHO, EHE e EHO não produziram nenhuma lagarta maior que 1,5 cm de comprimento após os sete dias de avaliação.

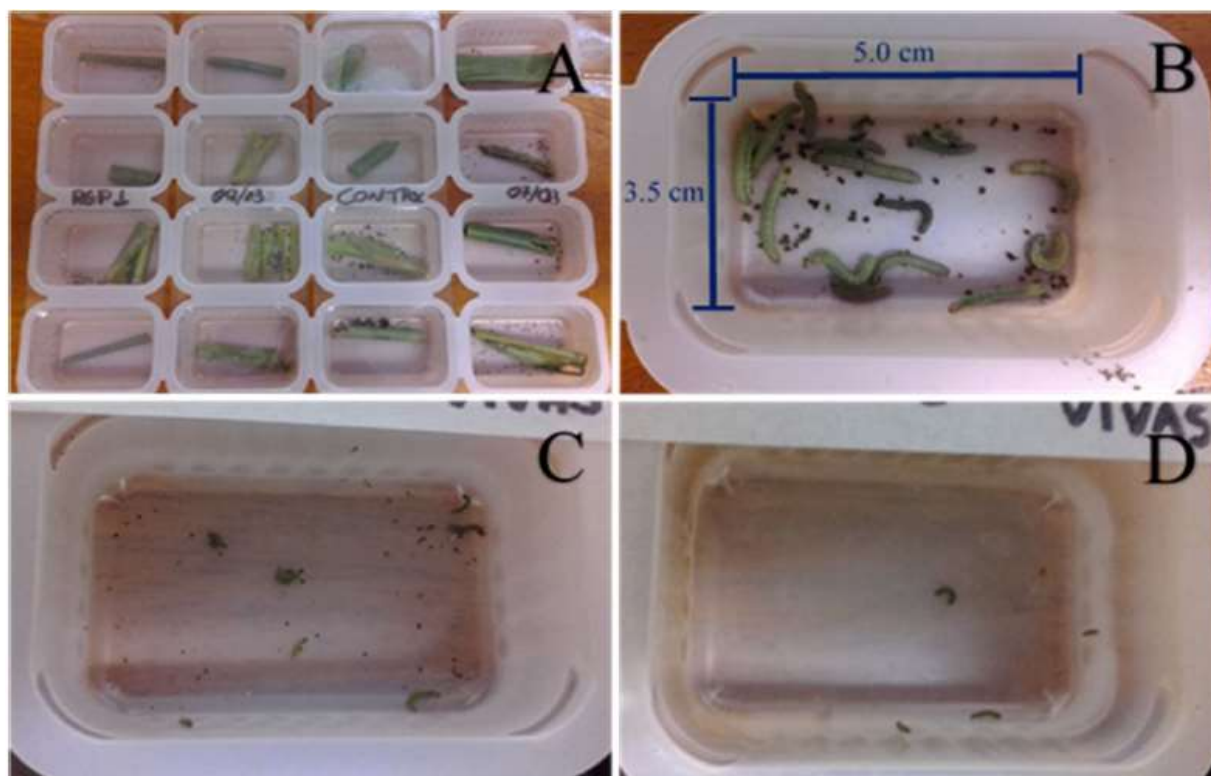


Figura 2. Imagens do bioensaio para a quantificação da sobrevivência de lagartas no híbrido A nas suas três versões (homozigoto, hemizigoto e convencional). A: Bandeja com dezesseis lagartas se alimentando de folhas do híbrido ACO. Nota-se que cada célula é isolada da outra por uma tampa de plástico transparente. B: As lagartas sobreviventes do híbrido ACO foram agrupadas em uma só célula da bandeja após contagem, contabilizando 100% de SL e quinze lagartas maiores que 1,5 cm de comprimento. C: AHE agrupadas em uma célula da bandeja após contagem e apresentando SL igual a 50% e todas as lagartas menores que 1,5 cm de comprimento. D: O AHO com 25% de SL e todas as lagartas menores que 1,5 cm de comprimento.

