

EFEITO DA ZIGOSIDADE DO EVENTO MIR162 EM HÍBRIDOS DE MILHO

por

AUGUSTO KOLLING BRATZ

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioenergia e Grãos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Bioenergia e Grãos.

RIO VERDE – GO

Março – 2024

EFEITO DA ZIGOSIDADE DO EVENTO MIR162 EM HÍBRIDOS DE MILHO

por

AUGUSTO KOLLING BRATZ

Comitê de Orientação:

Orientadora: Prof. Dra. Renata Pereira Marques – IF Goiano – Campus Rio Verde

Co-orientador: Dr. Pablo Diego Silva Cabral – IF Goiano – Campus Rio Verde



Ata nº 2/2024 - UDP-POLO/POLO/IFGOIANO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
ATA Nº 79 (SETENTA E NOVE)
BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e um dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e quatro, às 15h00min (quinze horas), reuniram-se os componentes da banca examinadora em sessão pública realizada de forma remota, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, de autoria de **AUGUSTO KOLLING BRATZ**, discente do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia e Grãos do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Profª. Dra. Renata Pereira Marques, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação que, em 30 min, procedeu a apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Bioenergia e Grãos, e procedida às correções recomendadas, a Dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOENERGIA E GRÃOS**, na área de concentração Agroenergia, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGBG da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade, se não cumprida essa condição, em até **60 (sessenta) dias** da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos resultados em revista científica de circulação nacional, após a implementação das modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada eletronicamente pelos membros da Banca Examinadora.

Membros da Banca Examinadora

Nome	Instituição	Situação no Programa
Renata Pereira Marques	IF Goiano – Campus Rio Verde	Presidente
Pablo Diego da Silva Cabral	IF Goiano – Campus Rio Verde	Membro interno
Leonardo de Castro Santos	IF Goiano – Campus Rio Verde	Membro interno
Adilson Harter	Syngenta Seeds	Membro externo

Documento assinado eletronicamente por:

- Adilson Harter, Adilson Harter - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano (1), em 21/03/2024 17:22:31.
- Leonardo de Castro Santos, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/03/2024 17:10:30.
- Pablo Diego Silva Cabral, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/03/2024 17:08:49.
- Renata Pereira Marques, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/03/2024 17:07:40.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 22/02/2024. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 575193
Código de Autenticação: 00fc3570e9





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 2/2024 - UDP-POLO/POLO/IFGOIANO

EFEITO DA ZIGOSIDADE DO EVENTO MIR162 EM HÍBRIDOS DE MILHO

Autor: Augusto Kolling Bratz
Orientadora: Renata Pereira Marques

TITULAÇÃO: Mestre em Bioenergia e Grãos - Área de Concentração Agroenergia

APROVADO em 21 de março de 2024.

Assinado eletronicamente
Dr. Adilson Harter
Avaliador externo - Syngenta Seeds

Assinado eletronicamente
Prof. Dr. Leonardo de Castro Santos
Avaliador interno - IF Goiano
Campus Rio Verde

Assinado eletronicamente
Prof. Dr. Pablo Diego da Silva Cabral
Coorientador - IF Goiano Campus Rio Verde

Assinado eletronicamente
Profª. Dra. Renata Pereira Marques
Presidente da Banca - IF Goiano Campus Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Adilson Harter, Adilson Harter - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano (1), em 21/03/2024 17:22:00.
- Pablo Diego Silva Cabral, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/03/2024 17:10:49.
- Leonardo de Castro Santos, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/03/2024 17:10:42.
- Renata Pereira Marques, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 21/03/2024 17:09:59.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 22/02/2024. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 575204
Código de Autenticação: c1af79810f



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Polo de Inovação
Rodovia Sul Goiana Km 01, None, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75.901-970
None

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por sempre estar comigo me iluminando e guiando meu caminho.

A minha amiga, companheira e esposa Wendy por me dar todo carinho e persistir juntamente comigo em todas minhas escolhas, me levantando e estendendo as mãos quando eu precisava. Aos meus queridos pais e irmãos por todo carinho e apoio que me foi oferecido e retribuído em momentos de grande decisões e incertezas em que passei. Á todos aqueles que estavam ao meu lado torceram por mim e que estenderam as suas mãos quando eu precisava.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, pela oportunidade que me foi dada de realizar um mestrado em um programa de pós-graduação.

A Empresa Syngenta Seeds por prover toda a estrutura necessária para a pesquisa, a equipe de Teste e principalmente o Dr. Kian Eghrari que me apoiou durante o curso e durante todo o ciclo dos experimentos.

