



**LARAH MARTINS FREITAS**

**EFEITO DA ZIGOSIDADE EM HÍBRIDOS DE MILHO  
TRANSGÊNICO A *Dalbulus maidis* (HEMIPTERA:  
CICADELLIDAE)**

**LAVRAS – MG  
2020**

**LARAH MARTINS FREITAS**

**EFEITO DA ZIGOSIDADE EM HÍBRIDOS DE MILHO TRANSGÊNICO A  
*Dalbulus maidis* (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Freitas, Larah Martins.

Efeito da zigosidade em híbridos de milho transgênico a  
*Dalbulus maidis* (Hemiptera:Cicadellidae) / Larah Martins Freitas. -  
2020. 76 p.

Orientador(a): Bruno Henrique Sardinha de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Cigarrinha-do-milho. 2. Transgenes. 3. Homozigose. I.  
Universidade Federal de Lavras II. Título.

**LARAH MARTINS FREITAS**

**EFEITO DA ZIGOSIDADE EM HÍBRIDOS DE MILHO TRANSGÊNICO A**

***Dalbulus maidis* (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)**

**EFFECT OF ZYGOSITY ON HYBRIDS OF TRANSGENIC CORN TO**

***Dalbulus maidis* (HEMIPTERA: CICADELLIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA 07 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza UFLA

Prof. Dr. Geraldo Andrade Carvalho UFLA

Pesq. Dr. Simone Martins Mendes EMBRAPA

Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

*À minha Mãe Fabiana e ao meu Pai Danilo agradeço por todo amor, carinho e apoio que me foi dado durante todos os momentos em que necessitei na minha caminhada até aqui.*

*Aos meus avós, tios e tias pelos exemplos de pessoa e profissionais que quero me tornar.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a todos os anjos que estiveram comigo me iluminando e guiando meus passos por onde eu estivesse.

À todos aqueles que estavam ao meu lado torceram por mim, me ergueram e estenderam as suas mãos quando eu precisava.

Aos meus queridos pais Fabiana e Danilo por todo carinho e apoio que me foi oferecido e retribuído em momentos de grandes decisões e incertezas em que passei durante o mestrado.

Aos meus avós Adélia e José, Aurete e Waldemar pelas preocupações para comigo e por sempre me darem todo amor.

Aos meus tios e tias em especial Frank, Simone, Charles, Marina, Cristiane e Lucas aqueles que me fazem me espelhar e querer ser como eles tanto como pessoa e profissional de alto nível que se tornaram com muito esforço e admiração que tenho por eles.

Ao meu amigo, companheiro e namorado Harisson por me dar todo carinho e persistir juntamente comigo em todas minhas escolhas, me levantando e estendendo as mãos quando eu precisava.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade que me foi dada de realizar uma graduação no curso de Agronomia e um mestrado em um programa de pós-graduação.

Ao Departamento de Entomologia pela confiança e apoio que me foi dado enquanto discente.

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Entomologia pela oportunidade concedida de engrandecimento profissional e pessoal nessa área de estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao meu orientador e professor Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza pelos ensinamentos e experiências a mim repassados, pela paciência, dedicação e amizade que foram de grande relevância para realização deste trabalho, crescimento acadêmico e profissional.

À equipe de Laboratório de Resistência a Insetos-praga e Manejo Integrado de Pragas Amanda G. Souza, Daniel M. Costa, Fernanda Ferreira, Amanda N., Filipe Carneiro, Eduardo Resende, Gilberto, João, Helen por toda ajuda nos experimentos em que desenvolve em campo e dentro do laboratório.

Aos meus amigos da graduação e da vida Giuliana Barbosa, Ana Reale, Yara Santos,

Vínicius Zuppa, Ronnie Tomaz, Ivens Henrique, Alisson e Osmar que mesmo conforme os anos a Amizade continua firme e forte nada muda. E com esses posso contar nos momentos bons e ruim da vida.

Aos meus queridos amigos da Pós-Graduação Amanda G., Rosamara, Emanuel, Marília, Sóstenes, Marvin e Ramom que em diversos momentos de dificuldade estavam ali para mostrar que o caminho tinha que continuar independente dos obstáculos e também me proporcionaram momentos de distração e felicidade.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	HIPÓTESE.....	18
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
4.1	Cultura do milho.....	20
4.2	Híbridos transgênicos e manejo de resistência de insetos.....	21
4.3	Zigossidade em híbridos transgênicos como estratégia de manejo de resistência de insetos.....	22
4.4	Cigarrinha-do-milho, <i>Dalbulus maidis</i> .....	23
4.4.1	Enfezamentos do milho.....	24
4.4.2	Virose-da-risca do milho.....	25
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1	Híbridos de milho.....	27
5.2	Condução dos experimentos.....	27
5.3	Avaliação da infestação de cigarrinhas e sintomas das doenças transmitidas.....	28
5.4	Avaliação da produção dos híbridos de milho.....	28
5.5	Análise dos dados.....	28
6	RESULTADOS.....	30
6.1	Experimento Primeira Safra 2017/2018, Lavras-MG.....	30
6.1.1	Incidência de <i>Dalbulus maidis</i> .....	30
6.2	Experimento Segunda Safra 2018/2019, Lavras-MG.....	33
6.2.1	Incidência de <i>Dalbulus maidis</i> .....	33
6.3	Ocorrência de doenças, Safra 17/18, Lavras-MG.....	35
6.3.1	Enfezamento vermelho - <i>Maize bushy stunt phytoplasma</i> (MBSP).....	35
6.3.2	Enfezamento pálido - <i>Corn stunt Spiroplasma</i> (CSS).....	37
6.3.3	Virose-da-risca - <i>Maize rayado fino virus</i> (MRFV).....	39
6.4	Ocorrência de doenças, Safra 2018/2019, Lavras-MG.....	41
6.5	Produtividade de grãos, Lavras-MG.....	42
6.6	Experimento Primeira Safra 2017/2018, Jaboticabal-SP.....	43
6.6.1	Incidência de <i>Dalbulus maidis</i> .....	43
6.7	Experimento Segunda Safra 2018, Jaboticabal-SP.....	44



6.7.1 Incidência de <i>Dalbulus maidis</i> .....	44
6.8 Ocorrência de doenças, primeira safra 2017/2018, Jaboticabal-SP.....	45
6.9 Ocorrência de doenças, segunda safra 2018, Jaboticabal-SP .....	47
6.10 Produtividade de grãos nas safras 2017/2018 e 2018/2019, Jaboticabal-SP.....	48
7 DISCUSSÃO .....	49
8. CONCLUSÕES .....	54
<u>REFERÊNCIAS</u> .....	55

## RESUMO

A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) é responsável por prejuízos na produção do milho principalmente por ser vetora dos patógenos dos enfezamentos vermelho (MBSP) e pálido (CSS), e da virose-da-risca-fina (MRFV). As tecnologias transgênicas *Bt* da cultura são voltadas para o manejo de lagartas de lepidópteros, com o uso de híbridos que codificam proteínas *Bt* a partir da expressão de apenas um alelo do gene transgênico. A adição de outro alelo é uma abordagem recente e promissora visando ao manejo de lagartas resistentes na cultura do milho. Assim, torna-se importante conhecer os efeitos da adição do alelo transgênico na infestação e injúrias em pragas não alvo da tecnologia da cultura para suportar a viabilidade do uso dessa estratégia de manejo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de híbridos de milho que expressam as proteínas Cry1F, Cry1A.105 + Cry2Ab2 em homozigose em comparação com suas versões em hemizigose e convencional na ocorrência de *D. maidis* e das doenças transmitidas à cultura e produção de grãos. Os experimentos foram realizados em Lavras-MG e Jaboticabal-SP em duas safras agrícolas, com três híbridos aqui denominados H1, H2 e H3 com os eventos TC1507 x MON89034 x NK603 (PowerCore™) com os transgenes em homozigose e hemizigose e um híbrido convencional, constituindo sete tratamentos e quatro blocos. O número de *D. maidis* foi avaliado ao longo do estágio vegetativo e a porcentagem de plantas com sintomas das doenças no estágio reprodutivo. A produtividade de grãos foi avaliada ao quando as plantas atingiram maturidade fisiológica em cada localidade e safra. Em geral, os híbridos homozigotos e hemizigotos não foram diferentes quanto à incidência de *D. maidis* e transmissão das doenças, não havendo efeito negativo da adição dos alelos transgênicos nos híbridos homozigotos. Com relação ao rendimento de grãos, os híbridos homozigotos tiveram desempenho semelhante aos híbridos hemizigotos e o convencional, sendo maiores nos transgênicos nas primeiras safras de ambas localidades. Conclui-se que os híbridos transgênicos que expressam as proteínas Cry1F, Cry1A.105 + Cry2Ab2 em homozigose não favorecem a infestação de *D. maidis* e ocorrência das doenças transmitidas em relação às respectivas versões em hemizigose. O fator zigosidade também não causa efeito negativo sobre a produtividade de grãos de milho.

**Palavras-chave:** Transgenes. Homozigose. Cigarrinha-do-milho. Virose-da-risca-fina. Enfezamento vermelho. Enfezamento pálido.

## ABSTRACT

The corn leafhopper *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) is responsible for causing losses in maize production by vectoring transmission of the pathogens *Maize bush stunt phytoplasma* (MBSP), *Corn stunt spiroplasma* (CSS), and *Maize rayado fino virus* (MRFV). Deployment of transgenic technologies in maize crop is focused on the management of lepidopteran larvae, with the use of hybrids encoding *Bt* proteins from expression of only one allele of the transgenic gene. The addition of another allele is a recent approach that is promising for management of resistant larvae in maize crop. Thus, it is important to understand the effects of adding a transgenic allele on the infestation and injury of pests non-target of the technology to support the viability of using this management strategy. This work aimed at evaluating the influence of maize hybrids expressing the proteins Cry1F, Cry1A.105 + Cry2Ab2 in homozygosis in comparison with their versions in hemizygosis and a conventional hybrid on the occurrence of *D. maidis*, the diseases transmitted, and grain yield. Experiments were carried out in Lavras-MG and Jaboticabal-SP in two crop seasons, with three hybrids here referred to as H1, H2, and H3 containing the events TC1507 x MON89034 x NK603 (PowerCore™) with the transgenes in homozygosis and hemizygosis and a conventional hybrid, totaling seven treatments and four blocks as replicates. The number of *D. maidis* was recorded throughout plants vegetative stage, and the percentage of plants with the diseases symptoms at the reproductive growth stage of maize. Grain yield was recorded at physiological maturity in each location and crop season. Overall, homozygous and hemizygous hybrids did not differ for the incidence of *D. maidis* and diseases transmission, without negative effects with the addition of the transgenic allele in the homozygotes. Regarding grain yield, homozygous hybrids performed similar to the hemizygous and conventional hybrids, and the transgenic hybrids attained higher yields in the first seasons of both experiment sites. As conclusion, transgenic hybrids expressing the proteins Cry1F, Cry1A.105 + Cry2A in homozygosis state do not favor infestation of *D. maidis* and diseases transmission relative to the respective hemizygous versions. Zygosity also do not cause negative effects on maize grain yield.

**Keywords:** Transgene. Homozigosis. Corn leafhopper. Maize Rayado Fino Virus. Maize Bush Stunt Phytoplasma. Corn Stunt Spiroplasma.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Número médio ( $\pm$  EP) de *D. maidis* nos estádios V4-V5 (A), V7-V8 (B) e V11-V12 (C) nos híbridos transgênicos e convencional de milho na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .... 16

Figura 2 - Comparação de médias do número ( $\pm$  EP) de *D. maidis* entre os híbridos nas versões em homozigose e hemizigose no estádio V4-V5, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). ..... 31

Figura 3 - Comparação de médias do número ( $\pm$  EP) de *D. maidis* entre os híbridos de milhos nas versões em homozigose e hemizigose no estádio V7-V8, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). ..... 32

Figura 4 - Número médio ( $\pm$  EP) de *D. maidis* nos estádios V4-V5 (A), V8-V9 (B) e V11-V12 (C) nos híbridos transgênicos de milho, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). ..... 33

Figura 5 - Comparação de médias do número ( $\pm$  EP) de *D. maidis* entre os híbridos de milho nas versões em homozigose e hemizigose no estádio V11-V12, na segunda safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). ..... 34

Figura 6 - Incidência de enfezamento vermelho (MBSP) nos híbridos de milho no estádio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa

pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....35

Figura 7 - Interação das médias de incidência (% ,  $\pm$  EP) de sintomas de enfezamento vermelho (MBSP) entre os híbridos de milho e suas versões em homozigose e hemizigose, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....36

Figura 8 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) de enfezamento pálido (CSS) nos híbridos de milho no estágio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....37

Figura 9 - Comparação de médias de incidência (% ,  $\pm$  EP) de sintomas de enfezamento pálido (CSS) entre os híbridos de milho e suas versões em homozigose e hemizigose, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....38

Figura 10 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) de virose-da-risca (MRFV) nos híbridos de milho no estágio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....39

Figura 11 - Comparação de médias de incidência (% ,  $\pm$  EP) de sintomas de virose-da-risca (MRFV) entre os híbridos de milho e suas versões em homozigose e hemizigose, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....40

Figura 12 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) das doenças MBSP (A), CSS (B) e MRFV (C) nos híbridos de milho no estágio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. (ho) híbrido homozigoto, (he) híbrido hemizigoto e (co) híbrido convencional. Letras diferentes sobre as barras denotam

diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....	41
Figura 13 - Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> ) de grãos dos híbridos de milho em Lavras-MG. Produtividade de grãos na safra 2017/2018 (A); Produtividade de grãos na safra 2018/2019 (B). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....	42
Figura 14 - Número médio ( $\pm$ EP) de <i>D. maidis</i> no estágio V8 nos híbridos de milho transgênicos em homozigose e hemizigose e híbrido convencional, na primeira safra em Jaboticabal-SP. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....	43
Figura 15 - Número médio ( $\pm$ EP) de <i>D. maidis</i> no estágio V8 nos híbridos de milho transgênicos em homozigose e hemizigose e híbrido convencional, na segunda safra em Jaboticabal-SP. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....	44
Figura 16 - Incidência (% , $\pm$ EP) de doenças nos híbridos de milho transgênicos em homozigose, hemizigose e convencional no estágio R2-R3, na primeira safra em Jaboticabal-SP. (A) enfezamento vermelho (MBSP), (B) enfezamento pálido (CSS) e (C) virose-da-risca (MRFV). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....	45
Figura 17 - Incidência (% , $\pm$ EP) de doenças nos híbridos transgênicos em homozigose e hemizigose no estágio R2-R3, na primeira safra em Jaboticabal-SP. (A) enfezamento vermelho (MBSP), (B) enfezamento pálido (CSS) e (C) virose-da-risca (MRFV). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....	46
Figura 18 - Incidência (% , $\pm$ EP) de doenças nos híbridos de milho transgênicos em homozigose, hemizigose e convencional no estágio R2-R3, na segunda safra em Jaboticabal-SP. Enfezamento vermelho (A), enfezamento pálido (B) e virose-da-risca (C). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). ....	47

Figura 19 - Produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) nos híbridos de milho transgênicos em homozigose, hemizigose e convencional nas safras de Jaboticabal-SP. (A) Produtividade de grãos em 2017/2018, (B) Produtividade de grãos em 2018/2019. Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....48

## 1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos eventos transgênicos *Bt* de milho são responsáveis pelo controle de lepidópteros, como a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), considerada a principal praga desfolhadora da cultura do milho (NIU et al., 2014). Há relatos da ampla incidência de *S. frugiperda* nas Américas e recentemente em 43 países da África e alguns da Ásia, como Índia, China e Tailândia (GOERGEN et al., 2016; PRASANNA et al., 2018; SHARANABASAPPA et al., 2018a; SHYLESHA et al., 2018). Devido a sua importância na redução da produção de milho e outras culturas hospedeiras, vários avanços tecnológicos em melhoramento genético foram desenvolvidos e possibilitaram com a biotecnologia desenvolver híbridos transgênicos resistentes (MIGUEL; ESPERANCINI; GRIZOTTO, 2014). As concentrações e classes de proteínas *Bt* sintetizadas pelas plantas transgênicas possuem grande influência na mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* (WAQUIL et al., 2004). Apesar da eficiência de controle proporcionada de modo geral pelos transgênicos, aumentou-se o número de casos de resistência de *S. frugiperda* a várias proteínas *Bt* em função de práticas inadequadas de manejo e variabilidade genética do inseto-praga (FARIAS et al., 2014; JAKKA; KNIGHT; JURAT-FUENTES, 2014; STORER et al., 2010; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013).

A sustentabilidade das tecnologias *Bt* é um desafio para o Manejo de Resistência de Insetos (MRI) devido à massiva adoção de híbridos resistentes à lagarta-do-cartucho, que resultou no abandono do uso de importantes práticas de manejo integrado de pragas (BIALOZOR, 2017). Assim, alguns fatores como a não adoção de áreas de refúgio; a sobrevivência de indivíduos heterozigotos; ambiente e altas temperaturas que favorecem o crescimento populacional da praga; o cultivo de duas safras agrícolas seguidas de milho (STORER et al., 2010); bem como a utilização de eventos com expressão de proteínas em baixa dose (FARIAS et al., 2014; STORER et al., 2010), contribuem com o aumento da frequência de genes resistentes em populações de insetos. Portanto, novas estratégias de MRI devem ser pesquisadas a fim de proporcionar maior durabilidade das tecnologias transgênicas quanto à eficiência de controle das pragas-alvo.

Novas abordagens em MRI estão sendo investigadas, como a ação aditiva do alelo transgênico para o controle de lagartas com o objetivo de a proteína transgênica ser expressa em alta dose, isto é, em concentrações suficientes para causar a morte de mais de 95% dos indivíduos heterozigotos da população (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011). Quando uma planta está com o transgene em hemizigose, apresenta dosagem genética de meio N, enquanto indivíduos com o locus em homozigose podem chegar à dosagem do dobro de N; ou



seja, quando o evento está em homozigose é possível atingir uma alta expressão do transgene, que pode ser até quatro vezes maior em relação à planta hemizigota (CALIGARI et al., 1993; HOWARD; HOOD, 2014; JAMES et al., 2002; LAW et al., 2006). Foi relatado que os níveis de expressão de proteínas *Bt* encontrados em folhas de milho em híbridos homozigotos foi de 54% para Cry1F, 151% para Cry1A.105 e 146% para Cry2Ab2 maiores que nas versões hemizigotos, sendo assim uma expressão dobrada entre os híbridos e suas versões (EGHRARI et al., 2019).