Na comparação entre cada híbrido homozigoto A, B, C, D e E, com sua versão isogênica hemizigota (Tabela 5), pelo teste de t, não houve diferenças significativas para a variável ALC. Em relação à PG, o único híbrido que apresentou diferença significativa foi o híbrido E, sendo o EHO superior ao EHE em mais de 25%. Para a SL, não houve diferença entre os híbridos na primeira safra. A SL da segunda safra apresentou diferenças entre os híbridos homozigotos e hemizigotos B, D e E. A diferença entre os híbridos BHO e BHE foram significativas, com médias de 15 e 45%, respectivamente. Os híbridos DHO e DHE diferiram para SL, sendo a média de DHO menos que a metade da média de DHE. Essa diferença também foi encontrada para os híbridos EHO e EHE, de modo que EHO apresentou SL com média sete vezes

menor que a média de EHE. A maioria dos híbridos não apresentou diferença entre as versões homozigotas e hemizigotas, porém, há uma tendência de os híbridos homozigotos apresentarem uma menor ALC e SL. Para PRYF, cada híbrido homozigoto apresentou maior concentração da proteína Cry1F em relação a sua versão isogênica hemizigota, variando de 23 até 94%. Em média, os híbridos homozigotos tiveram PRYF 1,5 vezes maior que os hemizigotos.

Ao comparar o desempenho de todos os híbridos transgênicos, homozigotos e hemizigotos, por teste de Tukey (Tabela 5), o ALC da segunda safra dos híbridos BHO e CHO apresentaram maiores notas de ataque do que os híbridos EHE e EHO. A PG da primeira safra dos híbridos BHE e BHO foi superior à do EHE. Na SL da segunda safra, EHO teve maior mortalidade de lagartas que DHE e EHE. Para a variável PRYF, o híbrido AHO expressou maior quantidade de proteína Cry1F do que todos os híbridos hemizigotos; EHO foi superior a todos os híbridos hemizigotos, exceto o híbrido AH; CHO apresentou maior quantidade de Cry1F do que os híbridos DHE e BHE; e BHO expressou mais Cry1F que o BHE.

Tabela 5. Comparação entre os híbridos de milho A, B, C, D e E nas versões hemizigotas (AHE, BHE, CHE, DHE e EHE) e seus isogênicos homozigotos (AHO, BHO, CHO, DHO, EHO) para as variáveis ataque de *S. frugiperda* em campo (ALC), produtividade de grãos (PG, t ha⁻¹) e sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1º instar (SL, %) em cada safra, e o nível de expressão da proteína Cry1F (PRYF, ng cm⁻²).

Híbridos	ALC		PG		SL		PRYF
	1ªS	2ªS	1ªS	2ªS	1ªS	2ªS	
AHE	2,93 a	2,07 abc	7797,46 ab	8334,10 a	26,67 a	31,25 ab	100,78 bcde
AHO	2,50 a	1,93 abc	7194,72 ab	7259,35 a	13,33 a	15,00 ab	**150,70 a
BHE	2,93 a	1,83 abc	9023,80 a	7907,77 a	20,00 a	45,00 ab	70,88 e
BHO	2,17 a	2,53 a	8598,76 a	8128,77 a	3,33 a	**15,00 ab	**137,65 abcd
CHE	3,30 a	2,00 abc	7549,46 ab	8189,69 a	23,33 a	36,25 ab	93,39 cde
CHO	2,33 a	2,50 a	7472,11 ab	8506,09 a	13,33 a	17,50 ab	**141,14 abc
DHE	3,13 a	1,80 abc	6811,72 ab	8004,19 a	13,33 a	57,50 a	89,50 de
DHO	2,07 a	2,10 abc	8197,36 ab	8195,56 a	10,00 a	*27,25 ab	**115,89 abcde
EHE	3,93 a	1,67 bc	5365,22 b	7277,52 a	20,00 a	53,75 a	93,23 cde
EHO	2,50 a	1,40 c	6290,99 ab	*9127,19 a	6,67 a	**7,50 b	**147,35 ab

*,**Significativo a 5 e 1% de probabilidade para o teste de t, respectivamente, indicado na versão homozigota. Médias com letras diferentes são significativas a 5% de probabilidade por teste de Tukey.