Por fim, a minha orientadora Dra. Renata Pereira Marques pelos ensinamentos e experiências a mim repassados, pela paciência e dedicação que foram de grande relevância para realização deste trabalho, crescimento acadêmico e profissional.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. CULTURA DO MILHO	5
2.2. PRODUÇÃO MUNDIAL	7
2.3. PRODUÇÃO NO BRASIL	8
2.4. HÍBRIDOS TRANSGÊNICOS E MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS	8
2.5. ZIGOSIDADE EM HÍBRIDOS TRANSGÊNICOS COMO ESTRATÉGIA DE MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. LOCAL DA INSTALAÇÃO DOS ENSAIOS	11
3.2. DELINEAMENTO DO ENSAIO	12
3.3. AVALIAÇÕES	12
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

EFEITO DA ZIGOSIDADE DO EVENTO MIR162 EM HÍBRIDOS DE MILHO

por

AUGUSTO KOLLING BRATZ

(Sob Orientação da Professora – Dra. Renata Pereira Marques IF - Goiano – Campus Rio Verde)

RESUMO

Os híbridos de milho Bt em sua maioria contém apenas uma cópia do alelo do gene transgênico, sendo uma planta hemizigota para o transgene. A adição de outro alelo, homozigoto para a transgenia, é uma abordagem recente que incrementa a concentração de proteína Bt na folha e pode até reduzir as injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda*, porém pouco ainda se conhece sobre o custo adaptativo de um alelo transgênico adicional em híbridos de milho. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da zigosidade de MIR162 em híbridos de milho. Para isso, foram utilizados dois híbridos de milho, cada um com três versões isogênicas: 1) convencional, 2) hemizigoto para MIR162 e 3) homozigoto para MIR162. Levando-se em consideração os experimentos e as biotecnologias avaliadas, foi possível inferir que os híbridos de milho em homozigose não diferem dos híbridos em hemizigose e convencional e 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.

PALAVRAS-CHAVE: *Zea mays*, Expressão de alelos, Transgenia em hemizigose, Transgenia em homozigose.

EFFECT OF ZIGOSITY OF EVENT MIR162 IN CORN HYBRIDS

por

AUGUSTO KOLLING BRATZ

(Sob Orientação da Professora – Dra. Renata Pereira Marques IF - Goiano – Campus RioVerde)

ABSTRACT

Most Bt corn hybrids contain only one copy of the transgenic gene allele, being a plant hemizygous for the transgene. The addition of another allele, homozygous for transgenesis, is a recent approach that increases the concentration of Bt protein in the leaf and can even reduce injuries caused by *Spodoptera frugiperda*, but little is still known about the adaptive cost of an additional transgenic allele in corn hybrids. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of MIR162 zygosity in maize hybrids. For this, two corn hybrids were used, each with three isogenic versions: 1) conventional, 2) hemizygous for MIR162, and 3) homozygous for MIR162. Taking into account the experiments and biotechnologies evaluated, it was possible to infer that homozygous corn hybrids do not differ from hemizygous and conventional hybrids and that zygosity in transgenic Bt hybrids did not harm or cause an increase in corn grain productivity comparing hybrids and their versions, concluding that the effect was neutral.

KEYWORDS: *Zea mays*, Allele expression, Transgenics in hemizyosity, Transgenics in homozygosity.

1. INTRODUÇÃO

O milho apresenta vários fatores limitantes para a obtenção do máximo potencial produtivo, incluindo o ataque de pragas como um dos agentes do estresse mais importantes (Waquil et al. 2004). Entre os vários insetos-praga que podem atacar a cultura do milho, a lagarta-do-cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*) (Smith 1797) é considerada uma das mais importantes, podendo causar perdas consideráveis à produção, variando de acordo com o ambiente, híbrido e estágio de desenvolvimento e nutricional das plantas atacadas (Cruz 1995).

A maioria dos eventos transgênicos de milho Bt expressam proteínas inseticidas para o controle de insetos lepidópteros, como a lagarta-do-cartucho que causa a desfolha do milho (Niu et al. 2014). Devido sua importância na redução da produtividade do milho e de outras culturas hospedeiras, diversos avanços tecnológicos foram realizados no melhoramento genético e possibilitaram o uso da biotecnologia para desenvolver híbridos transgênicos resistentes (Miguel et al. 2014). Embora os transgenes forneçam eficiência geral no controle, o número de casos de resistência para lagarta-do-cartucho a várias proteínas Bt tem aumentado devido práticas inadequadas de manejo e variabilidade genética da praga (Storer et al. 2010, Farias et al. 2014, Omoto et al. 2015).

A continuidade da tecnologia Bt traz um grande desafio para o manejo de resistência à inseto devido a alta adoção de híbridos resistentes à lagarta-do-cartucho, levando ao abandono de importantes práticas integradas do manejo de pragas (Bialozor 2017). Portanto, fatores como não utilização de áreas de refúgio; sobrevivência de indivíduos heterozigotos; ambiente favorável e alta temperatura para o crescimento populacional da praga; cultivo de duas safras de milho seguidas (Storer et al. 2010) e a utilização de eventos com expressão de proteínas em doses baixas (Farias et al. 2014, Storer et al. 2010) podem contribuir para o aumento da frequência de populações de insetos resistentes aos genes.

Quando as plantas possuem um transgene hemizigoto, apresenta a dose genética de meio “n”, enquanto indivíduos com *locus* homozigotos podem atingir doses com o dobro de “n”, ou seja, quando o evento é homozigoto, é possível atingir uma alta expressão do transgene, o que pode ser até quatro vezes maior em comparação com plantas hemizigotas (James et al. 2002), o que pode ser denominado de controle “redundante”.