A maioria dos híbridos de milho transgênicos desenvolvidos pelas empresas de melhoramento são hemizigotos para a transgenia (EGHRARI et al., 2019; MORAES, 2017), de modo que os híbridos contêm um alelo transgênico e um alelo alternativo nulo, que caracteriza os híbridos em hemizigose (GUADAGNUOLO; CLEGG; ELLSTRAND, 2006). Em relação à adição do alelo nos híbridos, há a possibilidade de se obter resultados inesperados. Híbridos em homozigose podem apresentar efeitos positivos em função do aumento da concentração de proteínas na planta, porém, também pode acarretar efeitos negativos, como causar silenciamento gênico transcricional, pós-transcricional, e até ser letal, ou ter o mesmo desempenho dos hemizigotos (EGHRARI et al., 2019; JAMES et al., 2002).

Apesar desses efeitos negativos em algumas ocasiões, essa nova abordagem pode constituir uma estratégia alternativa eficiente e promissora no manejo de lagartas resistentes, permitindo a expressão em alta dose das proteínas, o que também pode favorecer a utilização de eventos transgênicos que atualmente já não possuem mais eficiência de controle em campo. Para que essa estratégia seja eficiente e possa ser empregada, é de grande importância avaliar os efeitos sobre a infestação de outras pragas importantes da cultura do milho, dando maior suporte à viabilidade de sua adoção.

A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) causa perdas significativas de produtividade à cultura do milho através da sucção de seiva das plantas de maneira direta, e perdas indiretas por ser vetora de doenças. As doenças transmitidas às plantas de milho pelas cigarrinhas e os respectivos agentes causais são o enfezamento pálido (*Spiroplasma kunkelii*), o enfezamento vermelho (*Phytoplasma*) e a virose-da-risca (“*Maize rayado fino vírus*” – MRFV), que provocam, entre outros sintomas, a formação de estrias esbranquiçadas irregulares nas folhas a partir da base, e crescimento reduzido das plantas; avermelhamento generalizado da planta, proliferação de espigas e perfilhamentos; e a formação de pontos cloróticos na base e ao longo das nervuras das folhas jovens, respectivamente (OLIVEIRA; PINTO; FERNANDES, 2013). Prejuízos causados por essas doenças têm sido observados principalmente em áreas de cultivo de milho de segunda

safra ou “milho safrinha” (OLIVEIRA, E., et al., 2002). Por possuir grande capacidade de aumento da população e de dispersão em regiões produtoras de milho, as cigarrinhas infectam facilmente lavouras em formação (OLIVEIRA; LOPES; NAULT, 2013).

Ainda não foram avaliados os efeitos da adição de alelos transgênicos em híbridos de milho em relação à ocorrência de pragas não alvo da tecnologia, como a cigarrinha-do-milho. Pelo fato de *D. maidis* transmitir patógenos às plantas de milho além das injúrias diretas, podem ser verificados efeitos mais complexos devido a possíveis interações dos transgenes com os genes naturais das plantas, efeitos na fisiologia e produtividade das mesmas, e suscetibilidade às doenças. Além disso, pode haver a possibilidade de maior incidência de *D. maidis* nos híbridos homocigotos pela menor competição com as lagartas-alvo, como *S. frugiperda*. Em relação às tecnologias de transgênicos avaliados no presente trabalho, há a expectativa de que a estratégia de uso de plantas em homocigose constitua uma maneira de reciclar as tecnologias que estão sendo perdidas com passar dos anos devido à evolução da resistência em populações de espécies de lagartas, em especial *S. frugiperda*.

Dessa forma, espera-se com este trabalho elucidar os efeitos da zigosidade em híbridos transgênicos de milho na infestação de *D. maidis* e sintomas das doenças transmitidas. As informações aqui obtidas darão maior suporte à viabilidade do uso dessa estratégia de manejo de resistência de lagartas na cultura do milho.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da zigosidade em híbridos transgênicos de milho que expressam as proteínas Cry1F, Cry1A.105 + Cry2Ab2 com os eventos (TC1507 x MON89034 x NK603), na infestação de *D. maidis*, sintomas das doenças transmitidas e produção de grãos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da zigosidade em três híbridos transgênicos que expressam as proteínas Cry1F + Cry1A.105 + Cry2Ab2 na infestação de *D. maidis* e sintomas das doenças transmitidas nas safras de verão de 2017/2018 e 2018/2019 em Lavras, MG;

- Avaliar os efeitos da zigosidade em três híbridos transgênicos que expressam as proteínas Cry1F + Cry1A.105 + Cry2Ab2 na infestação de *D. maidis* e sintomas das doenças transmitidas na primeira e segunda safras de 2017/2018 em Jaboticabal, SP.

## **3 HIPÓTESE**

- Os híbridos de milho apresentam diferentes respostas quanto à infestação de *D. maidis* e resistência às doenças transmitidas em função da interação dos transgenes com os

demais genes das plantas e da interação com os diferentes ambientes.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Cultura do milho

O milho é o cereal mais produzido no mundo, cujos grãos são destinados à alimentação humana e animal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2017). No Brasil, o milho é produzido em duas safras durante um ano agrícola, sendo a segunda safra ou “safrinha” responsável por cerca de dois terços da produção total (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2019). A cultura do milho é de grande importância econômica, principalmente devido ao valor nutricional dos grãos, por seu intenso uso na alimentação humana e animal, e como matéria-prima para a indústria (GALVÃO et al., 2014).

A produção de milho tem um papel socioeconômico importante no agronegócio brasileiro devido à produção dessa cultura estar inserida em todas as regiões no país, e também em função do grande volume de grãos produzidos, no qual a produção nacional primária responde por 37% dos grãos (CALDARELLI; BACCHI, 2012). De acordo com a última estimativa feita pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a estimativa de área de milho de primeira safra na safra 2019/20 é ter crescimento de 3,2% na área cultivada, totalizando 4,23 milhões de hectares, e a produção estimada em 25,6 milhões de toneladas, 0,3% superior a 2018/19. Para a produção total do milho primeira e segunda safras, estima-se uma produção de 100,1 milhões de toneladas, 0,3% acima da safra passada (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2020).

Na cultura do milho, os insetos-praga podem causar perdas de até 20% na produção, que são estimadas em cerca de 2 bilhões de dólares (OLIVEIRA et al., 2014). Um importante fator que contribuiu para a redução das perdas na produção de milho tanto no Brasil quanto no mundo foi o emprego da transformação genética de plantas visando ao controle de pragas (MICHELOTTO et al., 2017; WAQUIL et al., 2013). No Brasil, 88,4% da área plantada é ocupada com híbridos transgênicos (CÉLERES, 2017). A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é a instituição que aprova organismos geneticamente modificados no país, e as aprovações comerciais de milho transgênico incluem eventos com resistência a insetos, tolerância a herbicidas, modificação de produtos, tolerância à seca e controle de polinização (INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA, 2017).

Grande parte dos eventos transgênicos *Bt* são responsáveis pelo controle de larvas de lepidópteros, como a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*, uma das principais pragas desfolhadoras da cultura do milho (FRIZZAS et al., 2014; MORAES et al., 2015; NIU et al.,

2014; SANTOS-AMAYA et al., 2015; SIEBEBRT et al., 2012; STORER et al., 2012). Alguns dos principais benefícios do plantio de culturas *Bt* incluem a redução no uso de inseticidas, danos reduzidos a organismos não-alvo e supressão das principais pragas de insetos, um efeito que pode beneficiar os agricultores independentemente de produzirem ou não plantas *Bt* devido a menores perdas de rendimento da produção por pragas (CARRIÈRE et al., 2003; CATTANEO et al., 2006; DIVELY et al., 2018; HUANG et al., 2005; HUTCHISON et al., 2010; MARVIER et al., 2007). Entretanto, com a rápida adoção e larga escala de uso de tecnologias *Bt*, há relatos de evolução de resistência de pragas a essas tecnologias, o que por sua vez pode diminuir os benefícios advindos do uso das plantas transgênicas (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017).

As concentrações de proteínas *Bt* sintetizadas por plantas transgênicas possuem grande influência na mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* (WAQUIL et al., 2004). Porém, nos últimos anos aumentou-se o número de casos de resistência de *S. frugiperda* a várias proteínas *Bt* (FARIAS et al., 2014; JAKKA; KNIGHT; JURAT-FUENTES, 2014; OMOTO et al., 2016; STORER et al., 2010; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013), necessitando a adoção de estratégias de manejo para mitigar esses problemas.

#### **4.2 Híbridos transgênicos e manejo de resistência de insetos**

Desde a liberação comercial de plantas geneticamente modificadas, com o algodão transgênico nos EUA em 1996, tem havido a preocupação de que a exposição em larga escala de populações-alvo de pragas a proteínas *Bt* em culturas transgênicas poderia levar à resistência a insetos, reduzindo a utilidade dessa tecnologia para o manejo de pragas (ROUSH, 1994; GOULD, 1998). Em relação à evolução de resistência em espécies de pragas, há relatos de campo de resistência de *S. frugiperda* ao milho transgênico em Porto Rico, Brasil, Argentina e Estados Unidos (FARIAS et al., 2014; HUANG et al., 2014; MONNERAT et al., 2015; STORER et al., 2010, 2012; TRUMPER., 2014). Muitos fatores contribuíram para a e rápida evolução da resistência na lagarta-do-cartucho, como a alta taxa reprodutiva e multivoltinismo da espécie, e também devido a práticas agrícolas que impõem alta pressão de seleção, como muitos ciclos de safra por ano, juntamente com o aumento de adoção de cultivares e híbridos *Bt* (FARIAS et al., 2014; FATORETTO et al., 2017 HUANG et al., 2014; STORER et al., 2010).

Avanços em biotecnologia têm permitido o desenvolvimento de híbridos de milho *Bt* que expressam mais de uma proteína inseticida na mesma planta (piramidação gênica), as quais frequentemente representam modos de ação únicos e independentes (MOAR;

ANIKUMAR, 2007). Assim, caso essas premissas sejam atendidas, a piramidação de genes *bt* pode retardar o estabelecimento de populações de insetos resistentes em campo (HEAD; GREENPLATE, 2012). A estratégia de piramidação de genes *bt* é geralmente caracterizada pelo aumento no nível de resistência contra as pragas-alvo (STORER; THOMPSON; HEAD, 2012). No Brasil, os principais eventos transgênicos piramidados, como PowerCore™, Agrisure® Viptera3, VT PRO3® e Leptra®, combinam pelo menos duas classes de genes *bt* visando ao controle de *S. frugiperda* (INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA, 2019).

Outra estratégia de manejo de resistência de insetos (MRI) é a utilização de eventos de alta dose que expressam uma quantidade suficiente da proteína *Bt* para causar mortalidade de mais de 95% dos indivíduos heterozigotos resistentes. A expressão em alta dose deve ser combinada com o cultivo de áreas de refúgio com híbridos convencionais ou não *Bt* para retardar a evolução da resistência (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011). A estratégia de alta dose + refúgio estruturado é uma estratégia recomendada para retardar a resistência de *S. frugiperda* às proteínas *Bt*, a qual permite o acasalamento de indivíduos homozigotos resistentes de campos *Bt* com populações homozigotas suscetíveis de campos não *Bt* (ANDOW., 2008; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN., 2011). O resultado do acasalamento dos indivíduos resistentes e suscetíveis são indivíduos heterozigotos, que mantém a suscetibilidade a eventos transgênicos de alta dose (HORIKOSHI et al., 2016).

### **4.3 Zigosidade em híbridos transgênicos como estratégia de manejo de resistência de insetos**

A sustentabilidade das tecnologias *Bt* é um desafio para o Manejo de Resistência de Insetos devido à expressão contínua das proteínas transgênicas nos tecidos das plantas, que causam alta pressão de seleção sobre as pragas-alvo e favorecem a evolução da resistência em suas populações (ANDOW, 2008; MCGAUGHEY; WHALON, 1992). Assim, alguns fatores como a não adoção de áreas de refúgio (SHELTON et al., 2000) e a utilização de eventos com expressão de proteínas em baixa dose (FARIAS et al., 2014; STORER et al., 2010) contribuem com o aumento da frequência de genes resistentes em populações de insetos. Portanto, novas estratégias de MRI devem ser pesquisadas a fim de proporcionar maior durabilidade das tecnologias transgênicas quanto à eficiência de controle das pragas-alvo.

Novas abordagens em MRI têm sido recentemente investigadas, como a ação aditiva do alelo transgênico para o controle de lagartas desfolhadoras com o objetivo de a proteína transgênica ser expressa em alta dose, isto é, em concentrações suficientes para causar a morte de mais de 95% dos indivíduos heterozigotos (HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011).

Quando uma planta está com o transgene em hemizigose, apresenta dosagem genética de  $N/2$ ; enquanto indivíduos com o locus em homozigose podem chegar à dosagem de  $2N$ , ou seja, quando o evento está em homozigose é possível atingir uma maior expressão do transgenes, podendo ser até quatro vezes maior em relação à planta hemizigota (CALIGARI et al., 1993; HOWARD; HOOD, 2014; JAMES et al., 2002; LAW et al., 2006). Essa abordagem pode ser uma estratégia alternativa no manejo de lagartas resistentes, permitindo a expressão em alta dose das proteínas, o que também pode favorecer a reutilização de eventos que atualmente já não possuem mais eficiência de controle (MORAES, 2017).

A maioria ou totalidade dos transgênicos de milho atualmente utilizados são híbridos em hemizigose, isto é, possuem apenas um alelo contendo o evento transgênico. De acordo com Guadagnuolo (2006), para a obtenção do híbrido transgênico são cruzadas duas linhagens, sendo uma delas homozigota para o transgene e a outra sem transgenia, denominada de linhagem convencional. Nos híbridos homozigotos pode haver efeitos deletérios devido à zigosidade dessas plantas transgênicas, e também pode-se ter efeito positivo de aumento na concentração da proteína transgênica na planta; efeito neutro por resultar no mesmo efeito de um híbrido hemizigoto; ou efeito negativo por causar silenciamento gênico pós transcricional, e até mesmo efeito letal para a planta homozigota (HOOD et al., 2012; JAMES et al., 2002). Assim, torna-se fundamental avaliar cuidadosamente os efeitos da zigosidade em híbridos de milho transgênico às pragas-alvo e não alvo da tecnologia antes de sugerir o uso dessa estratégia.

#### **4.4 Cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis***

A cigarrinha-do-milho *D. maidis* é um inseto com cerca de 5,0 mm, coloração amarelo-palha, e que, quando adulta, apresenta duas manchas circulares negras bem marcadas na coroa (OLIVEIRA; PINTO; FERNANDES, 2013). A cigarrinha geralmente infesta as plantas de milho no interior do cartucho e causa dano direto pela sucção de seiva (NAULT et al., 1983) e indiretamente por ser vetora dos mollicutes *Phytoplasma* e *Spiroplasma kunkelii*, agentes causais do enfezamento vermelho e enfezamento pálido, respectivamente, além do vírus-da-risca *Maize rayado fino virus* (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA; PINTO; FERNANDES, 2013).

As cigarrinhas, por terem alto potencial biótico e migrarem a longas distâncias, colonizam campos de milhos recém-germinados. Isso ocorre em função de *D. maidis* apresentar eficiência de transmissão dos patógenos próxima a 100% (OLIVEIRA et al., 2011) e possuir grande capacidade de colonização e dispersão em regiões produtoras de milho, colonizando facilmente lavouras em formação (OLIVEIRA; LOPES; NAULT, 2013). O

resultado da combinação entre a alimentação da cigarrinha e a transmissão de doenças resulta em perdas substanciais de rendimento e qualidade da cultura do milho (SUMMERS; NEWTON; OPGENORTH, 2004).

Os danos causados por essas doenças refletem em prejuízos severos na cultura do milho, principalmente com o aumento de áreas cultivadas com milho “safrinha”. Estudos da dinâmica populacional da cigarrinha-do-milho no Brasil foram conduzidos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, e demonstraram de maneira geral que *D. maidis* pode ocorrer continuamente o ano todo, assim contribuindo para o aumento das populações de cigarrinhas e das doenças transmitidas (ÁVILA; ARCE, 2008; LANDAU; MORAIS, 2015 ; MENESES, 2015; OLIVEIRA, E., et al., 2013; WAQUIL, 1997). Embora a utilização de genótipos resistentes seja o método de controle mais eficiente e recomendado para o controle dessas doenças (POWER, 1987; SHURTLEFF, 1980), nem todas as variedades e híbridos de milho disponíveis no mercado possuem resistência satisfatória, e por isso, alternativas para seu controle é altamente desejável. Estudos sobre o controle genético da resistência do milho aos enfezamentos causados por mollicutes têm sido realizados em geral, em condições de campo, com ocorrência de infecção natural (MENDONZA-ELOS et al., 2002; SILVEIRA et al., 2008).

Alternativas para a redução nas populações da cigarrinha-do-milho visando à redução da incidência das doenças transmitidas têm sido avaliadas, e o controle do inseto vetor vem sendo testado por alguns métodos. Por exemplo, Oliveira et al. (2007) e Oliveira et al. (2008) avaliaram a eficiência do controle químico por meio do uso dos inseticidas thiamethoxam, imidacloprid e carbofuran. De modo geral, com exceção de carbofuran, os inseticidas foram eficientes, causando mortalidade entre 94 e 100%. Silva et al. (2009) avaliaram o controle biológico pelo fungo *Beauveria bassiana*, e as concentrações do fungo entomopatogênico mais eficientes na safra e safrinha foram  $4 \times 10^{12}$  e  $8 \times 10^{12}$  de conídios viáveis  $\text{ha}^{-1}$ , demonstrando um resultado promissor para o manejo de *D. maidis*.

#### **4.4.1 Enfezamentos do milho**

Os agentes causais das doenças da cultura do milho são conhecidos como mollicutes: *Spiroplasma kunkelii* “*Corn stunt spiroplasma*” (WHITCOMB et al., 1986) e *Phytoplasma* “*Maize bushy stunt phytoplasma*” (BEDENDO; DAVIS; DALLY, 1997). Esses agentes são referidos respectivamente como espiroplasma e fitoplasma, e são microrganismos procariontes sem parede celular que são transmitidos de forma persistente-propagativa por espécies de cigarrinhas (BASCOPE-QUINTANILLA, 1977; NAULT, 1980). A cigarrinha *D. maidis* e *D. elimatus* (Ball) são os insetos vetores naturais dos mollicutes, sendo *D. maidis* o



principal vetor no Brasil e em outros países (NAULT, 1980, 1990; OLIVEIRA; LOPES; NAULT, 2013).