PRYF apresentou correlação negativa significativa com ALC da primeira safra (-0,673), e com SL da primeira (-0,673) e segunda (-0,894) safras. O ALC da primeira safra apresentou correlação positiva significativa com a SL da primeira (0,682) e da segunda (0,777) safras (Tabela 6).

Tabela 6. Coeficientes de correlação fenotípica de Pearson das médias das variáveis ataque de *S. frugiperda* em campo da primeira (ALC1^aS) e segunda safra de milho (ALC2^aS), produtividade de grãos da primeira safra (PG1^aS, kg ha⁻¹) e segunda safra (PG2^aS, kg ha⁻¹), sobrevivência larval de *S. frugiperda* de 1^o instar da primeira (SL1^aS, %) e segunda safra (SL2^aS, %), e nível de expressão da proteína Cry1F (PRYF, ng cm⁻²).

	ALC1 ^a S	ALC2 ^a S	PG1 ^a S	PG2 ^a S	SL1 ^a S	SL2 ^a S
PRYF	- 0,673*	0,248	- 0,129	0,271	- 0,673*	- 0,894**
ALC1 ^a S	-	- 0,436	- 0,553	- 0,436	0,682*	0,777*
ALC2 ^a S	-	-	0,585	0,004	- 0,165	- 0,290
PG1 ^a S	-	-	-	0,13	- 0,051	- 0,188
PG2 ^a S	-	-	-	-	- 0,275	- 0,471
SL1 ^a S	-	-	-	-	-	0,551

*,** Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

O desempenho semelhante dos híbridos transgênicos homozigotos e hemizigotos quanto à susceptibilidade aos herbicidas e efeito negativo no desenvolvimento larval de *S. frugiperda* nos bioensaios é um indicativo de que não houve silenciamento gênico dos híbridos homozigotos. James et al. (2002) encontraram três prejuízos do transgene em homozigose em genótipos de arroz: diminuição da expressão da proteína GUS (marcador de seleção visual em tecidos transformados) quando comparada com os genótipos hemizigotos, silenciamento gênico e letalidade dos genótipos, isto é, não houve efeito aditivo do alelo adicional no *locus* transgênico. Em contrapartida, em genótipos de arroz de origem diferente, James et al. (2002) detectaram que os indivíduos homozigotos para o transgene quase dobraram o nível de expressão da proteína transgênica, apresentando caráter aditivo pela adição de um alelo. Hood et al. (2012), em estudos na cultura do milho, encontraram indivíduos homozigotos que não apresentaram silenciamento gênico e que tiveram comportamento superior ao dos indivíduos hemizigotos. A partir da SL, conclui-se que os híbridos transgênicos não apresentaram silenciamento gênico dos genes *Bt* em homozigose e em hemizigose, pois, ao alimentar as lagartas com as folhas das versões transgênicas do mesmo híbrido, o controle das lagartas foi realizado e foi superior ao do híbrido convencional, tanto na quantidade de lagartas que sobreviveram quanto o ínstar no nível de desenvolvimento das mesmas.

A diferenciação entre os grupos homozigoto, hemizigoto e convencional é mais fácil de ser percebida ao observar as variáveis ALC e SL, pois a avaliação dessas características é dependente da presença dos alelos *Bt*. A diferença entre os híbridos dentro dos grupos dos homozigotos, hemizigotos ou entre os três grupos, caracteriza a diferença no controle das lagartas, que depende do número de alelos PW e também da capacidade de produção de proteínas *Bt* que cada híbrido possui. Nota-se que o ALC da primeira safra foi muito maior do que o da segunda safra para os três grupos (homozigotos, hemizigotos e convencional); percebe-se, então, que esse ataque mais severo influenciou na diminuição da PG do híbrido convencional, o qual foi muito mais atacado por lagartas de *S. frugiperda*. Mesmo assim, as notas de ALC mais altas não foram suficientes para diferenciar a PG dos híbridos homozigotos e hemizigotos na primeira safra.