A maioria dos híbridos de milho OGM desenvolvidos por empresas de melhoramento são hemizigotos para transgenia (James et al. 2002), portanto, os híbridos contêm um alelo transgênico e um alelo alternativo nulo de substituição, o que representa híbridos que estão em hemizigose (Guadagnuolo et al. 2006). Com relação à adição de alelos para híbridos, é possível obter resultados inesperados. Híbridos homozigotos podem ter efeitos positivos, mas também negativos devido aumento da concentração de proteína na planta, como por exemplo, causar o silenciamento gênico transcricional, pós-transcricional e, até ser mesmo letal, ou ter o mesmo desempenho que os hemizigotos (James et al. 2002). Apesar desses efeitos negativos em alguns casos, essa nova abordagem pode constituir uma estratégia alternativa eficaz e promissora para o manejo de lagartas resistentes, permitindo a expressão de proteínas em altas doses e beneficiar seu uso na eficiência de controle em eventos transgênicos que atualmente tem apresentado menor eficiência no controle à campo.

Com relação à tecnologia transgênica avaliada no presente trabalho, objetivou-se verificar se há um custo adaptivo para a planta na produtividade de grãos, quando adiciona-se um alelo a mais de MIR162.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea anual, com grande adaptação a diferentes ambientes e pertence ao grupo de plantas com metabolismo C4. O grão desta espécie é um fruto, que se denomina cariopse, e que possui um pericarpo fundido com o tegumento da semente (Embrapa Milho e Sorgo 2009).

Segundo Fornasieri Filho (2007), o milho pertence à família Poaceae, onde é a única espécie cultivada do gênero. Outras espécies do gênero *Zea*, chamadas de teosinto, e as espécies do gênero *Tripisacum* são formas selvagens parentes de *Zea mays*.

No Brasil, a cultura do milho pode ser considerada de extrema importância, tanto em aspecto econômico quanto no social. No aspecto econômico, se destaca por ocupar a segunda posição em maior área cultivada e ser responsável pela segunda maior produção de grãos no país (Fornasieri Filho 2007).

Sua importância social baseia-se unicamente, em três evidências. A primeira, por ser o principal componente básico da dieta da população, principalmente na classe pobre da população; a segunda, por ser cultivado por produtores rurais pequenos; a terceira, por ser um importante e principal componente da ração animal (corresponde cerca de 60 a 70% do custo na ração de suínos e aves) (Fornasieri Filho 2007).

Na atualidade, o milho é uma planta que está completamente domesticada, pois não se desenvolve de forma selvagem e não pode sobreviver na natureza, sendo completamente dependente dos cuidados do homem. Sua domesticação ocorreu há cerca de 4 mil anos atrás, a partir do teosinto, uma planta aparentemente sem relevância das terras altas mexicanas (Galinat & Lin 1988).

Entre os cereais que são cultivados no Brasil, o milho é o mais significativo, cuja produtividade é de aproximadamente 131,9 milhões de toneladas do grão, em uma área em torno de 78,5 milhões de hectares que são referentes a duas safras (Conab 2023). O Brasil é o

terceiro maior produtor de milho, perdendo apenas para os Estados Unidos e China (Fornasieri Filho 2007).

Nestes últimos anos, a cultura do milho no Brasil, vem sofrendo muitas modificações tecnológicas importantes, resultante de incrementos expressivos em produtividade e produção. Entre as tecnologias empregadas, destacam-se a utilização de sementes de cultivares melhoradas (variedades e híbridos), alterações no espaçamento e na densidade de semeadura de acordo com as características da cultivar, além da conscientização dos produtores da utilidade de melhorar a qualidade dos solos, desejando uma maior produção. Ocorrem ainda, importantes mudanças no complexo de produção, salientando o aumento do cultivo de milho “safrinha” e o aumento do conjunto de semeadura direta (Fornasieri Filho 2007).

De acordo com o Ministério da Agricultura (2009), existem várias cultivares de milho que são adaptadas para as condições do nosso país. No entanto, a escolha de uma cultivar para um determinado local, deve suceder de acordo com as características desse local, da variedade, tais como: condições climáticas, características do solo, disponibilidade de água, data estimada da sementeira e da colheita, destino da cultura para grão ou forragem.

A cultura do milho tem alto potencial produtivo devido as suas características fisiológicas, já tendo sido atingido produtividade superior a 16 t.ha^{-1} , em concursos de produtividade dirigidos por órgãos de extensão rural e assistência técnica e por empresas produtoras de semente. Todavia, o nível médio brasileiro de produtividade é muito menor, por volta de 4.311 kg/ha^{-1} , mostrando que os diferentes métodos de produção de milho deverão ser ainda bastante aprimorados para se obter um acréscimo significativo na produtividade e na renda do produtor que a cultura pode permitir (Embrapa Milho e Sorgo 2009).