Os mollicutes causam doenças conhecidas como enfezamentos, e os enfezamentos pálido e vermelho foram descritos no Brasil na década de 1970 (COSTA et al., 1971; KITAJIMA; COSTA, 1972). Os sintomas dos enfezamentos se apresentam em maior intensidade na fase reprodutiva das plantas de milho, podendo manifestar antes ou na fase de florescimento (BASCOPE-QUINTANILLA, 1977; COSTA et al., 1971; MASSOLA et al., 1999; NAULT, 1980; OLIVEIRA et al., 1998; 2015). Os enfezamentos podem reduzir em até 70% a produção de grãos da planta doente em relação a uma planta sadia em genótipo de milho suscetível. A redução total da produção de uma área cultivada será sempre diretamente proporcional à incidência de plantas com enfezamentos (MASSOLA et al., 1999; OLIVEIRA; PINTO; FERNANDES, 2013; SABATO et al., 2013).

Os sintomas do enfezamento vermelho são geralmente caracterizados pelo avermelhamento generalizado das plantas, proliferação de espigas, redução em altura das plantas e, dependendo do híbrido ou cultivar, perfilhamento nas axilas foliares ou na base da planta. Os sintomas do enfezamento pálido caracterizam-se pela presença de faixas cloróticas ou esbranquiçadas que se estendem da base em direção ao ápice das folhas, acentuada redução na altura das plantas e no tamanho das espigas; há relatos de proliferação de espigas e de algum avermelhamento foliar em plantas com enfezamento pálido. Em geral, os sintomas dessas doenças manifestam-se tipicamente na época do enchimento de grãos ( MASSOLA, 1998; NAULT, 1980).

Muitas vezes não é possível diferenciar visualmente com absoluta certeza os dois tipos de enfezamentos, exceto quando há sintomas foliares característicos da infecção com espiroplasma (enfezamento pálido), que são estrias cloróticas tendendo à cor branca e irregulares, que se estendem da base em direção às folhas. As plantas de milho também podem ser simultaneamente infectadas com espiroplasma e fitoplasma, pois a cigarrinha pode transmitir de forma isolada ou simultânea os agentes causais (OLIVEIRA et al., 2007; 2015).

#### **4.4.2 Virose-da-risca do milho**

A virose-da-risca do milho é causada pelo agente etiológico “Maize rayado fino virus” (MRFV), pertencente ao gênero *Marafivirus*, família Tymoviridae (REGENMORTEL et al., 2000). O vírus é transmitido de forma persistente-circulativa pela cigarrinha *D. maidis*, que também é vetora dos dois outros importantes patógenos do milho, *S. kunkelii* e *Phytoplasma* (OLIVEIRA et al., 2004). Os afídeos *Schizaphis graminum* e *Rhopalosiphum*

*maidis* transmitem os vírus do subgrupo do SCMV e suas diversas estirpes pertencem ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae* estes podem ocorrer de forma mista juntamente com MRFV (GONÇALVES et al., 2007).

A virose-da-risca, também conhecida por “rayado fino”, caracteriza-se pela formação de pequenos pontos cloróticos nas folhas, os quais podem coalescer, adquirindo o aspecto de linhas pontilhadas e tracejadas paralelas às nervuras foliares secundárias, assemelhando-se a riscas finas. Esses sintomas são mais característicos nas folhas de plantas em estádios iniciais do milho, mas podem ocorrer também nas folhas mais velhas (GÁMEZ, 1980; SABATO; LANDAU; COELHO, 2013).

A redução de produção de grãos de milho pela ocorrência dessa virose pode variar de 10 a 100%, dependendo do ambiente, do estágio de desenvolvimento em que a planta foi infectada e das características genéticas do hospedeiro ( GÁMEZ, 2018; SHURTLEFF, 1989; VÁSQUEZ; MORA, 2007; ZAMBRANO et al., 2014;). Há casos de perdas de 43% na produção de milho em alguns países da América Central (DE LEÓN, 2004).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Híbridos de milho

Nos experimentos deste trabalho foram utilizados três híbridos (Corteva Inc., Wilmington, Delaware, EUA) com os eventos TC1507 x MON89034 x NK603 (PowerCore™), aqui denominados de H1, H2 e H3 que expressam as proteínas Cry1F, Cry1A.105 + Cry2Ab2. Cada híbrido consistiu de versões isogênicas homozigotas (ho) e hemizigotas (he) dos eventos transgênicos. Um híbrido convencional (co) não transgênico foi usado como testemunha, constituindo no total sete tratamentos. Assim, os tratamentos foram identificados nos experimentos como: T1 = H1 (ho); T2 = H2 (ho); T3 = H3 (ho); T4 = H1 (he); T5 = H2 (he); T6 = H3 (he); e T7 = H4 (co).

### 5.2 Condução dos experimentos

Foram conduzidos quatro experimentos em campo, sendo duas safras realizadas no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fazenda Múquem da Universidade Federal de Lavras (UFLA), entre as coordenadas geográficas latitude 21° 11'42" S e longitude 44° 59'21" O, em Lavras, MG. A região possui clima subtropical úmido (Cwa), temperado chuvoso (mesotérmico) com inverno seco e verão chuvoso, temperatura máxima mensal maior que 22 °C e média de 19,9 °C, com pluviosidade média anual de 1486 mm (ALVARES et al., 2013). O solo dessa área experimental é caracterizado como Latossolo-Vermelho-Amarelo (SILVA et al., 2012). Outro experimento foi realizado em duas safras na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP), entre as coordenadas geográficas latitude 21° 14'05" S e longitude 48° 17'09" O, em Jaboticabal, SP. Essa região apresenta clima savânico (Aw) com estação mais seca no inverno e verão mais chuvoso (RUBEL; KOTTEK, 2010). A temperatura máxima mensal é de 26,2 a 33,3 °C, e a temperatura média de 17,8 a 25,2 °C, com pluviosidade média anual de 1398 mm (ANDRE; ANUNCIACÃO, 2017). O solo dessa área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Eutrófico (COELHO et al., 2018).

Em Lavras, os experimentos foram conduzidos durante as safras de verão de 2017/2018, (semeadura: 16/12/2017) e 2018/2019 (semeadura: 16/11/2018), enquanto em Jaboticabal os experimentos foram realizados na primeira (semeadura: 04/10/2017) e segunda (semeadura: 23/01/2018) safras de 2017/2018. O delineamento dos experimentos foi em blocos casualizados, com sete tratamentos e quatro repetições (blocos). As parcelas experimentais foram constituídas por quatro linhas de 5 m de comprimento, espaçadas em 0,5 m em Jaboticabal e em 0,6 m em Lavras, com densidade de três sementes por metro linear,

totalizando 60 plantas por parcela. Para ambos os experimentos, o manejo seguiu as recomendações para a cultura do milho quanto ao uso de corretivos e fertilizantes, utilizando as fontes de NPK (08-28-16) para cobertura e para o plantio ureia e sulfato de amônio. Não foram aplicados inseticidas e fungicidas nos experimentos em ambas localidades.

### **5.3 Avaliação da infestação de cigarrinhas e sintomas das doenças transmitidas**

Durante a condução dos experimentos em ambos os locais, foram realizadas avaliações do número de cigarrinhas presentes no cartucho das plantas nos estádios de desenvolvimento V4-V5, V7-V8 e V11-V12 (RITCHIE et al., 1993). As ninfas e os adultos das cigarrinhas foram contabilizados em conjunto visualmente no cartucho de 12 plantas ao acaso nas duas linhas centrais de cada parcela.

Além da infestação de cigarrinhas, foi avaliada a porcentagem de incidência de sintomas das doenças enfezamento vermelho, enfezamento pálido e virose-da-risca. As avaliações das doenças foram realizadas no estádio reprodutivo R3-R4 em Lavras, e em R2-R3 em Jaboticabal, por meio da contagem de plantas com sintomas das doenças do total de 12 plantas amostradas nas duas linhas centrais de cada parcela.

### **5.4 Avaliação da produção dos híbridos de milho**

O efeito da zigosidade dos híbridos transgênicos de milho também foi avaliado na produção de grãos. Após a maturação fisiológica ~175 dias após emergência, realizou-se a colheita de 12 plantas ao acaso das duas linhas centrais por parcela, onde foram computados os valores de peso de grãos, ajustando-se o peso para 14% de umidade. A partir desses dados coletados foram feitos os cálculos da estimativa de produtividade ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de cada tratamento.

### **5.5 Análise dos dados**

As análises dos dados foram desenvolvidas no software R (R CORETEAM, 2016). As análises foram feitas para cada safra e localidade separadamente, e realizadas para os dados de número de cigarrinhas, incidência das doenças enfezamento vermelho (MBSP), enfezamento pálido (CSS) e raiado fino (MRFV), e produtividade de grãos. Estas variáveis foram analisadas utilizando modelos lineares generalizados (GLM); os desdobramentos dos graus de liberdade da fonte de variação foram “híbridos” e “híbridos x zigosidade”, em três subdivisões: híbridos homozigotos (ho), híbridos hemizigotos (he) e a combinação dos três grupos (homozigoto, hemizigoto e convencional).

Os contrastes ortogonais foram realizados a partir dos três grupos: o primeiro contraste comparou o grupo dos híbridos transgênicos (homozigoto e hemizigoto) com o híbrido

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; o mesmo contraste foi utilizado para comparar as médias de produtividade da primeira e da segunda safra dos híbridos homozigotos, hemizigotos e convencional, e também para comparação entre as versões homozigotas e hemizigotas de cada híbrido. As diferenças das médias dos parâmetros entre os híbridos foram analisadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

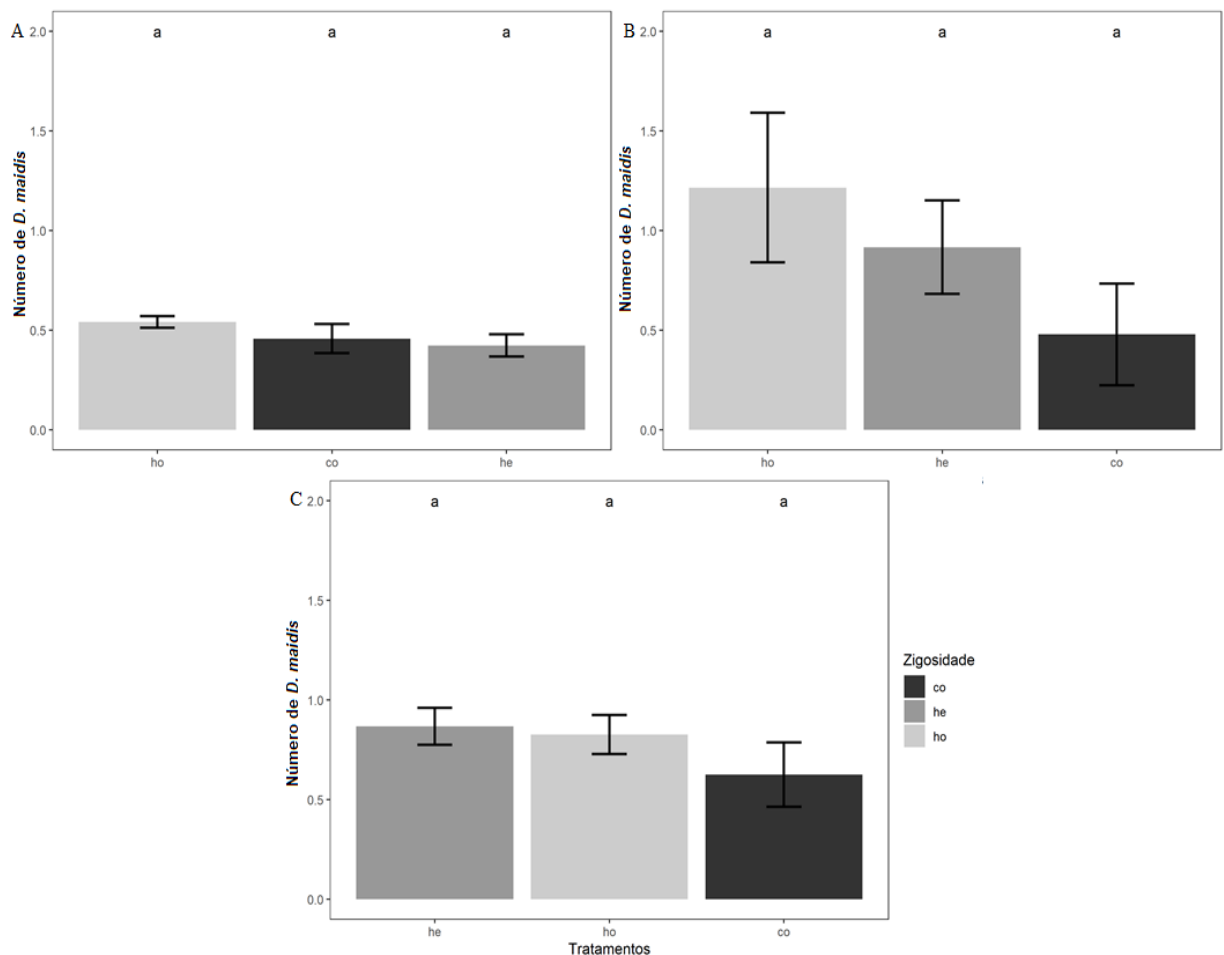
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Experimento Primeira Safra 2017/2018, Lavras-MG

#### 6.1.1 Incidência de *Dalbulus maidis*

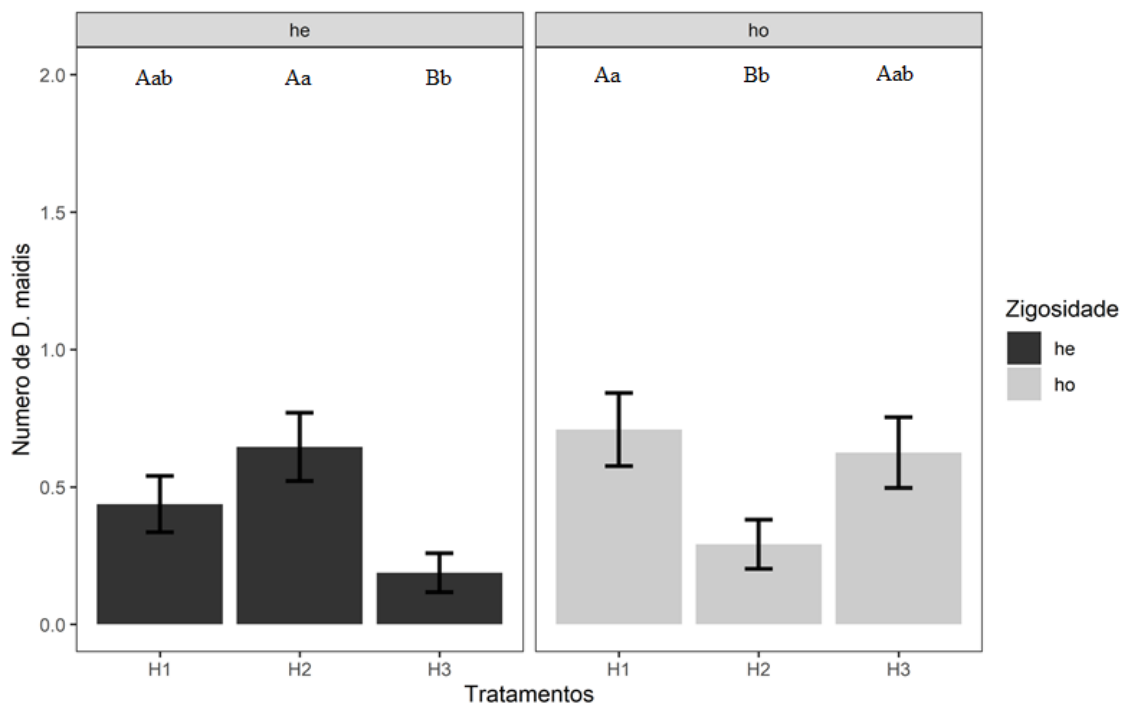
Os resultados obtidos da incidência de *D. maidis* na safra 2017/2018 em Lavras estão apresentados de acordo com as épocas de avaliação. No estágio V4-V5 ( $P = 0,2742$ ), V7-V8 ( $P = 0,1307$ ) e V11-V12 ( $P = 0,1464$ ), não houve diferenças significativas do número de *D. maidis* entre o híbrido convencional e os híbridos transgênicos (homozigoto e hemizigoto) (Figura 1).

Figura 1 - Número médio ( $\pm$  EP) de *D. maidis* nos estádios V4-V5 (A), V7-V8 (B) e V11-V12 (C) nos híbridos transgênicos e convencional de milho na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



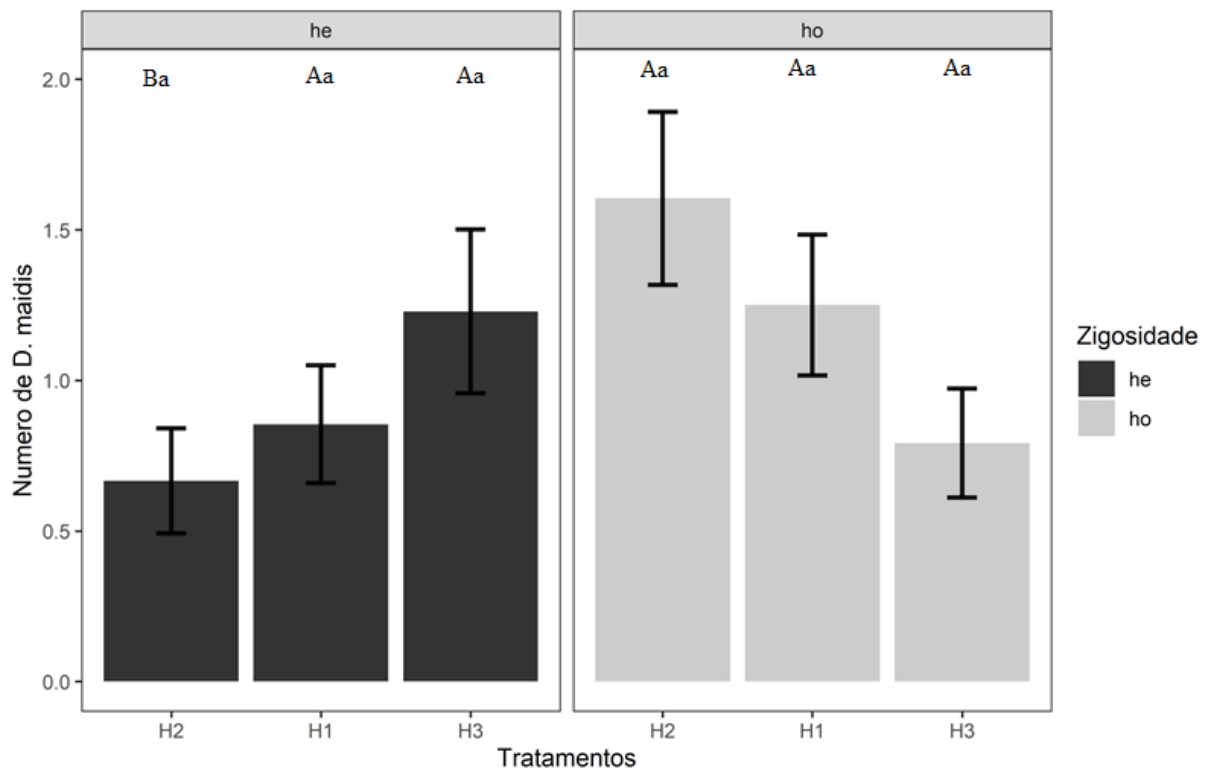
No estágio V4-V5, houve diferença da incidência de *D. maidis* nos híbridos entre suas versões transgênicas em homozigose e hemizigose. O híbrido H2 (he) teve maior incidência de cigarrinhas que sua versão H2 (ho), e de modo inverso H3 (ho) apresentou maior incidência que H3 (he). Apenas H1 não apresentou diferença no número de *D. maidis* entre as versões transgênicas. Com relação à zigosidade em função dos híbridos, H2 (he) apresentou maior incidência de *D. maidis* que o híbrido H3(he) e H1 (he) não diferenciou entre ambos. O híbrido H1 (ho) apresentou maior número de *D. maidis* que H2 (ho), e H3 (ho) não foi diferente de ambos (Figura 2).