A diferença entre a média de notas de ALC da primeira e segunda safras deveu-se ao fato de que a avaliação de ALC na primeira safra foi realizada no início do mês de novembro, sofrendo influência das condições meteorológicas, principalmente das chuvas, na intensidade de ataque de *S. frugiperda*, o que contribuiu para maiores médias de ALC. Isso ocorreu porque no mês de outubro o número de dias com chuva (NDC) foi igual a oito e a precipitação (PRE) de 149,7 mm, índices baixos que influenciaram o aumento populacional das lagartas. Na segunda safra, a ALC foi avaliada no início do mês de março, sofrendo influência das condições meteorológicas do mês de fevereiro, quando os valores de NDC e PRE foram de 14 dias e 201 mm, respectivamente. Assim, os números mais altos de NDC e PRE resultaram em ALC mais baixa para a segunda safra, pois esses fatores influenciaram o desenvolvimento e sobrevivência das lagartas, como foi descrito por Varella et al. (2015) que as principais razões pela morte das lagartas neonatas de *S. frugiperda* são a predação, o afogamento e o deslocamento causado pelas chuvas. Em condições de campo, mesmo com 100% dos ovos viáveis, mais de 95% de lagartas neonatas morrem nos primeiros sete dias de vida. Isso significa que os fatores abióticos têm grande influência na mortalidade tanto de ovos quanto de lagartas em seus primeiros ínstares, principalmente em decorrência das chuvas. Percebe-se então, que a diferença foi notada entre os híbridos transgênicos e convencionais em ALC nas duas safras, sendo que as condições ambientais permitiram que a infestação natural de *S. frugiperda* na primeira safra fosse suficiente para diferenciar o comportamento dos híbridos homozigotos e hemizigotos, indicando superioridade do “trait” em homozigose no controle das lagartas. Isso é reafirmado pela correlação negativa entre ALC da primeira safra com PRYF e SL das duas safras, tal que, quando há maior produção de Cry1F, o controle de *S. frugiperda* é mais eficiente. James et al. (2002) relataram que genótipos transgênicos homozigotos estão associados com maior produção de proteína transgênica devido ao efeito aditivo causado pela presença de uma cópia a mais do alelo transgênico.

A variação de PG de cada híbrido pode estar relacionada com a adaptabilidade dos genótipos para a região de Jaboticabal, onde as condições agroclimáticas podem ter favorecido alguns híbridos, e também com o elevado nível de ataque de lagartas. Buntin (2008) e Moraes et al. (2015) avaliaram o efeito da infestação natural de *S. frugiperda* na produtividade de híbridos convencionais e suas versões transgênicas com diferentes eventos *Bt*, e observaram que os híbridos convencionais sofreram

maiores injúrias de *S. frugiperda* que os transgênicos. Contudo, a maioria dos híbridos convencionais tiveram PG semelhante à dos híbridos transgênicos, demonstrando que o baixo nível de ataque de lagartas não foi suficiente para evidenciar as diferenças na PG. Waquil et al. (2002), comparando híbridos de milho *Bt* e convencional sob infestação artificial, mostraram que híbridos *Bt* tiveram menor número de lagartas nas plantas, as quais foram menos danificadas pelo ataque e com PG 32% maior que os híbridos convencionais.

A SL observada no laboratório, por sofrer menor influência do ambiente e manter maior controle da alimentação das lagartas, indica que a diferença no número de alelos transgênicos afeta a sobrevivência da lagarta-do-cartucho. Essa diferença apresenta um comportamento típico de efeito aditivo de alelos, isto é, à medida que se adiciona um alelo transgênico há um incremento no controle de lagartas. O efeito aditivo do alelo transgênico *Bt* foi observado nos bioensaios das duas safras, pois à medida que a zigosidade de um *locus* transgênico aumenta pela adição de um alelo *Bt* no *locus* transgênico, o nível da proteína correspondente a ser expressa na planta também irá aumentar, como ocorreu com os níveis de expressão da proteína Cry1F. Law et al. (2006), estudando a cultura do milho, notaram incremento de duas a três vezes na quantidade de proteína expressa quando o transgene estava em homozigose, pela autofecundação de plantas transgênicas, em comparação com plantas que foram de fecundação cruzada, isto é, com o transgene em hemizigose.