Segundo Farias et al. 2001, os fatores responsáveis por essa baixa produtividade são muitos, mas com certeza, as pragas e doenças têm uma boa atuação para que aconteça esse baixo potencial, especialmente nos últimos anos com o cultivo de milho "safrinha", que

apresenta condições para a continuidade e desenvolvimento das pragas devido ao prolongamento da planta de milho na área, ao longo de todo ano.

2.2. Produção mundial

De acordo com a Formigoni, a produção mundial de milho teve um incremento de cerca de 66% desde a safra 1999/2000, passando de 608 milhões de toneladas para o presente 853 milhões de toneladas (safra 2022/23). Isso corresponde em um crescimento médio mundial da produção de milho de 2,5% ao ano.

A produção mundial de milho para a safra 2022/23 deve cair em relação ao recorde do ano passado, refletindo reduções na Ucrânia, EUA, UE e China, parcialmente compensadas por aumentos no Brasil e na Argentina. A safra global 2021/22 de milho foi elevada de 1.210,5 milhão de toneladas para 1.215,6 milhão de toneladas. Para 2022/23, espera-se queda de 2,9%.

A safra de milho dos EUA foi projetada em 367,3 milhões de toneladas, recuo de 4,3% em relação à anterior, com base na estimativa de uma menor área plantada e produtividade mais baixa, decorrente de problemas climáticos. O atraso no plantio deste ano nos principais estados produtores e a probabilidade de que o progresso até meados de maio permaneça bem atrás do normal também influenciaram essa queda na produtividade. O consumo mundial do cereal foi projetado em 1,18 bilhão de toneladas, acréscimo de 2,4 milhões de toneladas em relação à safra anterior. Os estoques finais globais de milho foram estimados em 305,1 milhões de toneladas, recuo de 1,4%, refletindo os declínios esperados para a China e os Estados Unidos, que foram parcialmente compensados por aumentos para Brasil e Ucrânia. Espera-se que o consumo de milho nos EUA em 2022/23 recue 2,2% em relação ao período anterior. O milho usado para etanol deve ficar inalterado, devido às expectativas de consumo estável de gasolina no país. Já o consumo para ração deve cair 4,9% em relação ao ano passado, refletindo perspectivas de uma safra menor, preços médios recebidos pelos produtores mais altos e um declínio no rebanho

bovino americano. No caso da Ucrânia, a estimativa é de queda de 30,3%, ou 4,0 milhões de toneladas no consumo do cereal para essa temporada em relação à anterior (Conab 2023).

2.3. Produção no Brasil

Nos últimos anos vem sendo observada uma tendência de substituição da cultura do milho, em especial, pela soja. Soja e milho é a preferência do produtor, e corresponde por cerca de 89% dos grãos produzidos do país. A perspectiva para a produção do grão total é de 129,15 milhões de toneladas (safra 2023/24). Para a safra verão estima uma colheita de 26,39 milhões de toneladas (Conab 2023).

De acordo com o órgão de pesquisa americano, a produção do Brasil, deve ter um decréscimo de 5%, em relação à safra anterior (2022/23), resultado da queda na produtividade. A estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) é que a produção de milho na safra de verão será menor do que a safra anterior (2022/23), situando-se entre 15% e 20%, em decorrência à baixa cotação dos preços desse cereal. Porém, há expectativas de melhoria de preços para o milho até o primeiro trimestre de 2023, quando se inicia a safrinha (Conab 2023).

2.4. Manejo de resistência de insetos em híbridos transgênicos

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 causar resistência a insetos, diminuindo a serventia 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).

Muitos fatores contribuíram para a e rápida evolução da resistência na lagarta-do-cartucho, como a alta taxa reprodutiva e multivoltinismo da espécie, e 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, 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 et al. 2010, Head & Greenplate 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 & Buschman, 2011). A estratégia de alta dose combinado com 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 & 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).

2.5. Estratégia de manejo de resistência de insetos através da zigosidade de híbridos transgênicos

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 contribuem com a evolução da resistência em suas populações (Andow 2008). Assim, algumas não adoções como de áreas de refúgio (Shelton et al. 2000) e 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 Manejo de Resistência de Insetos devem ser pesquisadas a fim de proporcionar maior durabilidade das tecnologias transgênicas quanto à eficiência de controle das pragas-alvo.

Novas abordagens em Manejo de Resistência de Insetos têm sido investigadas recentemente, 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 (Huang & 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 (James et al. 2002). Essa estratégia pode ser uma alternativa no manejo de lagartas resistentes, permitindo a expressão em alta dose das proteínas, o que também pode facilitar 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 et al. 2006, para a obtenção do híbrido transgênico são cruzadas duas linhagens, sendo uma delas homocigota para o transgene e a outra sem transgenia, denominada de linhagem convencional. Nos híbridos homocigotos pode haver efeitos deletérios devido à zigosidade dessas plantas transgênicas, e 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 homocigota (Hood et al. 2012, James et al. 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da instalação dos ensaios

Os experimentos foram conduzidos na Estação Experimental de Pesquisa da Syngenta Seeds Ltda., localizada cerca de 10 Km da cidade de Uberlândia-MG que possui latitude de 18°55'08"S e longitude de 48°16'37"O e altitude de 887 metros. O município de Uberlândia possui clima tropical e, no inverno, a ocorrência de chuvas é menor comparada ao verão. A temperatura média anual é de 22,3°C e a média de pluviosidade é de 1.342 mm (Climate-Data.Org 2021).