Figura 2 - Comparação de médias do número ( $\pm$  EP) de *D. maidis* entre os híbridos nas versões em homozigose e hemizigose no estágio V4-V5, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



No estágio V7-V8, para a comparação dos híbridos quanto à zigosidade dos transgenes houve diferença significativa, sendo que apenas o híbrido H2 ( $P = 0,0136$ ) diferiu entre as versões em (ho) e (he) para a infestação de cigarrinhas. Nos híbridos H1 ( $P = 0,3221$ ) e H3 ( $P = 0,1868$ ) não houve diferenças entre as zigosidades (ho) e (he) (Figura 3). Em V11-V12, não houve diferenças dos híbridos transgênicos e suas versões para incidência de *D. maidis* ( $P = 0,0987$ ).

Figura 3 - Comparação de médias do número ( $\pm$  EP) de *D. maidis* entre os híbridos de milho nas versões em homozigose e hemizigose no estágio V7-V8, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa





## 6.2 Experimento Segunda Safra 2018/2019, Lavras-MG

### 6.2.1 Incidência de *Dalbulus maidis*

Levando-se em consideração os estádios vegetativos em que foram feitas as avaliações de *D. maidis*, na segunda safra 2018/2019 em Lavras no estádio V4-V5 ( $P = 0,1329$ ), V8-V9 ( $P = 0,9268$ ) e V11-V12 ( $P = 0,2218$ ) não houve diferenças significativas na incidência de *D. maidis* entre o híbrido convencional e os híbridos transgênicos (homozigoto e hemizigoto) (Figura 4). Comparando-se os híbridos e suas versões transgênicas, não houve diferença no número de cigarrinhas nos estádios V4-V5 ( $P = 0,4820$ ) e V8-V9 ( $P = 0,8220$ ). Porém, em V11-V12 ( $P = 0,0081$ ), houve diferença significativa entre os híbridos H1 e H3 nas versões (ho) e (he). Também houve diferença entre os híbridos nas versões transgênicas homozigotas H1 (ho) e H3 (ho) para a infestação de *D. maidis* ( $P = 0,0074$ ) (Figura 5).

Figura 4 - Número médio ( $\pm$  EP) de *D. maidis* nos estádios V4-V5 (A), V8-V9 (B) e V11-V12 (C) nos híbridos transgênicos de milho, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

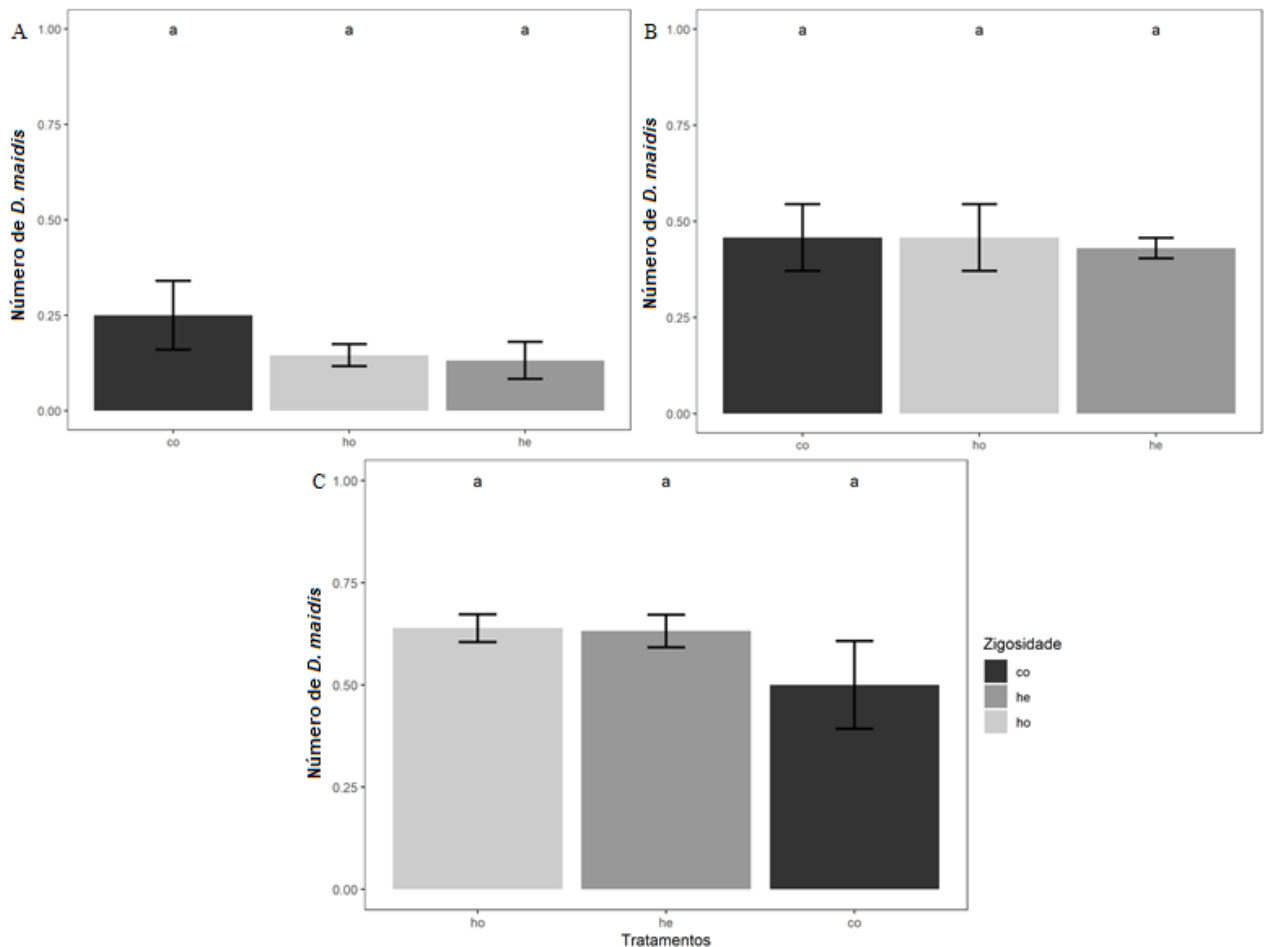
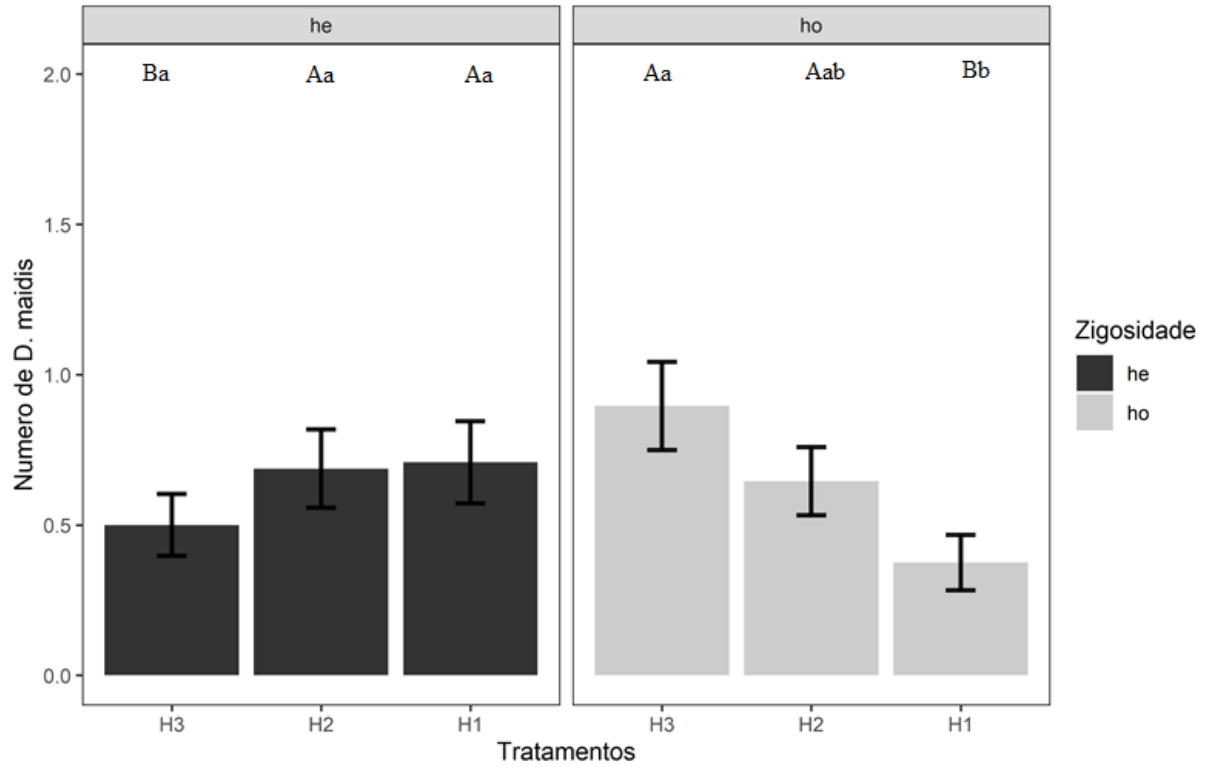


Figura 5 - Comparação de médias do número ( $\pm$  EP) de *D. maidis* entre os híbridos de milho nas versões em homozigose e hemizigose no estágio V11-V12, na segunda safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigossidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigossidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### 6.3 Ocorrência de doenças, Safra 17/18, Lavras-MG

Com relação às doenças enfezamento vermelho (MBSP), enfezamento pálido (CSS) e virose-da-risca (MRFV) na safra 2017/2018 em Lavras, pode-se observar que houve incidência das três doenças nos experimentos, sendo uma delas com maior expressão que as outras. Este fato se deve a *D. maidis* poder transmitir espiroplasma e fitoplasma para as plantas de milho isolada ou simultaneamente (OLIVEIRA et al., 2007; 2015a).

#### 6.3.1 Enfezamento vermelho - *Maize bushy stunt phytoplasma* (MBSP)

Houve significativamente menor incidência de sintomas de MBSP no híbrido convencional que nos híbridos transgênicos (ho) e (he) ( $P < 0,0001$ ) (Figura 6). Levando-se em consideração os resultados de MBSP entre os híbridos de milho, o híbrido H1 (ho) teve maior porcentagem de sintomas da doença que sua versão isogênica (he) ( $P = 0,0003$ ), enquanto para H2 ( $P = 0,2228$ ) e H3 ( $P = 0,9872$ ) para as versões (ho) e (he) não houve diferença. Em geral, comparando-se os híbridos dentro da mesma zigosidade, H1 (ho) obteve maior porcentagem de doença em relação aos híbridos H2 (ho) e H3 (ho) ( $P = 0,0001$ ), enquanto para os híbridos em hemizigose, H1 apresentou maior incidência de MBSP que H3 (he) e H2 (he) não diferiu entre ambos (Figura 7).

Figura 6 - Incidência de enfezamento vermelho (MBSP) nos híbridos de milho no estádio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

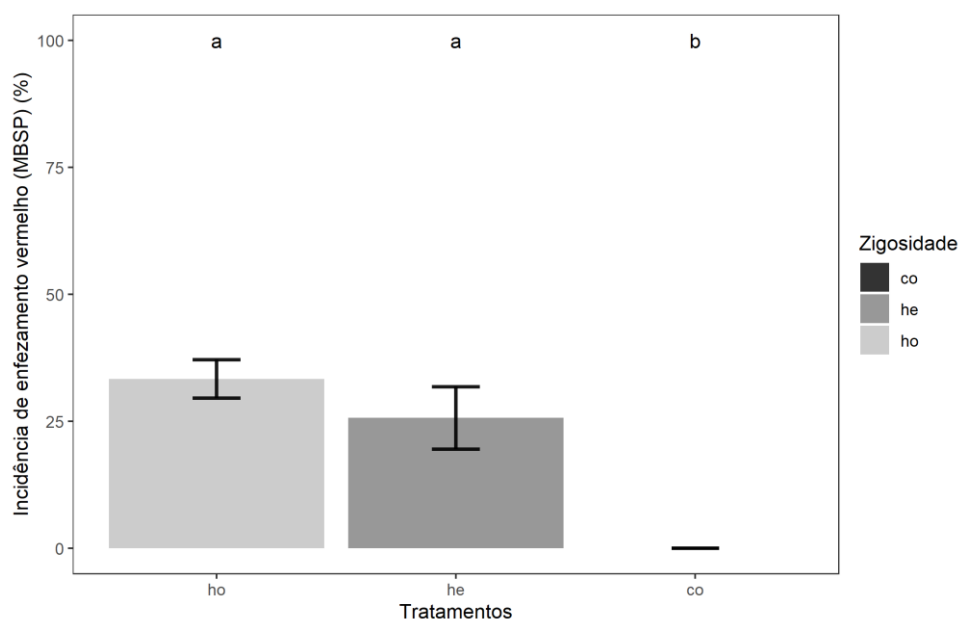
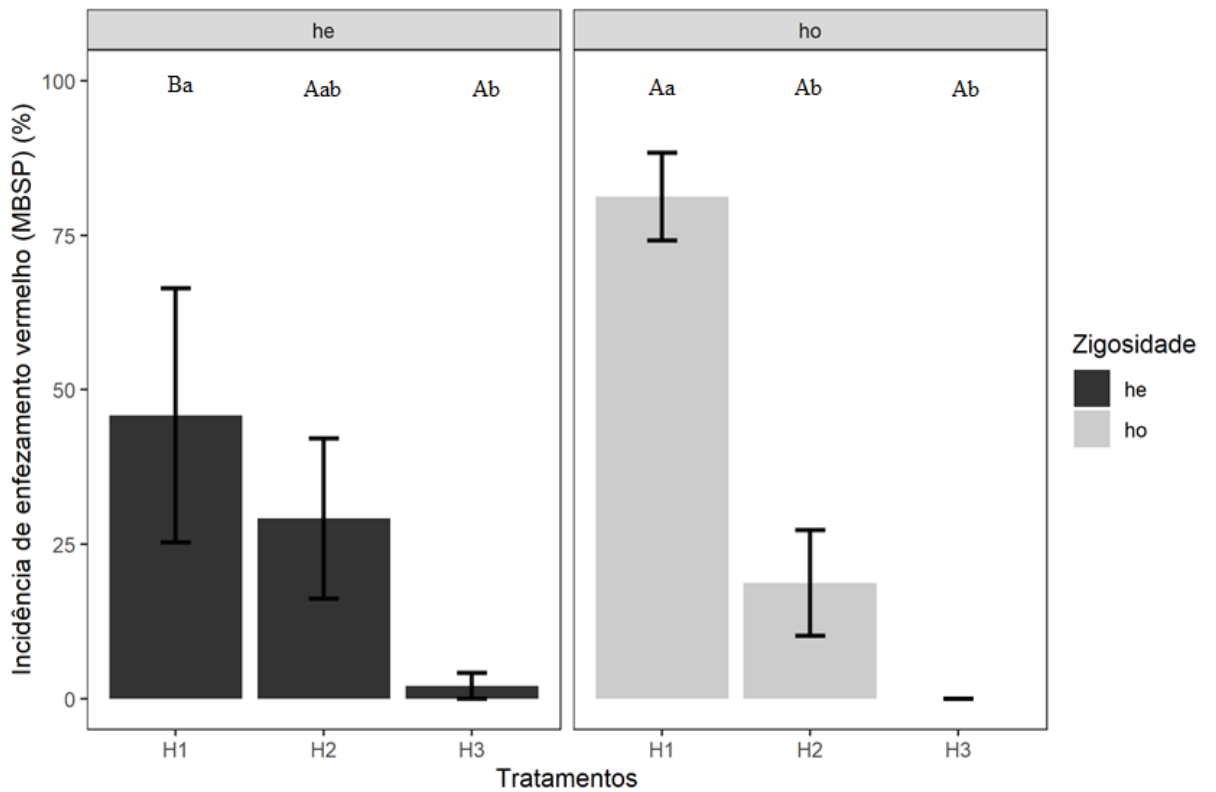


Figura 7 - Interação das médias de incidência (% ,  $\pm$  EP) de sintomas de enfezamento vermelho (MBSP) entre os híbridos de milho e suas versões em homozigose e hemizigose, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### 6.3.2 Enfezamento pálido - *Corn stunt spiroplasma* (CSS)

Para a incidência de CSS na primeira safra houve diferença significativa, sendo que os híbridos transgênicos em homozigose apresentaram maior incidência que os em hemizigose. Os híbridos convencionais não diferiram dos híbridos transgênicos em homozigose e hemizigose ( $P = 0,0204$ ) (Figura 8). Com relação aos híbridos transgênicos e suas versões, o híbrido H3 (ho) ( $P < 0,0001$ ) apresentou maior incidência de sintomas que H3 (he). Os híbridos H1 ( $P = 0,9961$ ) e H2 ( $P = 1,0000$ ) em (ho) e (he) não apresentaram diferenças entre as versões transgênicas. Os híbridos em hemizigose não se diferenciaram estatisticamente quando comparados dentro da mesma zigosidade ( $P = 1,0000$ ) e para os híbridos em homozigose, H3 demonstrou maior incidência de CSS que H1 e H2 (Figura 9).