Assim como nos contrastes realizados para os grupos, ao contrastar as médias do híbrido A nas três versões, o comportamento de efeito aditivo de cada alelo *Bt* foi evidenciado ao observar a SL e PRYF. Esse efeito aditivo contribuiu para o maior controle de lagartas, diminuindo em 50% a infestação no híbrido com *locus* transgênico em homozigose. Além disso, não houve diminuição no potencial produtivo desse híbrido, concluindo que ao adicionar um alelo *Bt* no *locus* de híbridos hemizigotos não houve queda na capacidade produtiva, pois a presença de um alelo transgênico adicional nos homozigotos não teve custo no desempenho produtivo, fato também observado nos hemizigotos, ao mesmo tempo em que não se manifestou silenciamento gênico. Guadagnuolo et al. (2006) relataram que na ausência de pressão de seleção em que beneficia a transgenia, a mesma torna-se um fator neutro na influência da capacidade produtiva da planta. A superioridade do AHO sobre o AHE na SL e também dos demais híbridos homozigotos em relação aos seus isogênicos hemizigotos, confirma o efeito da maior produção de Cry1F, tornando o controle de *S.*

frugiperda mais eficiente com uma dosagem a mais do alelo *Bt*. Esse mesmo resultado não foi comprovado nos experimentos de campo, pois, como mencionado, a infestação de lagartas não foi suficiente para diferenciar o ALC e a PG entre os híbridos homozigotos e hemizigotos. Ao comparar genótipos de milho homozigotos e hemizigotos para o transgene, Hood et al. (2012) detectaram que a quantidade de proteína transgênica expressa nos hemizigotos elevou-se de 1/2 N para 2 N nos homozigotos, ou seja, atingiu proporções até quatro vezes maiores com a adição de um alelo transgênico no *locus*. A influência de um alelo em transgenes já foi discutida anteriormente, e os resultados indicam que os homozigotos têm nível de expressão duas vezes maior do que os hemizigotos (HOBBS et al., 1990; CALIGARI et al., 1993).

A tecnologia PW, a qual expressa as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2 piramidadas, foi eficiente no controle de *S. frugiperda* nos experimentos de campo e nos bioensaios, sendo uma nova estratégia para o manejo de resistência de *S. frugiperda*. Devido à quebra de resistência de *S. frugiperda* para a proteína Cry1F, eventos piramidados se tornaram a alternativa para conter a lagarta-do-cartucho (HUANG et al., 2014; FARIAS et al., 2015). Siebert et al. (2012) compararam híbridos de milho convencionais e transgênicos, contendo as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry1Ab2 em conjunto e individualmente, e confirmaram a eficiência no controle de lagartas, entre elas *S. frugiperda*, sob infestação natural. Santos-Amaya et al. (2015) concluíram que a população de campo de *S. frugiperda*, ao ser selecionada por 10 gerações para resistência à proteína Cry1F, teve a mesma taxa de sobrevivência em híbridos de milho convencionais e nos que possuíam somente a proteína Cry1F, enquanto que a mortalidade foi de 100% quando se alimentaram de materiais com a combinação das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2. As injúrias nas folhas demonstraram que os híbridos convencionais foram mais atacados, e portanto, inferiores em relação aos transgênicos, que demonstraram menor presença de *S. frugiperda* e menor injúria nas folhas (SANTOS-AMAYA et al., 2015).

Nos campos de produção de sementes de híbridos de milho homozigotos e hemizigotos transgênicos, os híbridos transgênicos homozigotos podem reduzir as aplicações de inseticidas, pois as linhagens parentais possuem genes de resistência a lepidópteros. Por outro lado, na obtenção do híbrido hemizigoto transgênico, o qual possui uma linhagem parental convencional, quando é atingido o nível de dano de lagartas realiza-se pulverizações com inseticidas. Outro ponto positivo dos híbridos