Tabela 1: Dados climatológicos de Uberlândia-MG no ano de 2023 (Inmet 2023)

	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maior	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
Temperatura média (°C)	23,7	23,8	23,6	23,2	21,7	21,1	21,3	23,3	25,5	25,4	23,9	23,8
Temperatura mínima (°C)	20,4	20,4	20,2	19,9	16,8	15,8	15,6	17,1	19,8	20,7	20,3	20,4
Temperatura máxima (°C)	27,8	28,2	28	28	27,1	26,8	27,3	29,6	31,6	30,9	28,6	28
Chuva (mm)	239	209	217	96	30	10	4	13	58	150	220	247
Umidade (%)	80%	79%	80%	72%	63%	58%	50%	41%	44%	60%	76%	80%
Dias Chuvosos (d)	17	16	17	10	4	1	1	2	6	13	17	19
Horas de sol (h)	8,8	8,9	8,4	8,9	9,0	9,3	9,7	10,2	10,1	10,0	9,0	8,8

3.2. Delineamento do ensaio

Adotou-se o delineamento em blocos ao acaso com os tratamentos em esquema fatorial 2x3, com quatro repetições, sendo avaliados dois híbridos comerciais, sob 3 versões isogênicas: convencional, hemizigoto para MIR162 e homozigoto para MIR162. Cada parcela foi composta por quatro linhas de cinco metros, espaçadas em 50 cm e com 64 plantas por parcela, o que representa uma população de 64.000 plantas ha⁻¹. A semeadura foi realizada entre os meses de fevereiro – Experimento 1 (18/02/2023) e março – Experimento 2 (03/03/2023), seguindo as recomendações de adubação de acordo com a necessidade da cultura e fertilidade do solo.

3.3. Avaliações

Como avaliações quantitativas foram considerados as avaliações de florescimento (dias) - realizada quando 50% da parcela estava florescida, altura de plantas (cm) e de espigas (cm) - realizado 7 dias antes da colheita. Após a maturação fisiológica das plantas dos dois experimentos, realizou-se a colheita das duas linhas centrais da parcela, onde foram computados os valores de peso de grãos (gramas). Os resultados aqui apresentados são oriundos de avaliações conduzidas individualmente para cada experimento e, adicionalmente, uma análise conjunta foi realizada para examinar globalmente os dados relacionados à produtividade de grãos. As variáveis consideradas nesse contexto foram submetidas a análise de variância, destacando-se os fatores "biotecnologia", "híbridos" e a interação entre "biotecnologia" e "híbridos".

3.4. Análise estatística

As análises dos dados foram desenvolvidas no software R (R CORETEAM 2016). As análises foram feitas para cada experimento separadamente e em análise conjunta, avaliando por fim os dados de produtividade de grãos. As médias dos caracteres avaliados de acordo com os híbridos de milho foram comparadas pelo teste F a 1% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Altura das plantas está relacionado com a cultivar ou híbrido utilizado, porém sua altura é determinada pelo seu código genético, ou seja, qualquer efeito adverso que cause qualquer variação em sua altura nos seus estágios de desenvolvimento está causando à planta um estresse, afetando assim sua produtividade. Além de influenciar no sombreamento, estiolamento e sobreposição de plantas que são pontos importantíssimos no processo de produção. A mensuração da altura de plantas, como fator na análise estatística não apresentou diferenças significativas nas análises feitas. Com o experimento 1, apresentando maior média geral entre os experimentos. Com relação à altura da planta, o experimento 1 apresentou a maior média geral entre os experimentos com 244,9 cm (Tabela 1). Já o experimento 2 apresentou menor média geral, com 237,96 cm (Tabela 2). Não houve diferença estatística entre os experimentos.

Tabela 1 - Análise de variância para altura de plantas e espigas no Experimento 1. Uberlândia, MG, 2023.

Variável	Fator	Df	MeanSQ	Pvalue	Média Geral	CV%
Altura de plantas	Bloco	3	9,06		244,9	3,2
	Biotec	2	7,17	0,89 ^{ns}		
	Híbrido	1	0,17	0,96 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	20,67	0,72 ^{ns}		
	Resíduo	15	60,59			
Altura de espigas	Bloco	3	76,33		146,2	6,4
	Biotec	2	14,29	0,85 ^{ns}		
	Híbrido	1	48,17	0,47 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	48,29	0,59 ^{ns}		
	Resíduo	15	88,87			

Df – Graus de liberdade, CV – Coeficiente de variação, Pvalue - Probabilidade de obter resultados no mínimo tão extremos quanto os que foram observados, dado que a hipótese nula H0 é verdadeira, MeanSQ - Média , Média geral (kg).

Tabela 2 - Análise de variância para altura de plantas e espigas no Experimento 2. Uberlândia, MG, 2023.