Figura 8 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) de enfezamento pálido (CSS) nos híbridos de milho no estádio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

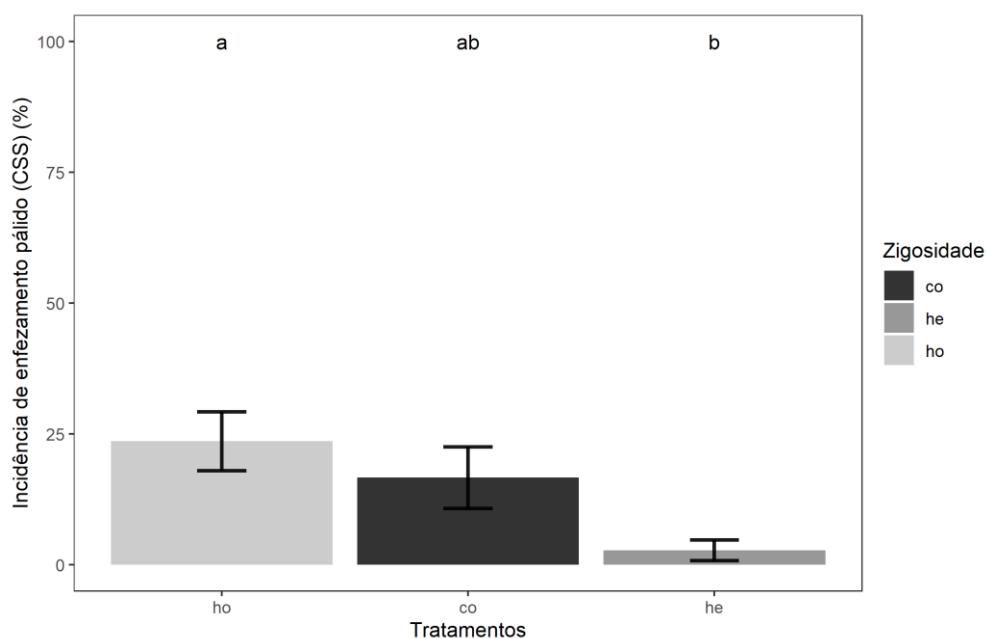
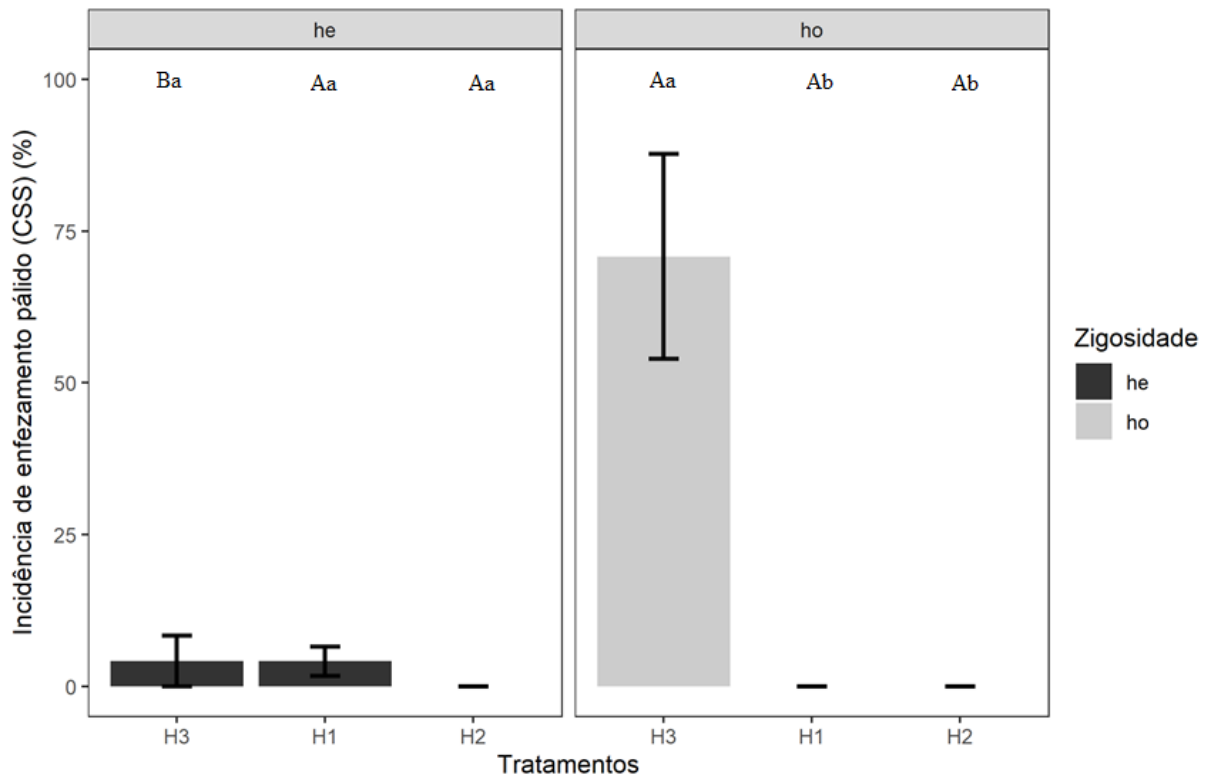


Figura 11 - Comparação de médias de incidência (% ,  $\pm$  EP) de sintomas de enfezamento pálido (CSS) entre os híbridos de milho e suas versões em homozigose e hemizigose, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### 6.3.3 Virose-da-risca - *Maize rayado fino virus* (MRFV)

Os resultados da incidência de MRFV na primeira safra indicaram predominância dessa doença em relação às demais em todos os híbridos, incluindo as versões transgênicas e o híbrido convencional. Os híbridos transgênicos hemizigotos apresentaram maior incidência de MRFV que o híbrido convencional ( $P = 0,0032$ ), e os híbridos homozigotos não demonstrou diferença entre os híbridos hemizigotos e convencionais sendo igual a ambos (Figura 10). Comparando-se os híbridos transgênicos e suas versões, não houve diferença significativa para a incidência de MRFV ( $P = 0,3359$ ). Em relação aos híbridos dentro de uma mesma zigosidade, os híbridos em hemizigose H1 e H2 apresentaram maior incidência de MRFV que H3 (he). Para os híbridos em homozigose, H1 demonstrou maior incidência que H3(ho), e H2 (ho) não diferiu entre ambos (Figura 11).

Figura 14 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) de virose-da-risca (MRFV) nos híbridos de milho no estágio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

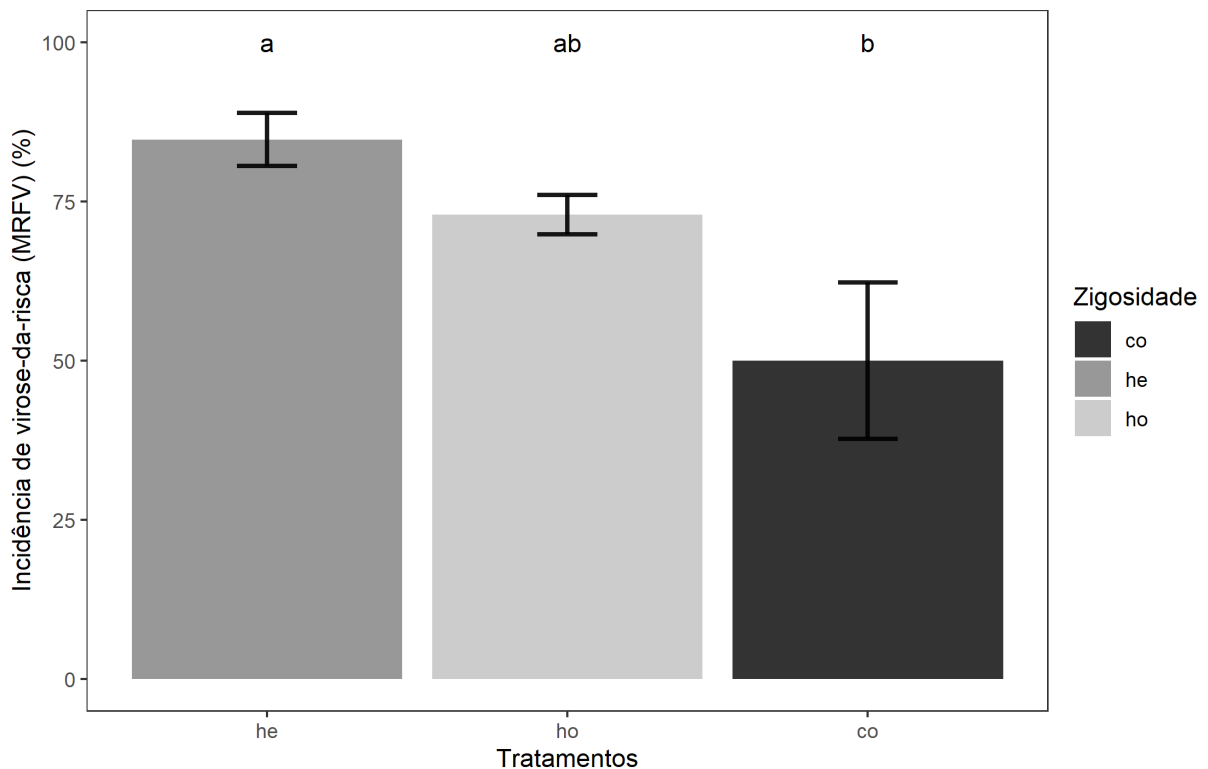
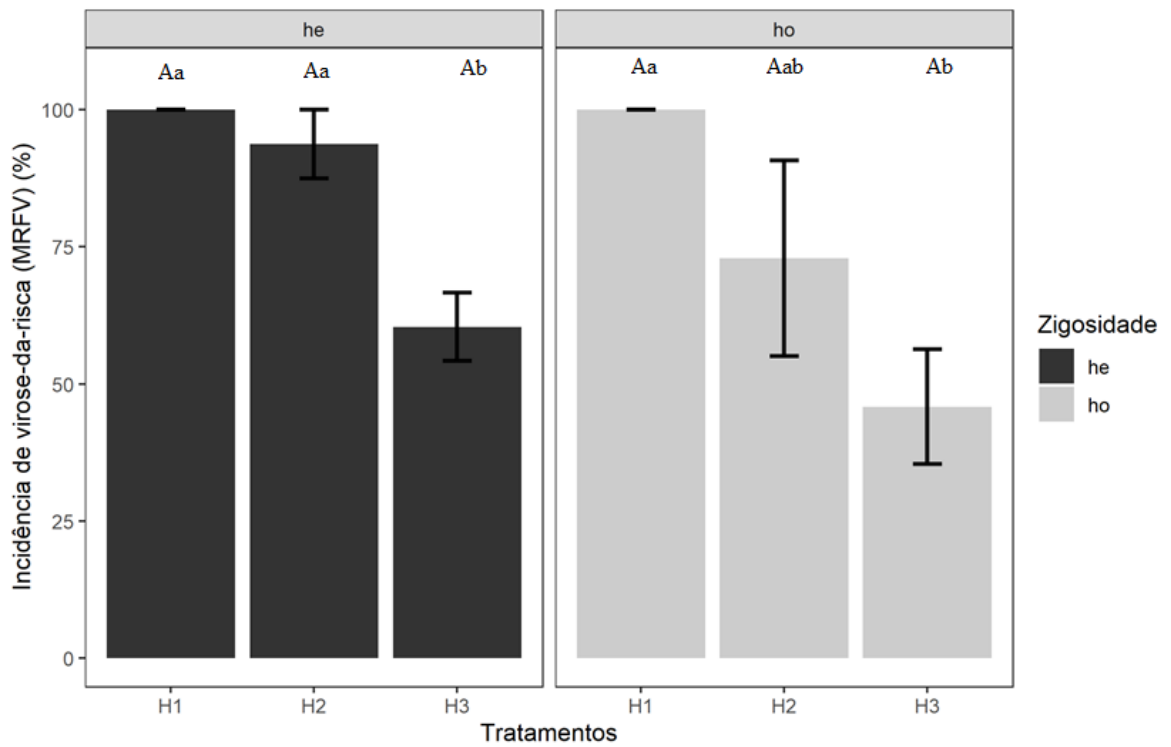


Figura 17 - Comparação de médias de incidência (% ,  $\pm$  EP) de sintomas de virose-da-risca (MRFV) entre os híbridos de milho e suas versões em homozigose e hemizigose, na primeira safra em Lavras-MG. Híbrido 1 (H1), híbrido 2 (H2) e híbrido 3 (H3). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

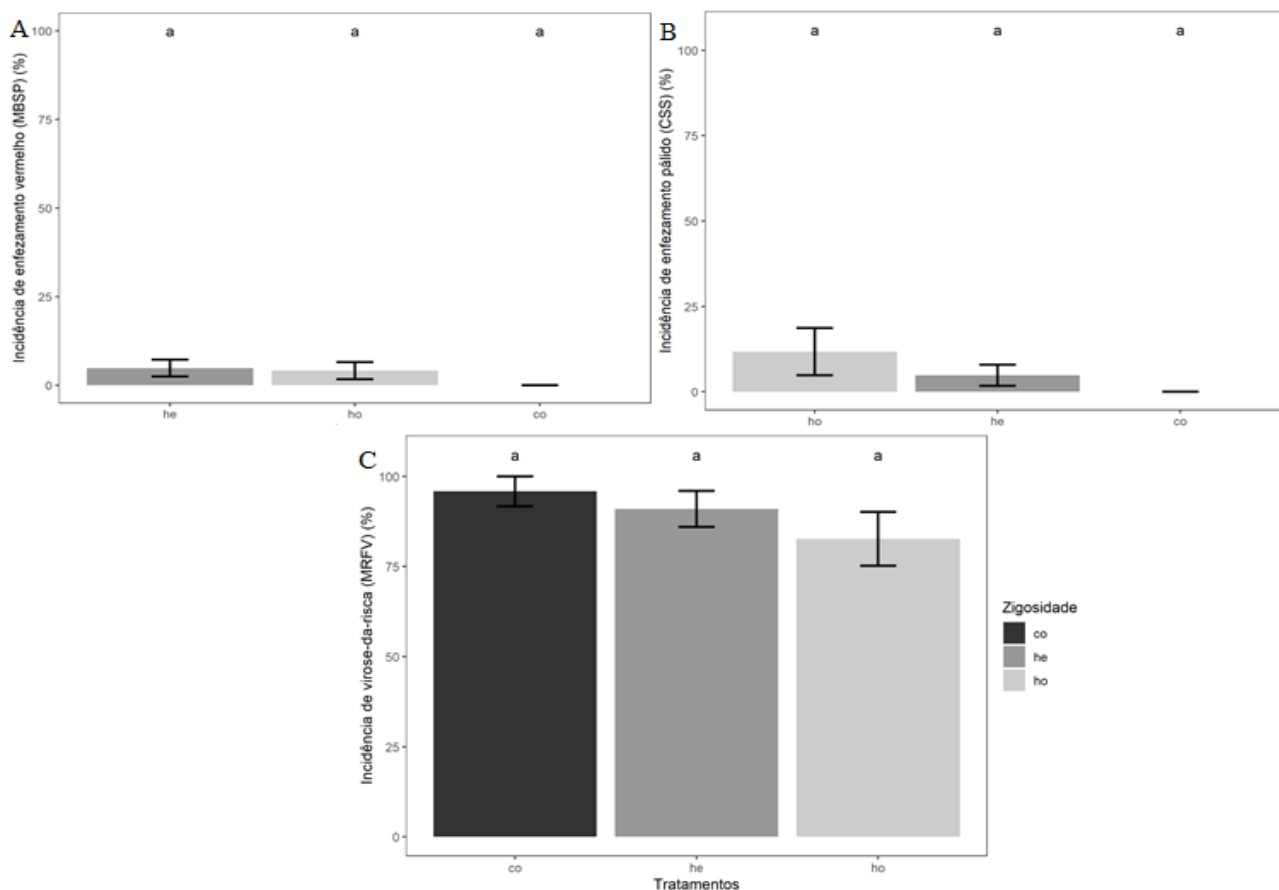




#### 6.4 Ocorrência de doenças, Safra 2018/2019, Lavras-MG

Na segunda safra 2018/2019 em Lavras, as ocorrências de doenças MBSP ( $P = 0,0876$ ), CSS ( $P = 0,1879$ ) e MRFV ( $P = 0,2066$ ) nas plantas dos híbridos transgênicos homocigotos e hemizigotos não diferiram em comparação com o híbrido convencional (Figura 14). Comparando-se os híbridos transgênicos entre as versões em hemizigose e homocigose, não houve diferenças para MBSP ( $P = 0,3601$ ), CSS ( $P = 0,3317$ ) e MRFV ( $P = 0,4148$ ). Observa-se que houve predominância na incidência da doença virose-da-risca-fina em relação às demais doenças.