homozigotos é a maior facilidade no manejo de plantas daninhas, pelo fato dos parentais serem tolerantes aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que não há limitações para a utilização de híbridos de milho homozigotos para o transgene, porque apresentaram maior expressão de Cry1F e maior controle de lagartas devido a sua capacidade de aumentar a dose de proteína *Bt*, sendo importante para o manejo de resistência de *S. frugiperda*. A superioridade dos híbridos transgênicos homozigotos no controle de *S. frugiperda* são específicos para os genes *Bt* da tecnologia PW (*cry1F*, *cry1A.105* e *cry2Ab2*), sendo relevante o estudo da homozigose em outros genes *Bt*. A fim de complementar o que foi exposto, pesquisas podem ser desenvolvidas para quantificar o nível de proteína que é expressa no *locus* transgênico em homozigose e hemizigose em diferentes genes *Bt*, e assim determinar uma relação mais precisa da ação aditiva do alelo transgênico para o controle da lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*.

7. REFERÊNCIAS

BENBROOK, C.M. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. – the first sixteen years. **Environmental Sciences Europe**, v. 24, p. 1-13, 2012.

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**, v. 91, p. 523-530, 2008.

CALIGARI, P. D. S.; YAPABANDARA, Y. M. H. B.; PAUL, E. M.; PERRET, J.; ROGER, P.; DUNWELL, J. M. Field performance of derived generations of transgenic tobacco. **Theoretical Applied Genetics**, v. 86, p. 875-879, 1993.

CÉLERES. **2º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/2017**. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/2o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>>. Acesso em: 21 dez. 2016.

CLOUGH, R. C.; PAPPU, K.; THOMPSON, K.; BEIFUSS, K.; LANE, J.; DELANEY, D. E.; HARKEY, R.; DREES, C.; HOWARD, J. A.; HOOD, E. E. Manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is enzymatically active and accumulates to high levels in transgenic maize seed. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, p. 53-62, 2006.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2015/2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf>. Acesso em: 20 de dez. 2016.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2016/2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_11_11_30_39_boletim_gaos_janeiro_2017.pdf>. Acesso em: 11 de jan. 2017.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO). Parecer técnico Nº 2753/2010. Liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos e tolerante a herbicidas, MON 89034 × TC1507 × NK603 - Processo nº 01200.001455/2010-39. Disponível em: < http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/-/document_library_display/SqhWdohU4BvU/view/678017#/liberacao-comercial/consultar-processo >. Acesso em: 25 de mai. 2015.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Yield impact of larval infestations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to midwhorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 76, p. 1052-1054, 1983.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, C. A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in diferente maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 45, p. 293-296, 1999.

DARWIN, C. R. **The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom**. 2. ed. London: John Murray, 1878. p. 439-474.

DAVIS, F. M.; NG, S. S.; WILLIAMS, W. P. **Visual rating scales for screening whorl-stage corn resistance to fall armyworm**. Starkville: Mississippi State University, 1992. 9 p.

DUVICK, D.N. The Contribution of Breeding to Yield Advances in maize (*Zea mays* L.). **Advances in Agronomy**, v. 86, p. 83-145, 2005.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 *Bt* maize in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, p. 974-979, 2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT Crops. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 10 de jan. 2017.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 2007. 574 p.

FRIZZAS, M.R.; NETO, S. S.; OLIVEIRA, C.M.; OMOTO, C. Genetically modified corn on fall armyworm and earwig populations under field conditions. **Ciência Rural**, v. 44, p. 203-209, 2014.

GALLO, D.; NAKANO, O. SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p. il. (FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).

GUADAGNUOLO, R.; CLEGG, J.; ELLSTRAND, C. Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. **Ecological Applications**, v. 16, p. 1967-1974, 2006.

HARDKE, J. T.; LEONARD, B. R.; HUANG, F.; JACKSON, R. E. Damage and survivorship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic field corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. **Crop Protection**, v. 30, p. 168-172, 2011.

HOBBS, S. L. A.; KPODAR, P.; DELONG, C. M. O. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. **Plant Molecular Biology**, v. 15, p. 851-864, 1990.

HOOD, E. E.; BAILEY, M. R.; BEIFUSS, K.; MAGALLANES-LUNDBACK, M.; HORN, M. E.; CALLAWAY, E.; DREES, C.; DELANEY, D. E.; CLOUGH, R.; HOWARD, J. Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 1, p. 129-140, 2003.