Variável	Fator	Df	MeanSQ	Pvalue	Média Geral	CV%
Altura de plantas	Bloco	3	52,71		237,96	3,89
	Biotec	2	29,54	0,71 ^{ns}		
	Híbrido	1	3,37	0,85 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	291,38	0,06 ^{ns}		
	Resíduo	15	85,84			
Altura de plantas	Bloco	3	55,67		131,83	8,10
	Biotec	2	62,27	0,59 ^{ns}		
	Híbrido	1	0,17	0,97 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	155,17	0,29 ^{ns}		
	Resíduo	15	114,10			

Df – Graus de liberdade, CV – Coeficiente de variação, Pvalue - Probabilidade de obter resultados no mínimo tão extremos quanto os que foram observados, dado que a hipótese nula H0 é verdadeira, MeanSQ - Média , Média geral (kg).

A emergência do florescimento masculino acontece em torno de 56 dias após a semeadura e o surgimento do florescimento feminino acontece em torno de 59 a 77 dias Segundo Paterniani & Viégas 1987. Este período entre o florescimento masculino e o florescimento feminino é a transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva e pode variar consideravelmente, dependendo do genótipo e das condições ambientais (Silva et al. 2006).

Os estádios fenológicos surgiram pela necessidade de especificar, de maneira clara e objetiva, as etapas de desenvolvimento das plantas, facilitando uma melhor descrição do ciclo (Bergamaschi 2006). Assim, o uso de uma escala baseada nas mudanças morfológicas da planta e nos eventos fisiológicos que se sucedem no ciclo de vida do milho oferece maior segurança e acurácia nas ações de manejo da cultura (Fancelli 2002). As linhagens masculinas apresentaram destaque em ambas as épocas de semeadura (fevereiro e março). Entretanto, tivemos diferenças significativas no florescimento feminino entre híbridos no experimento 1 (Tabela 3) e não se repetindo no experimento 2 (Tabela 4).

Tabela 3 - Análise de variância para florescimento no Experimento 1. Uberlândia, MG, 2023.

Variável	Fator	Df	MeanSQ	Pvalue	Média Geral	CV%
Florescimento masculino	Bloco	3	0,56		61,02	1,1
	Biotec	2	0,67	0,24 ^{ns}		
	Híbrido	1	0,67	0,23 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	0,67	0,24 ^{ns}		
	Resíduo	15	0,42			
Florescimento feminino	Bloco	3	0,49		62,8	1,9
	Biotec	2	1,29	0,44 ^{ns}		
	Híbrido	1	26,04	0,00 ^{**}		
	Biotec x híbrido	2	3,79	0,11 ^{ns}		
	Resíduo	15	1,49			

Df – Graus de liberdade, CV – Coeficiente de variação, Pvalue - Probabilidade de obter resultados no mínimo tão extremos quanto os que foram observados, dado que a hipótese nula H0 é verdadeira, MeanSQ - Média , Média geral (kg).

Tabela 4 - Análise de variância para florescimento no Experimento 2. Uberlândia, MG, 2023.

Variável	Fator	Df	MeanSQ	Pvalue	Média Geral	CV%
Florescimento masculino	Bloco	3	0,15		69,04	1,41
	Biotec	2	0,29	0,74 ^{ns}		
	Híbrido	1	0,04	0,84 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	0,79	0,45 ^{ns}		
	Resíduo	15	0,95			
Florescimento feminino	Bloco	3	0,15		70,04	1,00
	Biotec	2	1,54	0,07 ^{ns}		
	Híbrido	1	2,04	0,06 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	0,04	0,92 ^{ns}		

	Resíduo	15	0,49
Df – Graus de liberdade, CV – Coeficiente de variação, Pvalue - Probabilidade de obter resultados no mínimo tão extremos quanto os que foram observados, dado que a hipótese nula H0 é verdadeira, MeanSQ - Média , Média geral (kg).			

Embora os experimentos tenham sido tratados independentemente, verifica-se diferença na produtividade de grãos entre os Experimentos 1 e 2. A maior média de produtividade de grãos ocorreu no Experimento 1, com 7.334,20 kg (Tabela 5), enquanto no experimento 2 a maior média de produtividade foi de 6.135,14 kg (Tabela 6), ambos nas versões convencionais. Diferente do estudo realizado por Eghrari et al. (2019), que avaliou lesões foliares causadas por *S. frugiperda* em híbridos homocigotos e hemizigotos de milho, onde o rendimento de grãos dos híbridos homocigotos 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.

Tabela 5 - Análise de variância para produtividade de grãos no Experimento 1. Uberlândia, MG, 2023.

Variável	Fator	Df	MeanSQ	Pvalue	Média Geral	CV%
Produtividade de Grãos	Bloco	3	2.870.925,33		7.334,20	13,00
	Biotec	2	1.382.142,88	0,25 ^{ns}		
	Híbrido	1	108.183,13	0,73 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	548.170,28	0,56 ^{ns}		
	Resíduo	15	906.162,56			

Df – Graus de liberdade, CV – Coeficiente de variação, Pvalue - Probabilidade de obter resultados no mínimo tão extremos quanto os que foram observados, dado que a hipótese nula H0 é verdadeira, MeanSQ - Média , Média geral (kg).