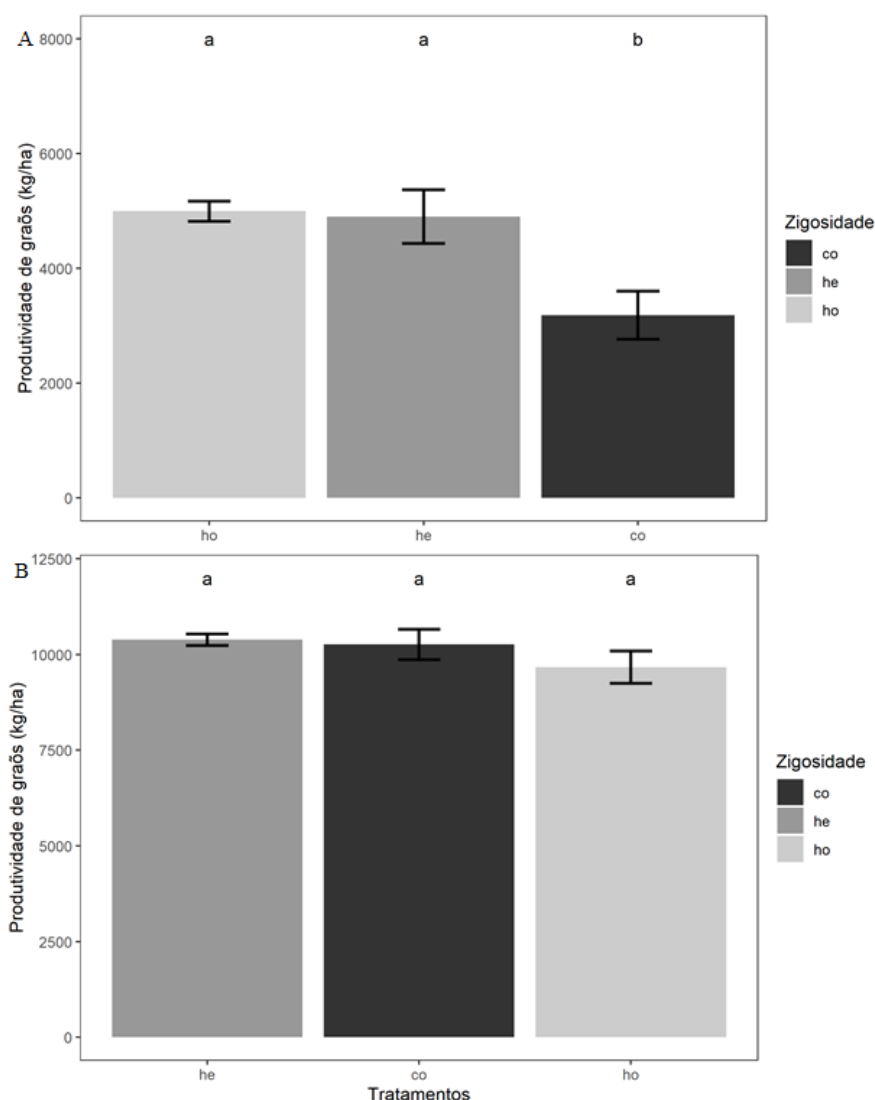
Figura 20 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) das doenças MBSP (A), CSS (B) e MRFV (C) nos híbridos de milho no estágio R3-R4, na primeira safra em Lavras-MG. (ho) híbrido homocigoto, (he) híbrido hemizigoto e (co) híbrido convencional. Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### 6.5 Produtividade de grãos, Lavras-MG

Na primeira safra 2017/2018 em Lavras, as médias de produtividade de grãos não diferiram entre os híbridos nas versões em homozigose e hemizigose ( $P = 0,6076$ ), e houve diferença apenas entre os transgênicos e o híbrido convencional ( $P = 0,0001$ ). Para a produtividade na segunda safra 2018/2019 de Lavras, os híbridos também não expressaram diferenças entre as versões homozigota e hemizigota ( $P = 0,6076$ ), bem como entre os transgênicos e o híbrido convencional ( $P = 0,1711$ ) (Figura 13).

Figura 23 - Produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) de grãos dos híbridos de milho em Lavras-MG. Produtividade de grãos na safra 2017/2018 (A); Produtividade de grãos na safra 2018/2019 (B). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



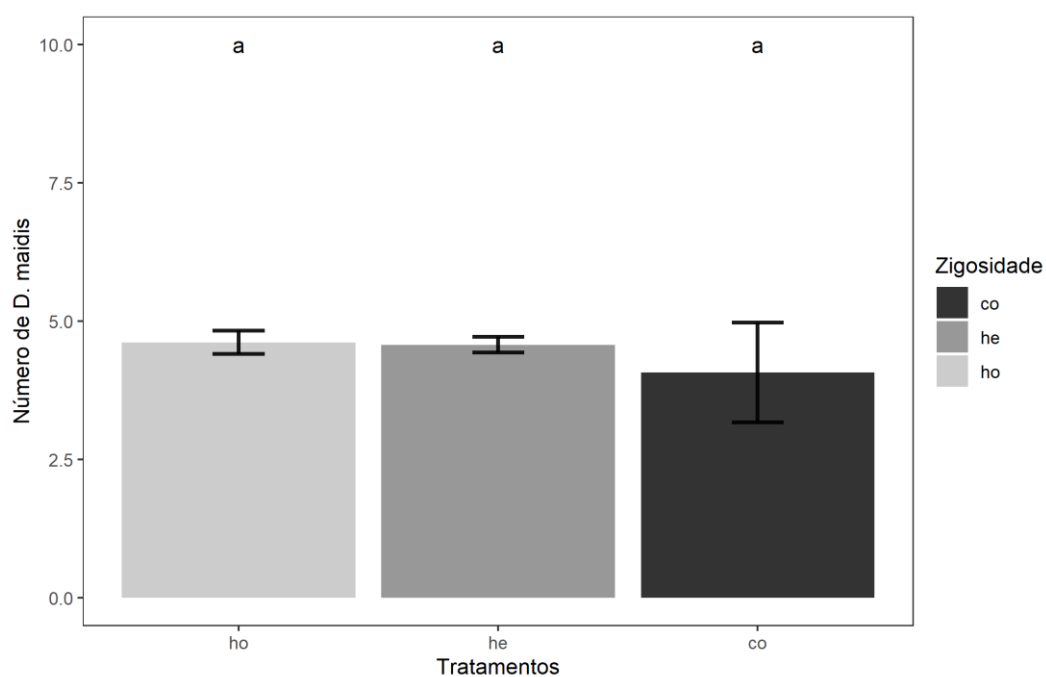
Embora as safras tenham sido tratadas independentemente, verifica-se diferença numérica na produtividade de grãos entre a primeira e segunda safra em Lavras. A maior média de produtividade de grãos ocorreu na segunda safra, com 10061,48 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto na primeira safra a média de produtividade foi de 4695,10 kg ha<sup>-1</sup>.

## 6.6 Experimento Primeira Safra 2017/2018, Jaboticabal-SP

### 6.6.1 Incidência de *Dalbulus maidis*

Nos experimentos de Jaboticabal, a incidência de cigarrinhas foi avaliada apenas no estágio vegetativo V8. Na primeira safra, o híbrido convencional não diferiu para a incidência de *D. maidis* em relação aos híbridos transgênicos (ho) e (he) ( $P = 0,7446$ ) (Figura 14). Não houve diferença entre os três híbridos nas versões em homozigose e hemizigose ( $P = 0,6156$ ).

Figura 26 - Número médio ( $\pm$  EP) de *D. maidis* no estágio V8 nos híbridos de milho transgênicos em homozigose e hemizigose e híbrido convencional, na primeira safra em Jaboticabal-SP. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

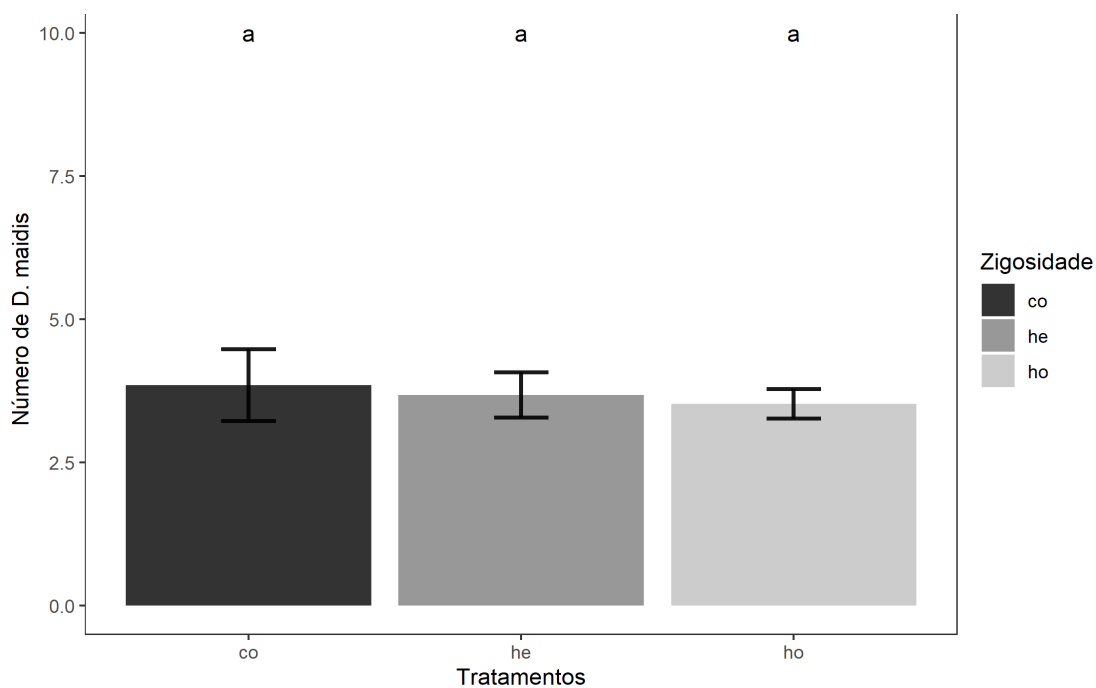


## 6.7 Experimento Segunda Safra 2018, Jaboticabal-SP

### 6.7.1 Incidência de *Dalbulus maidis*

Assim como na primeira safra, o híbrido convencional não apresentou diferença na incidência de *D. maidis* em relação aos transgênicos homozigotos e hemizigotos ( $P = 0,8970$ ) (Figura 15). Os híbridos transgênicos não foram diferentes quanto às versões em homozigose e hemizigose para a incidência de cigarrinhas ( $P = 0,3425$ ).

Figura 29 - Número médio ( $\pm$  EP) de *D. maidis* no estágio V8 nos híbridos de milho transgênicos em homozigose e hemizigose e híbrido convencional, na segunda safra em Jaboticabal-SP. Híbrido homozigoto (ho), híbrido hemizigoto (he) e híbrido convencional (co). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



## 6.8 Ocorrência de doenças, primeira safra 2017/2018, Jaboticabal-SP

As doenças avaliadas no estágio reprodutivo R2-R3 na primeira safra em Jaboticabal demonstraram diferenças significativas para a incidência das doenças MBSP ( $P < 0,0001$ ) e CSS ( $P = 0,0009$ ) entre os híbridos transgênicos (homozigoto e hemizigoto) e o híbrido convencional. Quanto à incidência da virose-da-risca (MRFV), não houve diferença dos híbridos transgênicos em comparação ao convencional ( $P = 0,2436$ ) (Figura 16). As doenças CSS ( $P = 0,8522$ ) e MRFV ( $P = 0,3546$ ) não apresentaram diferenças significativas para as versões transgênicas em homozigose e hemizigose. Com relação à incidência de MBSP, houve diferenças entre as versões em hemizigose e homozigose. Os híbridos H2 e H3 em homozigose tiveram maior incidência da doença que suas versões em hemizigose ( $P < 0,0001$ ). Entre os híbridos dentro de suas mesmas versões transgênicas, o híbrido H1 em hemizigose apresentou maior incidência que os híbridos H2 (he) e H3 (he) (Figura 17).

Figura 32 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) de doenças nos híbridos de milho transgênicos em homozigose, hemizigose e convencional no estágio R2-R3, na primeira safra em Jaboticabal-SP. (A) enfezamento vermelho (MBSP), (B) enfezamento pálido (CSS) e (C) virose-da-risca (MRFV). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

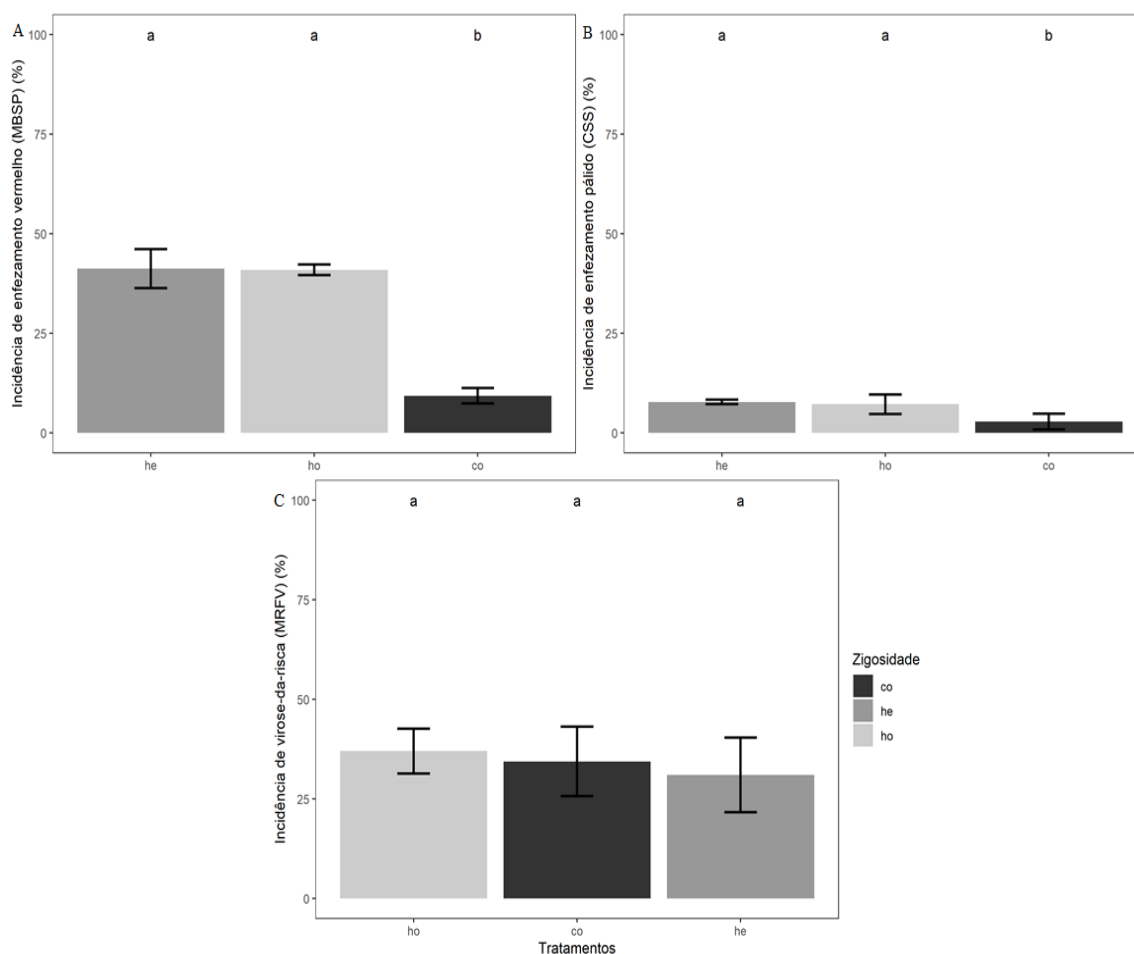
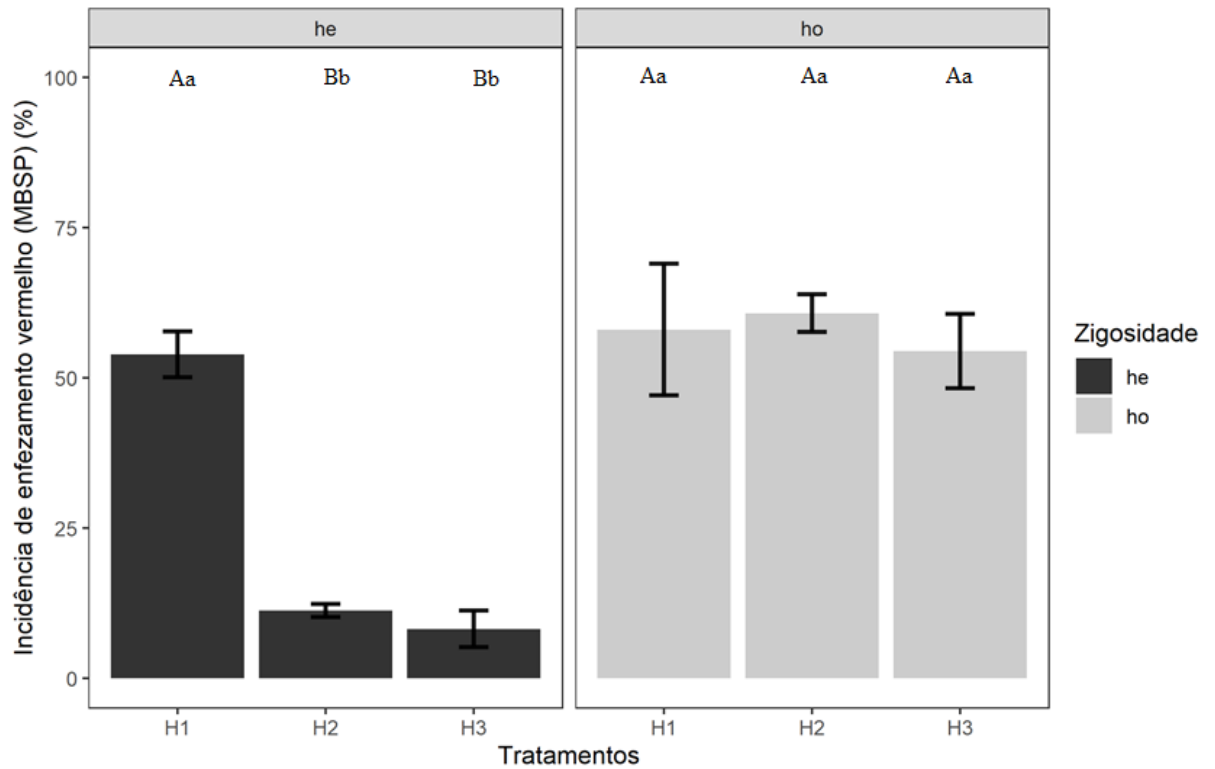


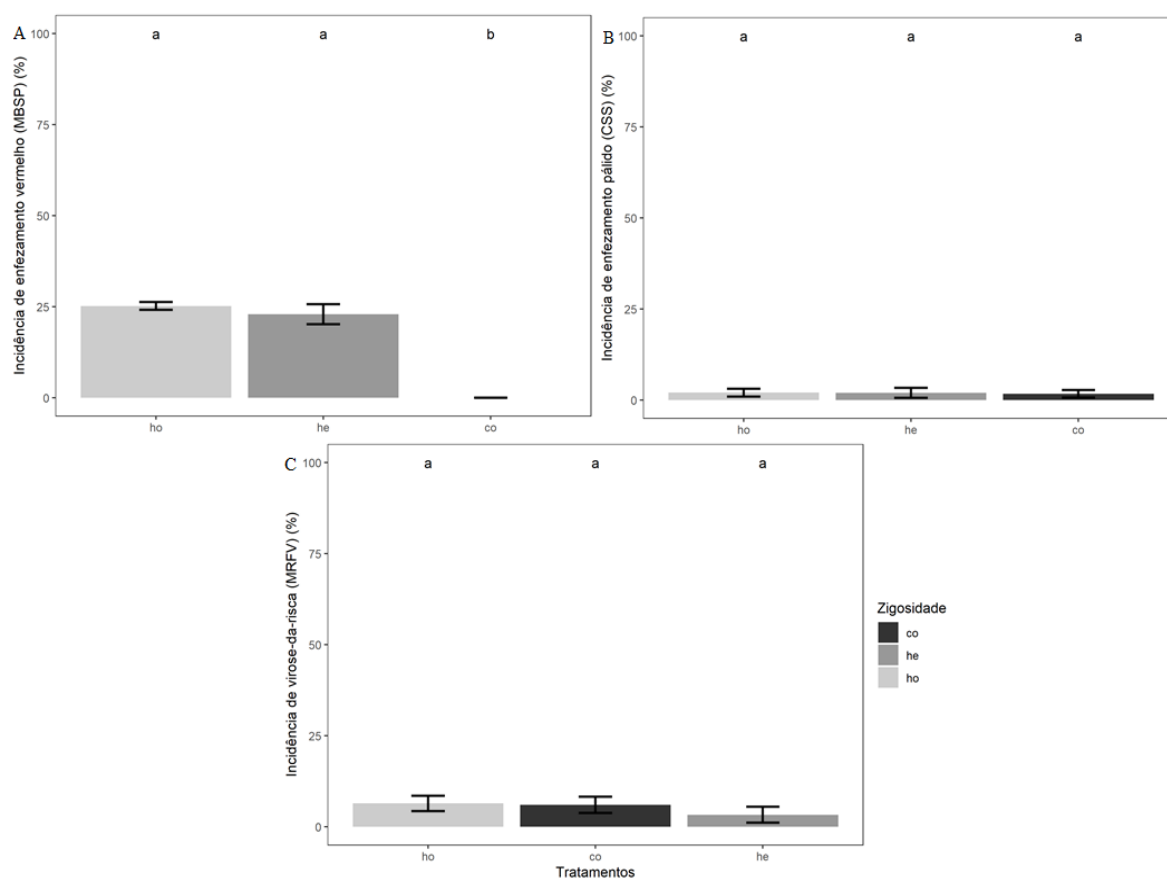
Figura 35 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) de doenças nos híbridos transgênicos em homozigose e hemizigose no estágio R2-R3, na primeira safra em Jaboticabal-SP. (A) enfezamento vermelho (MBSP), (B) enfezamento pálido (CSS) e (C) virose-da-risca (MRFV). Letras maiúsculas indicam o desdobramento dos híbridos em função das zigosidades e as minúsculas comparam os híbridos em função de uma mesma zigosidade. Letras maiúsculas e minúsculas sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### 6.9 Ocorrência de doenças, segunda safra 2018, Jaboticabal-SP

Na segunda safra em Jaboticabal ocorreram resultados similares aos da primeira safra. O híbrido convencional obteve menor incidência de MBSP que os híbridos transgênicos (homozigoto e hemizigoto) ( $P < 0,0001$ ). As doenças CSS ( $P = 0,9829$ ) e MRFV ( $P = 0,4912$ ) não apresentaram diferença entre os híbridos transgênicos e convencional (Figura 18). Comparando-se os híbridos e as versões transgênicas, não houve diferença significativa para a ocorrência das doenças MBSP ( $P = 0,5102$ ), CSS ( $P = 0,8220$ ) e MRFV ( $P = 0,3796$ ).