HOOD, E. E.; DEVAIAH, S. P.; FAKE, G.; EGELKROUT, E.; TEOH, K. T.; REQUESSENS, D. V.; HAYDEN, C.; HOOD, K. R.; PAPPU, K. M.; CARROL, J.; HOWARD, J. A. Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, p. 20-30, 2012.

HOOD, E. E.; LOVE, R.; LANE, J.; BRAY, J.; CLOUGH, R.; PAPPU, K.; DREES, C.; HOOD, K. R.; YOON, S.; AHMAD, A.; HOWARD, J. Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulose protein in transgenic maize seed. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 709-719, 2007.

HOWARD, J. A.; HOOD, E. E. **Commercial plant-produced recombinant protein products: case studies**. Berlin: Springer-Verlag, 2014. 281 p.

HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER JR, R. L.; REISIG, D. D.; HEAD, G. P.; ANDOW, D. A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, v. 9, p. 1-10, 2014.

International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA). GM approval database. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=113>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 342-351, 2014.

JAMES, V. A.; AVART, C.; WORLAND, B.; SNAPE, J. W.; VAIN, P. The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. **Theoretical Applied Genetics**, v. 104, p. 553–561, 2002.

JONES, D. F. The productiveness of single and double first generation corn hybrids. **Journal of the American Society of Agronomy**, v. 14, p. 242–252, 1922.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; BELING, R. R. (2016). **Anuário brasileiro do milho**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 100 p.

LAW, R. D.; RUSSEL, D. A.; THOMPSON, L. C.; SCHROEDER, S. C.; MIDDLE, C. M.; TREMAINE, M. T.; JURY, T. P.; DELANNAY, X.; SLATER, S. Biochemical limitations to high-level expression of humanized monoclonal antibodies in transgenic maize seed endosperm. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1434-1444, 2006.

MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Detecção e quantificação de eventos transgênicos. In: ALBRECHT, L. P.; MISSIO, R. F. **Manejo de Cultivos Transgênicos**. 1. ed. Palotina: Imprensa da UFPR, 2013. cap. 4, p. 64-80.

MEISSLE, M.; MOURON, P.; MUSA, T.; BIGLER, F.; PONS, X.; VASILEIADIS, V. P.; OTTO, S.; ANTICHI, D.; KISS, J.; PÁLINKÁS, Z.; DORNER, Z.; VAN DER WEIDE, R.;

GROTEN, J.; CZEMBOR, E.; ADAMCZYK, J.; THIBORD, J. B.; MELANDER, B.; CORDSEN NIELSEN, G.; POULSEN, R. T.; ZIMMERMANN, O.; VERSCHWELE, A.; OLDENBURG, E. Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, p. 357-375, 2010.

MORAES, A. R. A.; LOURENÇÃO, A. L.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Resistance of conventional and isogenic transgenic maize hybrids to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bragantia**, v. 74, p. 50-57, 2015.

NAQVI, S.; RAMESSAR, K.; FARRÉ, G.; SABALZA, M.; MIRALPEIX, B.; TWYMAN, R.M.; CAPELL, T.; ZHU, C.; CHRISTOU, P. High-value products from transgenic maize. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 40-53, 2011.

NIU, Y.; MEAGHER JR, R. L.; YANG, F.; HUANG, F. Susceptibility of field populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to purified Cry1 protein and corn leaf tissue containing single and pyramided Bt genes. **Florida Entomologist**, v. 96, p. 701-713, 2013.

NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V.; HUANG, F. (2014) Larval survival and plant injury of Cry1F-susceptible, -resistant, and -heterozygous fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt corn containing single or pyramided genes. **Crop Protection**, v. 59, p. 22-28, 2014.

OLIVEIRA R. C.; CARNEIRO, T. R.; FERNANDES, O. A. Criação de *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae) para o controle da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). In: De Bortoli, S. A.; Boiça Jr, A. L.; Oliveira, J. E. M. (org.). **Agentes de controle biológico: metodologias de criação, multiplicação e uso**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 151-166.