Tabela 6 - Análise de variância para produtividade de grãos no Experimento 2. Uberlândia, MG, 2023.

Variável	Fator	Df	MeanSQ	Pvalue	Média Geral	CV%
Produtividade de Grãos	Bloco	3	855.965,16		6.135,14	14,34
	Biotec	2	662.263,56	0,44 ^{ns}		
	Híbrido	1	2.648.842,15	0,08 ^{ns}		
	Biotec x híbrido	2	684.333,61	0,43 ^{ns}		
	Resíduo	15	773.569,22			

Df – Graus de liberdade, CV – Coeficiente de variação, Pvalue - Probabilidade de obter resultados no mínimo tão extremos quanto os que foram observados, dado que a hipótese nula H0 é verdadeira, MeanSQ - Média , Média geral (kg).

Tabela 7 - Análise de variância para produtividade de grãos entre os experimentos 1 e 2

Variável	Fator	Df	MeanSQ	Pvalue	Média Geral	CV%
Produtividade de Grãos	Bloco	3	1.869.575,8		6.734,7	13,6
	Experimento	1	17.251.901,1	0,000 ***		
	Biotec	2	1.976.047,4	0,112 ^{ns}		
	Híbrido	1	843.199,6	0,324 ^{ns}		
	Biotec x Híbrido	2	1.150.708,8	0,270 ^{ns}		
	Experimento x Biotec	2	68.359,1	0,922 ^{ns}		
	Experimento x Híbrido	1	1.913.825,7	0,142 ^{ns}		
	Bloco x Experimento	3	1.857.314,6			
	Experimento x Biotec x Híbrido	2	81.795,1	0,907 ^{ns}		
	Resíduo	30	839.865,9			

Buntin 2008 e Moraes et al. (2015), avaliaram o efeito da infestação natural de *S. frugiperda* na produtividade de híbridos convencionais e suas versões transgênicas com diferentes eventos Bt, e observaram que os híbridos convencionais sofreram maiores injúrias de *S. frugiperda* que os OGM. Porém, a maioria dos híbridos convencionais tiveram produtividade de grãos semelhante à dos híbridos transgênicos, demonstrando que o nível baixo de ataque de lagartas não foi suficiente para evidenciar as diferenças na produtividade de grãos.

Waquil et al. (2002), comparando híbridos de milho Bt e convencional sob infestação artificial, mostraram que híbridos Bt tiveram números menores de lagartas nas plantas, as quais foram menos danificadas pelo ataque e com produtividade de grãos 32% maior que os híbridos convencionais.

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

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 causasse maior suscetibilidade às doenças ou reduções em produtividade por conta de maior custo metabólico e energético às plantas para a produção das proteínas transgênicas.

Tem alguns estudos que mostram que a homozigose do transgene pode ser positiva em alguns casos, favorecendo um aumento na concentração da proteína codificada na planta; efeito que em outros casos foi neutro, confirmando o mesmo desempenho dos hemizigotos. Porém, há casos com efeitos negativos, proporcionando o silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional, e até ser letal as plantas (Hood et al. 2012, James et al. 2002). Nos estudos de Siebert et al. (2012) e Eghrari et al. (2019), os autores analisaram híbridos de milho convencionais e transgênicos com as proteínas Cry1F, Cry1A.105 e Cry1Ab2 piramidadas e singulares, e confirmaram que há 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.

Nos Experimentos 1 e 2, as produtividades de grãos 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 nos transgênicos em relação ao convencional na primeira safra. Guadagnuolo et al. 2006, relataram que na ausência de pressão de seleção em que beneficia a transgenia, torna-se um fator neutro na influência da capacidade produtiva da planta.

De acordo com os resultados aqui obtidos, a adição de alelos transgênicos em híbridos de milho não reduziu a produtividade de grãos em função da energia necessária para a produção de maiores concentrações das proteínas transgênicas Bt nas plantas.

5. CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os experimentos e as biotecnologias avaliadas, pode-se inferir que os híbridos de milho em homozigose não diferem dos híbridos em hemizigose e convencional. Portanto, 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 e pode ser promissor seu uso futuramente em escala comercial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOW, D.A. 2008. The Risk of Resistance Evolution in Insects to Transgenic Insecticidal Crops. Collection of Biosafety Reviews. v. 4, p. 142-199.

ARAGÃO, F.J.L. & J.C. FARIA. 2009. First transgenic geminivirus resistant plant in the field. Nature: Biotechnology, New York, v. 27, p. 1086-1088.

BERGAMASCHI, H. 2006. Fenologia.

BIALOZOR, A. 2017. 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.

BROD, F.C.A. et al. 2013. Quantification of genetically modified common bean Embrapa 5.1. Journal of agriculture food chemistry, Washington, v. 61, p. 4921–4926.

BUNTIN, G.D. 2008. Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endo toxin for fall army worm and corn ear worm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. Florida Entomologist, v.91, n.4, p.523-530.