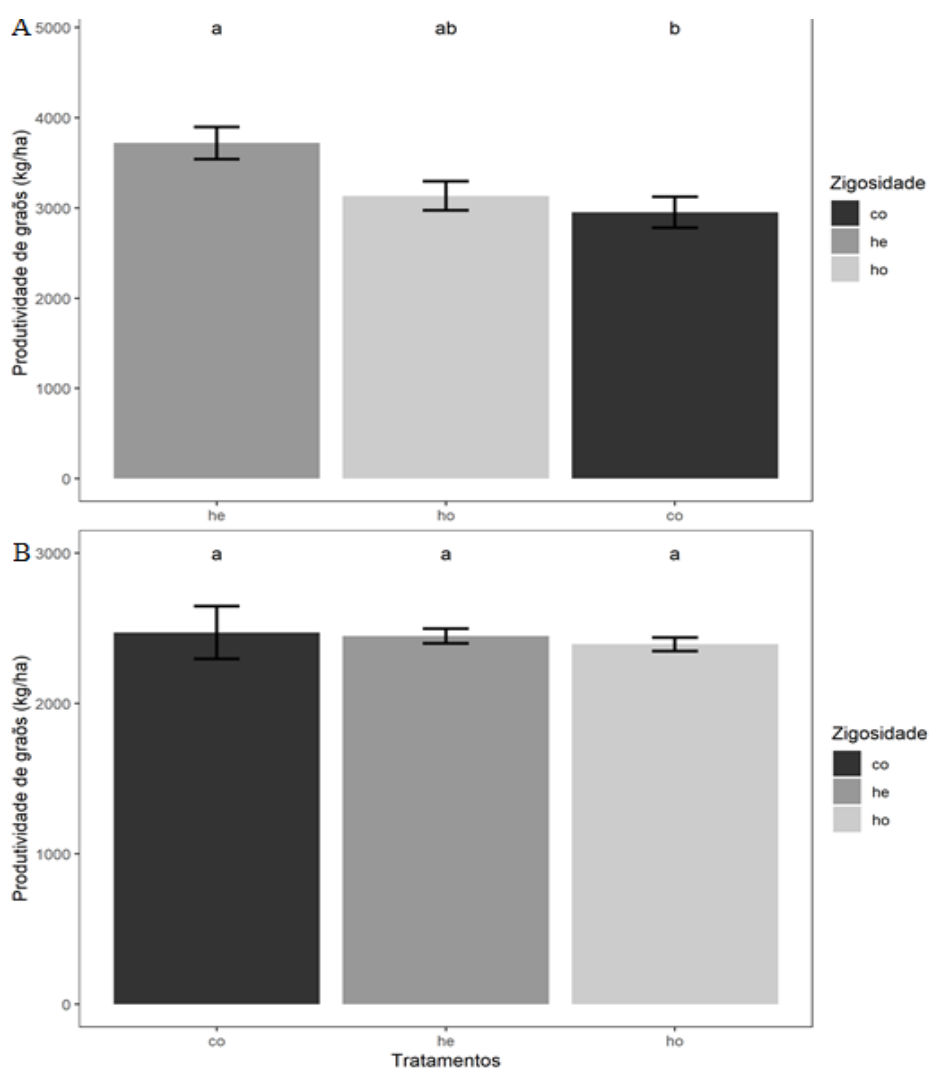
Figura 37 - Incidência (% ,  $\pm$  EP) de doenças nos híbridos de milho transgênicos em homozigose, hemizigose e convancional no estágio R2-R3, na segunda safra em Jaboticabal-SP. Enfezamento vermelho (A), enfezamento pálido (B) e virose-da-risca (C). Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### 6.10 Produtividade de grãos nas safras 2017/2018 e 2018/2019, Jaboticabal-SP

A produtividade da primeira safra foi diferente entre os híbridos transgênicos e o híbrido convencional, sendo a maior produtividade observada em híbridos em homozigose em relação ao híbrido convencional ( $P = 0,0259$ ). Os híbridos em hemizigose não diferiram para a produtividade em relação aos transgênicos em homozigose e híbrido convencional. Na segunda safra, a produtividade não apresentou diferença entre as versões transgênicas e o híbrido convencional ( $P = 0,8502$ ) (Figura 19).

Figura 40 - Produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) nos híbridos de milho transgênicos em homozigose, hemizigose e convencional nas safras de Jaboticabal-SP. (A) Produtividade de grãos em 2017/2018, (B) Produtividade de grãos em 2018/2019. Letras diferentes sobre as barras denotam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



Comparando-se a produtividade da primeira com a da segunda safra em Jaboticabal, a média da primeira safra foi maior que a da segunda safra. A produtividade média na primeira safra foi de  $3357,68 \text{ kg ha}^{-1}$ , enquanto na segunda safra foi de  $2427,41 \text{ kg ha}^{-1}$ .



## 7 DISCUSSÃO

O desempenho dos híbridos de milho quanto à incidência de *D. maidis* em Lavras na primeira e segunda safras em geral não apresentaram diferenças entre as versões transgênicas. Esta tendência se manteve em praticamente todas as avaliações ao longo do desenvolvimento fenológico da cultura; apenas nas avaliações nos estádios V4-V5 e V7-V8 da primeira safra o híbrido H3 (ho) apresentou maior número de *D. maidis* em relação à versão (he). Além disso, o híbrido convencional demonstrou incidência similar de cigarrinhas comparativamente aos híbridos transgênicos.

Correlacionando-se a incidência de *D. maidis* com a porcentagem de sintomas das doenças na primeira safra em Lavras, houve diferença entre os híbridos em homozigose e hemizigose. A porcentagem de sintomas de enfezamento pálido foi maior no híbrido H3 (ho) que na sua versão (he), assim como verificado para a incidência de cigarrinhas na primeira data de avaliação em V4-V5. Com relação ao enfezamento vermelho, no híbrido H1 (ho) verificou-se maior porcentagem de sintomas da doença que H1 (he), embora em geral não tenham havido diferenças na incidência de *D. maidis* entre os híbridos. Na segunda safra de Lavras, os híbridos e suas versões transgênicas em homozigose e hemizigose não apresentaram diferenças na ocorrência de sintomas de enfezamento vermelho, enfezamento pálido e virose-da-risca, com prevalência da última doença.

Em Jaboticabal, os híbridos e suas versões transgênicas em ambas as safras não expressaram diferenças para a incidência de *D. maidis* nem na porcentagem de plantas com sintomas de doenças, seja por enfezamento vermelho ou enfezamento pálido. Apenas na segunda safra houve maior incidência de plantas com sintomas de virose-da-risca no híbrido H2. Pode-se observar que nas duas safras houve predominância de ocorrência de sintomas de enfezamento vermelho em relação às outras doenças. O híbrido H3 provavelmente possui genes de resistência ao enfezamento vermelho, uma vez que não apresentou sintomas ou obteve baixa porcentagem da doença nas primeiras safras em ambas localidades e na segunda safra em Jaboticabal.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, levando-se em consideração as safras e localidades avaliadas, pode-se inferir que os híbridos de milho em homozigose com a adição dos alelos dos transgenes *Bt*, (*cry1F*, *cry1A.105* + *cry2Ab2*) não diferem dos híbridos em hemizigose para a infestação de *D. maidis*. Quanto à incidência das doenças transmitidas pelo inseto vetor, aparentemente ocorreram algumas interações dependentes do genótipo das plantas, uma vez que os híbridos H1 e H3 na versão homozigota apresentaram maiores porcentagens de sintomas de enfezamento vermelho e enfezamento pálido em relação às suas

versões hemizigotas na primeira safra em Lavras; porém, essas interações não prevaleceram nos demais experimentos, o que deve ter sido também por conta de influência da pressão do inóculo e condições específicas desse ambiente. Outra hipótese para as maiores porcentagens de doenças nos híbridos H1 e H3 em homozigose em relação às versões hemizigotas pode ser devido à maior mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* pelos transgênicos homozigotos, que devido à ausência de competição proporcionou maior quantidade de tecido foliar na região do cartucho das plantas para a colonização das cigarrinhas, e assim, maiores chances de inoculação dos patógenos.

As infestações de cigarrinhas foram maiores na área experimental de Jaboticabal-SP do que em Lavras-MG possivelmente devido a fatores climáticos e geográficos das regiões serem completamente diferentes, bem como do histórico de plantios e pressão populacional de *D. maidis*. A área experimental de Jaboticabal é destinada ao plantio intensivo de milho para melhoramento genético de linhagens, cuja prática é realizada há vários anos, o que pode ter sido um fator influente nas maiores infestações de *D. maidis* nessa área. Estudos feitos no município de Sete Lagoas-MG demonstraram que em cultivos de milho realizados a partir de fevereiro e abril (“milho safrinha”) é observado maior número de cigarrinhas do que em cultivos com semeadura em outubro e novembro (“safra de verão”) (OLIVEIRA et al., 2015). No estado de São Paulo, em área de cultivo contínuo de milho, embora as maiores populações de *D. maidis* tenham sido registradas nos meses de novembro e dezembro, outro pico populacional ocorreu entre fevereiro e maio (OLIVEIRA et al., 2013).

Os híbridos homozigotos mesmo na influência de pressão de outras pragas e doenças no campo em geral não apresentaram efeitos negativos quanto à adição dos alelos *Bt*, comportando-se como os hemizigotos quanto à suscetibilidade às doenças. Esses resultados podem ser considerados positivos, pois a incidência de doenças é fundamental na redução da produtividade de grãos da cultura do milho, e não seria desejável para a implementação dessa estratégia de manejo de lagartas de *S. frugiperda* resistentes se a adição dos alelos transgênicos causassem maior suscetibilidade às doenças ou reduções em produtividade por conta de maior custo metabólico e energético às plantas para a produção das proteínas transgênicas. Um exemplo recente de caso de insucesso para o melhoramento genético de uma planta para resistência de uma doença que levou à maior suscetibilidade à outra doença ocorreu com o evento Embrapa 5.1, primeiro feijão geneticamente modificado resistente ao vírus-do-mosaico-dourado. Esse evento transgênico obteve resultados indesejados em campo, tornando-se suscetível ao *Cowpea mild mottle virus*, que também é transmitido pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B (ARAGÃO; FARIA, 2009; BROD et al., 2013a;

EMBRAPA, 2014; SANTANA, 2015).

Por se tratar de uma abordagem recente para o manejo de insetos resistentes na cultura do milho, em especial para a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*, há uma escassez de exemplos na literatura sobre o tema. Alguns estudos mostraram que a homozigose do transgene pode ser benéfica em alguns casos, proporcionando aumento na concentração da proteína codificada na planta; efeito neutro em outros casos, resultando no mesmo desempenho dos hemizigotos. No entanto, há casos com efeitos negativos, levando ao silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional, e até ser letal para as plantas (HOOD et al., 2012; JAMES et al., 2002; LAW et al., 2006). Nos estudos de Siebert et al. (2012) e Eghrari et al. (2019), os autores compararam híbridos de milho convencionais e transgênicos com as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry1Ab2 piramidadas e singulares, e confirmaram a eficiência das plantas transgênicas no controle de lagartas de *S. frugiperda* sob infestação natural, o que demonstra não ter havido efeitos negativos na adição dos alelos, e em alguns híbridos houve aumento significativo da expressão das proteínas nas versões homozigotas em relação às hemizigotas.

A produtividade de grãos nas duas safras de Lavras não apresentaram diferenças nos híbridos entre as versões em homozigose e hemizigose; entre os transgênicos e o convencional houve diferenças, sendo os transgênicos mais produtivos que o convencional na primeira safra independentemente da sua zigosidade. Este parâmetro não foi afetado pela incidência de *D. maidis*, que na primeira safra apresentou alguma diferença entre os híbridos, nem pelas ocorrências de doenças. Em Jaboticabal, as produtividades de grãos na primeira e segunda safras não diferiram entre os híbridos; não houve diferença de produtividade entre os híbridos em homozigose e hemizigose; e na comparação entre os transgênicos e convencional, verificou-se média de produtividade pouco menor no convencional em relação aos transgênicos na primeira safra. As diferenças de produtividade entre os híbridos transgênicos e convencionais nas primeiras safras em ambas localidades provavelmente devem ter sido por conta do controle de lagartas de *S. frugiperda* nos transgênicos, reduzindo a desfolha nas plantas, o que resultou em maiores produtividades.

O rendimento de grãos na primeira safra em Lavras foi menor que na segunda safra. Os fatores que podem ter contribuído para a maior produtividade na safra 2018/2019 seria a época de plantio que foi realizada mais cedo que na safra anterior, o que pode ter favorecido o escape da infestação de lagartas. Outro possível fator seria a incidência de maior regime de chuvas no início da cultura, desfavorecendo a infestação e estabelecimento de lagartas e cigarrinhas. García-Roa et al. (2002) observaram grande número de lagartas de *S. frugiperda* mortas devido ao afogamento dentro do cartucho das plantas de milho após ocorrência de

chuva. Varella et al. (2015) demonstraram que mais de 95% das lagartas de *S. frugiperda* morreram principalmente por desalojamento por chuva, afogamento, predação e possivelmente movimento de lagartas neonatas. Em Jaboticabal, as menores produtividades na segunda safra em relação à primeira possivelmente ocorreu pelo fato de a segunda safra ter sido conduzida na “safrinha”, época com menor fotoperíodo e regime de chuvas.

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se inferir que a zigosidade nos híbridos transgênicos *Bt* não prejudicou nem causou aumento de produtividade de grãos de milho comparando-se os híbridos e suas versões, concluindo-se que o efeito foi neutro. No entanto, verificou-se que o rendimento de grãos foi maior nos híbridos transgênicos em relação ao convencional nas primeiras safras em ambas localidades devido provavelmente ao maior controle de lagartas de *S. frugiperda*. No estudo realizado por Eghrari et al. (2019) que avaliaram lesões foliares causadas por *S. frugiperda* em híbridos homozigotos e hemizigotos de milho, o rendimento de grãos dos híbridos homozigotos foi maior que o do híbrido convencional e semelhante aos híbridos hemizigotos, revelando que os alelos adicionais *Bt* foram benéficos para o rendimento de grãos de milho devido à maior proteção às injúrias causadas pelas lagartas.

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, o que foi visto no presente trabalho com a praga não alvo da tecnologia, *D. maidis*. Este é provavelmente o primeiro trabalho que avaliou a influência da zigosidade transgênica, isto é, a adição de alelos transgênicos, contra insetos sugadores pragas não alvo da tecnologia transgênica *Bt*. Além deste trabalho, foi feita a avaliação dos efeitos desses híbridos a campo sobre um inimigo natural, a tesourinha *Doru luteipes* (Dermaptera: Forficullidae). No estágio de florescimento foi quantificada a presença de ninfas e adultos do inimigo natural nas plantas desses mesmos híbridos em homozigose e hemizigose e híbrido convencional, e não foram observados efeitos significativos da zigosidade transgênica ou efeitos dos transgênicos sobre *D. luteipes* (FREITAS et al., 2019).

De acordo com os resultados aqui obtidos, a adição de alelos transgênicos em híbridos de milho não afetou a infestação de *D. maidis* e doenças transmitidas, nem reduziu a produtividade de grãos em função da energia necessária para a produção de maiores concentrações das proteínas transgênicas *Bt* nas plantas. As exceções dos resultados distintos na ocorrência de enfezamento vermelho e pálido ocorreram para os híbridos H1 e H3 na primeira safra em Lavras que foram maiores nas versões homozigotas. Esses resultados podem ter ocorrido devido a efeitos pleiotrópicos específicos da interação dos transgenes *Bt*

com os genótipos de milho, ou por conta de maior sucesso na inoculação dos patógenos pelas cigarrinhas nas plantas homozigotas que apresentaram maior controle de lagartas de *S. frugiperda* (EGHRARI et al., 2019) e assim maior área de tecido sadio no cartucho das plantas.