PURRINGTON, C.B.; BERGELSON, J. Fitness consequences of genetically engineered herbicide and antibiotic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 145, p. 807-814, 1997.

RAMESSAR, K.; SABALZA, M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Maize plants: An ideal production platform for effective and safe molecular pharming. **Plant Science**, v. 174, p. 409-419, 2008.

R Core Team. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria, 2016.

RUBEL, F.; KOTTEK, M. Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 19, p. 135-141, 2010.

RULE, D. M.; NOLTING, S. P.; PRASIFKA, P. L.; STORER, N. P.; HOPKINS, B. W.; SCHERDER, E. F.; SIEBERT, M. W.; HENDRIX, W. H. Efficacy of pyramided Bt proteins Cry1F, Cry1A.105, and Cry2Ab2 expressed in SmartStax corn hybrids against

lepidopteran insect pests in the northern United States. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 403-409, 2014.

SANTOS-AMAYA, O. F.; RODRIGUES, J. V. C.; SOUZA, T. C.; TAVARES, C. S.; CAMPOS, S. O.; GUEDES, R. N. C.; PEREIRA, E. J. G. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-10, 2015.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, no. 3, p. 775-806, 1998.

SCHULER, T.H. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 16, issue 4, p. 168-175, 1998.

SIEBERT, M. W.; NOLTING, S. P.; HENDRIX, W.; DHAVALA, S.; CRAIG, C.; LEONARD, B. R.; STEWART, S. D.; ALL, J.; MUSSER, F. R.; BUNTIN, G. D.; SAMUEL, L. Evaluation of corn hybrids expressing Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry34Ab1/Cry35Ab1, and Cry3Bb1 against southern United States insect pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 1825-1834, 2012.

SHELTON, A.M.; TANG, J.D.; ROUSH, R.T.; METZ, T.D.; EARLE, E.D. Field test on managing resistance to *Bt*-engineered plants. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 339-342, 2000.

SHULL, G. H. The composition of a field of maize. **American Breeders' Association**, v. 4, p. 296-301, 1908.

SU, H. H.; TIAN, J. C.; NARANJO, S. E.; ROMEIS, J.; HELLMICH, R. L.; SHELTON, A. M. *Bacillus thuringiensis* plants expressing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F are not toxic to the assassin bug, *Zelus renardii*. **Journal of Applied Entomology**, v. 139, p. 23-30, 2015.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1031-1038, 2010.

STORER, N. P.; THOMPSON, G. D.; HEAD, G. P. Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. **GM Crops & Food**, v. 3, p. 154-162, 2012.

STREATFIELD, S. J.; MAYOR, J. M.; BARKER, D. K.; BROOKS, C.; LAMPHEAR, B. J.; WOODARD, S. L.; BEIFUSS, K. K.; VICUNA, D. V.; MASSEY, L. A.; HORN, M. E.; DELANEY, D. E.; NIKOLOV, Z. L.; HOOD, E. E.; JILKA, J. M.; HOWARD, J. A. Development of an edible subunit vaccine in corn against enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 38, p. 11-17, 2002.

TABASHNIK, B.; BRÉVAULT, T.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 1-12, 2013.

TIAN, J. C.; HILDA, L. C.; ROMEIS, J.; NARANJO, S. E.; HELLMICH, R. L.; SHELTON, A. M. Using field-evolved resistance to Cry1F maize in a lepidopteran pest to demonstrate no adverse effects of Cry1F on one of its major predators. **Transgenic Research**, v. 21, p. 1303-1310, 2012.

VARELLA, A. C.; MENEZES-NETTO, A. C.; ALONSO, J. D. S.; CAIXETA, D. F.; PETERSON, R. K. D.; FERNANDES, O. A. Mortality dynamics of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) immatures in maize. **PLoS One**, v. 10, p. 1-12, 2015

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

WAQUIL, J. M.; VILELLA, F. M. F.; SIEGFRIED, B. D.; FOSTER, J. E. Atividade biológica das toxinas do *Bt*, Cry1A(b) e Cry1F em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, p. 161-171, 2004.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1493-1497, 2003.