CARRIÈRE, Y. et al. 2003. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. Proc Natl Acad Sci U S A 100:1519–1523.

CASELA, C.R, A.S. FERREIRA & N.F.J.A. PINTO. 2018. Doenças na Cultura do Milho . Sete Lagoas, MG: Embrapa, 14 p.

CÉLERES. 3º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/17. Informativo Biotecnologia.

CLIMATE-DATA.ORG. CLIMA. 2023. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/location/852/>>.

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). 2020. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12818.>>.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2023. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Safra 2018/2019.

CRUZ, I. 1995. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EmbrapaCNPMS. 45 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 21).

EGHRARI, K. 2019. 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.

FANCELLI, A.L. 2002. Ecofisiologia e fenologia. (CAD - Cursos de Atualização à Distância. Tecnologia da produção de milho. Modulo1. Piracicaba: Aldeia Norte, p.51.

FARIAS, J.R. et al. 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, v. 64, p. 150–158.

FARIAS, P.R.S., J.C. BARBOSA & A.C. BUSOLI. 2001. Amostragem sequencial com base na lei de Taylor para levantamento de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho. *Scientia Agrícola*. v.58, n.2 . p. 7- 19.

FORNASIERI FILHO, D. 2007. Manual da Cultura do Milho. Funep, Jaboticabal SP, 576p.

GALINAT, W.C., B.Y. LIN. 1988. Baby corn: production in Taiwan and future outlook for production in the United States. *Economic Botany*, New York, v. 42, n. 1, p. 132-134, Jan./Mar.

GALLO, D., O. NAKANO, S. SILVEIRA NETO, R.P.L. CARVALHO, G.C. BAPTISTA, E. BERTI FILHO, J.R.P. PARRA, R.A. ZUCCHI, S.B. ALVES & J.D. GOULD. 1998. Sustainability of Transgenic Insecticidal Cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. *Annual Review of Entomology*, v. 43, n. 1, p. 701–726.

GUADAGNUOLO, R., J. CLEGG & C. ELLSTRAND. 2006. Relative fitness of transgenic vs. non-transgenic maize x teosinte hybrids: a field evaluation. *Ecological Applications*, v. 16, n. 5, p. 1967-1974.

HEAD, G.P. & J. GREENPLATE. 2012. The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. *GM Crops & Food*, v. 3, n. 3, p. 144–153.

HOOD, E.E. et al. 2012. Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation. *Plant Biotechnology Journal*, v. 10, n. 1, p. 20–30.

HORIKOSHI, R.J. et al. 2016. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. Scientific reports, v. 6, p. 34864.

HUANG, F., D.A. ANDOW & L.L. BUSCHMAN. 2011. 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.

HUANG, F. et al. 2014. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. PLoS ONE, v.9, n.11, p. e112958.

International Service for the Acquisition of Agri-Biothec Applications – ISAAA. 2019. Brief 46: Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2019.

JAMES, V.A. et al. 2002. 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.

MIGUEL, F.B., M.S.T. ESPERANCINI & R.K. GRIZOTTO. 2014. Rentabilidade e risco da produção de milho safrinha geneticamente modificado e convencional na Região de Guaíra/SP. Energia na Agricultura, v. 29, n. 1, p. 64.

MOAR, W.J. & K.J. ANIKUMAR. 2007. PLANT SCIENCE: The Power of the Pyramid. Science, v. 318, n. 5856, p. 1561–1562.

MORAES, K.E. 2017. 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.

NIU, Y. et al. 2014. Larval survival and plant injury of Cry1F-susceptible, -resistant, and -heterozygous fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt corn containing single or pyramided genes. Crop Protection, v. 59, p. 22–28.

OLIVEIRA E., J.M. WAQUIL & N.F.J.A. PINTO. 2015. 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.

OMOTO, C., O. BERNARDI, E. SALMERON, R.J. SORGATTO, P.M. DOURADO, A. CRIVELLARI, R.A. CARVALHO, A. WILLSE, S. MARTINELLI & G.P. HEAD. 2015. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil.

ROUSH, RT. 1994. “Can we slow adaptation by pests to insect-resistant transgenic crops?”. In *Biotechnology for Integrated Pest Management*, Edited by: Persley, G. and Macintyre, R. London: CAB International

SANTOS-AMAYA, O.F. et al. 2015. 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.

SHELTON, A.M. et al. 2000. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 339–342.

SIEBERT, M.W. et al. 2012. 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.

STORER, N.P., J.B. BABCOCK, M. SCHLENZ, T. MEADE, G.D. THOMPSON, J.W. BING & R.M. HUCKABA. 2010. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. Volume 103, Pages 1031–1038.

PATERNIANI, E. & G.P VIEGAS. 1987. (Eds.). *Melhoramento e produção de milho*. Campinas: Fundação Cargill. v.1, p.217-264.

VENDRAMIM, L.C. MARCHINI, J.R.S. LOPES & C. OMOTO. 2002. *Entomologia agrícola*. Piracicaba, Fealq, 920p.

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

WAQUIL, J.M. et al. 2004. 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.