Recomenda-se a condução de futuros trabalhos que avaliem o comportamento da infestação de *D. maidis* em híbridos que contêm novos eventos com proteínas de outros modos de ação e que têm sido mais eficientes para o controle de *S. frugiperda*, como as proteínas Vip, e eventos piramidados contendo estas e proteínas Cry. Além disso, o conhecimento do comportamento de *D. maidis* e *S. frugiperda* quanto à colonização e competição nas mesmas plantas fornecerão respostas mais conclusivas sobre a contribuição dos danos de cada inseto nos efeitos de redução na produtividade dos híbridos em homozigose e hemizigose, e podem auxiliar na elaboração de planos de amostragem mais acurados que considerem a presença individual ou conjunta dos insetos nas plantas.

Assim, juntamente com os resultados encontradas em outro estudo focado no manejo de *S. frugiperda* (Eghrari et al., manuscrito em preparação), há a expectativa de que o uso dos híbridos transgênicos de milho em homozigose seja uma estratégia positiva no manejo integrado de pragas e para o manejo de lagartas resistentes a eventos transgênicos que não mais possuem eficiência de controle. Em campos de produção de sementes, principalmente, a adoção de híbridos homozigotos poderia levar à redução de aplicações frequentes de inseticidas para controle das lagartas, reduzindo os custos de produção e resíduos no ambiente.

## 8. CONCLUSÕES

- Os híbridos transgênicos que expressam as proteínas Cry1F, Cry1A.105 + Cry2Ab2 em homozigose não afetaram a infestação de *D. maidis* e ocorrência de sintomas causado pela transmissão dos fitopatógenos em relação às respectivas versões em hemizigose;
- O fator zigosidade não reduziu a produtividade de grãos de milho.

## REFERÊNCIAS

- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- ANDOW, D. A. The Risk of Resistance Evolution in Insects to Transgenic Insecticidal Crops. **Collection of Biosafety Reviews**. v. 4, p. 142-199, 2008.
- ANDRE, R. G. B.; ANUNCIACÃO, Y. M. T. A precipitação pluvial provável em Jaboticabal, São Paulo. **Agrometeoros**, v. 25, n. 2, 2018.
- ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. First transgenic geminivirus resistant plant in the field. **Nature: Biotechnology**, New York, v. 27, p. 1086-1088, 2009.
- ÁVILA, C. J.; ARCE, C. C. M. Flutuação populacional da cigarrinha-do-milho em duas localidades do Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1129–1132, ago. 2008. Disponível em < <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000400035>>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- BASCOPE-QUINTANILLA, J. B. Agente causal de la llamada “raza mesa central” del achaparramiento del maíz. 1977. 55f. Dissertação (Mestrado) - Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de Postgraduados, Chapingo (México).
- BIALOZOR, A. Controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) em milho Bt com inseticidas aplicados após a irrigação. 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal) da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/11789/Bialozor,%20Adriano.pdf?sequence=1>>. Acesso 02 fev. 2018.
- BROD, F. C. A. et al. Quantification of genetically modified common bean Embrapa 5.1. **Journal of agriculture food chemistry**, Washington, v. 61, p. 4921–4926, 2013.
- CALDARELLI, C. E.; BACCHI, M. R. P. Fatores de influência no preço do milho no Brasil. **Nova Economia**, v. 22, n. 1, p. 141–164, abr. 2012. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-63512012000100005>.
- CALIGARI, P. D. S. et al. Field performance of derived generations of transgenic tobacco. **Theoretical Applied Genetics**, v. 86, p. 875-879, 1993.
- CARRIÈRE Y. et al. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1519–1523 (2003).
- CATTANEO M.G. et al. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7571–7576 (2006).
- CÉLERES. 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/17. Informativo Biotecnologia. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-deadocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/#>>.
- COELHO, A. P. et al. Estimativa da produtividade de grãos da aveia-branca cultivada sob níveis de irrigação utilizando clorofilômetro portátil. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 9, n. 2, p. 662-667, 2018.
- Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12818>>. Acesso em 12 mar. 2018.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2018/2019. Disponível em: <

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_01\\_15\\_11\\_30\\_50\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2019.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_15_11_30_50_boletim_graos_janeiro_2019.pdf)>.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2019/2020. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/19\\_02\\_14\\_11\\_30\\_39\\_boletim\\_graos\\_outubro\\_2019.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/19_02_14_11_30_39_boletim_graos_outubro_2019.pdf)>.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39-41, 1971.

DE LEÓN, C. **Maize diseases: a guide for field identification**. 4th ed. México: CIMMYT, p.119, 2004.

DIVELY G.P. et al. Regional pest suppression associated with widespread Bt maize adoption benefits vegetable growers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115:3320–3325, 2018.

EGHRARI, K. et al. Homozygosis of Bt locus increases Bt protein expression and the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize hybrids. **Crop Protection**, v. 124, p. 104871, 2019.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Nota técnica sobre o carlavírus. 2014.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>>. Acesso em 14 ago. 2017.

FATORETTO, J. C. et al. Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 8, n. 1, p. 17, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jipm/pmx011>>. Acesso em 05 abr. 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT Crops. 2017. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em 15 out. 2017.

FRIZZAS, M. R. et al. Genetically modified corn on fall armyworm and earwig populations under field conditions. *Ciência Rural*. 44, 203–209, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000200002>>. Acesso em 15 out. 2017.

GALVÃO, J. C. C. et al. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, n. suppl, p. 819–828, dez. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000007>> Acesso em 27 mar. 2017

GARCÍA-ROA F. et al. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), plaga del maíz y otros cultivos em Colombia. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 28, p. 53-60, 2002.

GOERGEN G. et al. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa, **PLoS ONE**. 2016.

GONÇALVES, M. C. et al. Mixed infection by Sugarcane mosaic virus and Maize rayado fino virus causing breaking yields in maize in São Paulo state. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 4, p. 348-352, 2007.

GOULD, F. Sustainability of Transgenic Insecticidal Cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 701–726, jan. 1998. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.701>.



- GUADAGNUOLO, R.; CLEGG, J.; ELLSTRAND, N. C. Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. **Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America**, v. 16, n. 5, p. 1967–74, out. 2006.
- HEAD, G. P.; GREENPLATE, J. The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. **GM Crops & Food**, v. 3, n. 3, p. 144–153, 20 jul. 2012. doi: <https://doi.org/10.4161/gmcr.20743>.
- HOOD, E. E. et al. Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 20–30, jan. 2012. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00627.x>.
- HORIKOSHI, R. J. et al. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific reports**, v. 6, p. 34864, 2016. doi: <https://doi.org/10.1038/srep34864>.
- HOWARD, J. A.; HOOD, E. E. **Commercial plant-produced recombinant protein products: case studies**. Berlin: Springer-Verlag, 281 p, 2014.
- HUANG, J. et al. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China. **Science**, v. 308, p. 688–690, 2005.
- HUANG, F.; ANDOW, D. A.; BUSCHMAN, L. L. Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 140, n. 1, p. 1–16, 1 jul. 2011. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01138.x>.
- HUANG, F. et al. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. **PLoS ONE**, v.9, n.11, p. e112958, 17 nov. 2014. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112958>.
- HUTCHISON, W. et al., Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science**, v. 330, p. 222–225, 2010.
- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications – ISAAA, 2017. GM approval database. Disponível em: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=6&TraitTypeID=Any&DeveloperID=Any&CountryID=BR&ApprovalTypeID=Any>>. Acesso em 16 jun. 2017.
- International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications - ISAAA Briefs, 2019. Brief. Disponível em: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/download/isaaa-brief-41-2009.pdf>>. Acesso em 10 set. 2019.
- 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, n. 1, p. 342–51, fev. 2014.
- JAMES, V. A. et al. The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 553–561, 1 mar. 2002. doi: <https://doi.org/10.1007/s001220100745>.
- KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Microscopia eletrônica de microrganismos do tipo micoplasma nos tecidos de milho afetado pelo enfezamento e nos órgãos da cigarrinha vectora portadora. **Bragantia**, v. 31, n. unico, p. 75–82, 1972. doi: <https://doi.org/10.1590/S0006-87051972000100006>.

LAW, R. D. et al. Biochemical limitations to high-level expression of humanized monoclonal antibodies in transgenic maize seed endosperm. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1760, n. 9, p. 1434–1444, 1 set. 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2006.05.006>.

LOPES, J.R.S.; OLIVEIRA, C.M. Vetores de vírus e mollicutes em milho. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, c. 2, p.35-60, 2004.

MARVIER M. et al. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. **Science**, v. 316, p. 1475–1477, 2007.

MASCARENHAS, V. J.; LUTTRELL, R. G. Combined Effect of Sublethal Exposure to Cotton Expressing the Endotoxin Protein of *Bacillus thuringiensis* and Natural Enemies on Survival of Bollworm (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) Larvae. **Environmental Entomology**, v. 26, n. 4, p. 939–945, 1 ago. 1997. doi: <https://doi.org/10.1093/ee/26.4.939>.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho. 1998. 75f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 1998.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. et al. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.

MCGAUGHEY, W. H.; WHALON, M. E. Managing Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Science**, v. 258, n. 5087, p. 1451–1455, 27 nov. 1992. doi: <https://doi.org/10.1126/science.258.5087.1451>.

MENDONZA-ELOS, M. et al. Accion Génica de la Resistencia al Achaparramiento del Maíz Causado por Espiroplasma, Fitoplasmas y Virus. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 20, 2002.

MENESES, A. R. Dinâmica populacional da *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE) e seus parasitoides em cultivos de milho no Nordeste Brasileiro. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, 2015.

MICHELOTTO, M. D. et al. Efficacy of transgenic mayze insecticide treatment to control fall armyworm in late-season maize in São Paulo state, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 2, p. 128–138, 2017. doi: <https://doi.org/10.1039/c3dt32988g>.

MIGUEL, F. B.; ESPERANCINI, M. S. T.; GRIZOTTO, R. K. Rentabilidade e risco da produção de milho safrinha geneticamente modificado e convencional na Região de Guáira/SP. **Energia na Agricultura**, v. 29, n. 1, p. 64, 2 mar. 2014. doi: <https://doi.org/10.17224/EnergAgric.2014v29n1p64-75>.

MOAR, W. J.; ANIKUMAR, K. J. **PLANT SCIENCE: The Power of the Pyramid**. **Science**, v. 318, n. 5856, p. 1561–1562, 7 dez. 2007. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1151313>.

MONNERAT R. et al. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoS ONE**, 2015.

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.

MORAES, K. E. **Expressão de Cry1F, controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e produtividade de grãos em híbridos de milho homozigotos e hemizigotos transgênicos.** 2017. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

NAQVI, S. et al. High-value products from transgenic maize. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 40–53, jan. 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.009>.

NAULT, L. R. Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: A Comparison of Disease Symptoms, Pathogen Host Ranges, and Vectors. **Phytopathology**, v. 70, n. 7, p. 659, 1980. doi: <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-659>. Acesso em: 12 nov. 2018.

NAULT, L. R.; GORDON, D. T.; GINGERY, R. E. 1980. Leafhopper transmission and host range of *Maize rayado fino virus*. **Phytopathology** 70:709- 712.

NAULT, L. R.; DELONG, D. M. Evidence for co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 73, n. 4, p. 349-353, 1980.

NAULT, L. R. et al. More on the Association of *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae) with Mexican *Tripsacum* (Poaceae), including the Description of Two New Species of Leafhoppers1. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, n. 2, p. 305–309, 15 mar. 1983. doi: <https://doi.org/10.1093/aesa/76.2.305>.

NAULT, L.R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case of study. **Maydica**, v.35, n.2, p.165-175, 1990.

NIU, Y. et al. 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, 1 maio 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2014.01.005>.

OLIVEIRA E.; WAQUIL J. M.; PINTO N. F. J. A. Doenças causadas por patógenos transmitidos por insetos: complexo enfezamento/mosaico. In:\_\_\_\_SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO “SAFRINHA”, 4., 1997, Assis. **Anais...** Campinas: IAC/CDV, p.87-94, 2015.

OLIVEIRA, C. M. et al. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.022>.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, n. 2, p. 141–153, maio 2013. doi: <https://doi.org/10.1111/eea.12059>

OLIVEIRA, C. M. et al. Eficiência de inseticidas em tratamento de sementes de milho no controle da cigarrinha *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) em viveiro telado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 231–235, fev. 2008. doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000100037>.

OLIVEIRA, C. M. et al. Disseminação de mollicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.91-95, 2002a.

OLIVEIRA, E.; LANDAU, E. C; MORAIS S. S, Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper and symptoms of infected maize. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 5, n. 1s, p. S99-S100, 2015.

- OLIVEIRA, E. et al. Molicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.2, p.38-46, 2002.
- OLIVEIRA, E. et al. Genetic control of maize resistance to corn stunt spiroplasma. **Phytopathogenic Mollicutes**, v. 3, n. 2, p. 67, 2013. doi: <https://doi.org/10.5958/j.2249-4677.3.2.016>.
- OLIVEIRA, E. et al. Transmission of maize bushy stunt phytoplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper. **Bulletin of Insectology**, v. 64, p. 153–154, 2011.
- OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M. **Doenças em milho: molicutes, vírus, vetores, mancha por phaeosphaeria**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 442, 2004.
- OLIVEIRA, E.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F.T. Identificação e Controle de Doenças na Cultura do Milho. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1. 198p, 2013b.
- OLIVEIRA, E. et al. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 2, p. 229–230, 2007.
- OLIVEIRA, E. et al. “Enfezamento pálido” e “Enfezamento vermelho” na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45–47, 1998. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(82\)90049-4](https://doi.org/10.1016/0304-4203(82)90049-4).
- OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Manag. Sci.**, v. 72, p. 1727–1736, 2016. <https://doi.org/10.1002/ps.4201>.
- POWER, A. G. Plant Community Diversity, Herbivore Movement, and an Insect-Transmitted Disease of Maize. **Ecology**, v. 68, n. 6, p. 1658–1669, dez. 1987. doi: <https://doi.org/10.2307/1939858>.
- PRASANNA B. M. et al. Fall armyworm in Africa: A Guide for Integrated Pest Management, First Edition. Mexico, 2018.
- REGENMORTEL, M. H. V. et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.**, 2000.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26p. (Special Report, 48).
- ROMEIS, J.; MEISSELE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 63–71, 1 jan. 2006. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt1180>.
- ROUSH, R. T. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: Can transgenic crops be better than sprays? **Biocontrol Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 501–516, jan. 1994. doi: <https://doi.org/10.1080/09583159409355364>.
- SABATO, E. O.; LANDAU, E. C.; COELHO, A. M. Effect of the corn stunt spiroplasma disease on maize production. - Portal Embrapa. In: **Acta Phytopathologica Sinica**, v. 43, p. 203–204, 2013.
- SANTANA, M. V. Danos do *Cowpea mild mottle virus* (CpMMV) e de mosca-branca (*Bemisia tabaci* Genn.) no feijoeiro-comum geneticamente modificado resistente ao *Bean golden mosaic virus*. 2015. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

- SANTOS-AMAYA, O. F. et al. Resistance to dual-gene *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep18243>.
- SHARANABASAPPA, K. C. M. et al. First report of the fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae) an Alien invasive pest on Maize in India. **Pest management in Horticultural Ecosystems**, v. 24, p. 23-29, 2018a.
- SHELTON, A. M. et al. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 339–342, 1 mar. 2000. doi: <https://doi.org/10.1038/73804>.
- SHURTLEFF, M.C. **Compendium of corn diseases**. 2<sup>nd</sup> ed. St. Paul: American Phytopathological Society, p 105, 1980.
- SHYLESHA A.N, JALALI S.K, GUPTA A., VARSHNEY R., VENKATESAN T., SHETTY P. et al., Studies on new invasive pest *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and its natural enemies. **Jornal Biol. Control**, v. 32, p. 145–151, 2018.
- SIEBERT, M. W. et al. 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.
- SILVA, A. H. et al. Controle de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) Delong & Wolcott (1923) por *Beauveria bassiana* na cultura do milho. **Boletín de sanidad vegetal Plagas**, v. 35, n. 4, p. 657-664, 2009.
- SILVA, BUNO M.; SANTOS, W. J. R.; MARQUES, J. J. Levantamento detalhado dos solos da Fazenda Muquém / UFLA, Lavras - MG. 98. ed. Lavras - MG: Editora UFLA, 2014. v. 1. 76p.
- SILVEIRA, F. T. et al. Herança da resistência ao enfezamento em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1717-1723, 2008.
- STORER, N. P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **J Invertebr Pathol**, v.110, p. 294–300, 2012.
- STORER, N. 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, 1 ago. 2010. doi: <https://doi.org/10.1603/EC10040>.
- 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, n. 3, p. 154–162, 20 jul. 2012. doi: <https://doi.org/10.4161/gmcr.20945>.
- SUMMERS, C. G.; NEWTON, A. S.; OPGENORTH, D. C. Overwintering of Corn Leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), and *Spiroplasma kunkelii* (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) in California's San Joaquin Valley. **Environmental Entomology**, v. 33, n. 6, p. 1644–1651, 1 dez. 2004. doi: <https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.6.1644>.
- TABASHNIK B. E.; CARRIÈRE Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nat Biotechnol**, v. 35, p. 926–935, 2017.
- TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 1 jun. 2013. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.2597>.

- TRUMPER E.V. Resistencia de insectos a cultivos transgénicos con propiedades insecticidas. Teoría, estado del arte y desafíos para la República Argentina. **AgriScientia** 31(2):109–126, 2014.
- VARELLA, A. C. et al. Mortality dynamics of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) immatures in maize. **PloS one**, v. 10, n. 6, 2015.
- VÁSQUEZ, J.; MORA, E. Incidence of and yield loss caused by maize rayado fino virus in maize cultivars in Ecuador. **Euphytica**, v. 153, n. 3, p. 339–342, 24 jan. 2007. doi: <https://doi.org/10.1007/s10681-006-3889-4>.
- WANG, C. L.; LIN, F. C.; LIN, C. Y. Insect-resistant transgenic plants and the environmental impact assessment - special concern for insects. **Plant Protection Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 181–209, 2004.
- WAQUIL, J. M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 27–33, abr. 1997. doi: <https://doi.org/10.1590/S0301-80591997000100004>.
- WAQUIL, J. M. et al. Manejo de lepidópteros-praga na cultura do milho com o evento Bt piramidado Cry1A.105 e Cry2Ab2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 12, p. 1529–1537, dez. 2013. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013001200001>.
- WAQUIL, J. M. et al. Atividade biológica das toxinas do Bt, Cry 1A(b) e Cry 1F em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v.3, n.2, p.161-171, 2004.
- ZAMBRANO J. L. et al. Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. **Theoretical and Applied Genetics** v 127, p. 867–880, 2014.