Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Monitoramento de híbridos comerciais de milho *Bt* (*Bacillus thuringiensis)* no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

Marcelo Mocheti

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2021

Marcelo Mocheti
Engenheiro Agrônomo

Monitoramento de híbridos comerciais de milho *Bt* (*Bacillus thuringiensis)* no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PEDRO TAKAO YAMAMOTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Mocheti, Marcelo

Monitoramento de híbridos comerciais de milho *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil / Marcelo Mocheti. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. Piracicaba, 2021.

64 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Zea mays* 2. Eventos transgênicos 3. *Bacillus thuringiensis* 4. Controle de *Spodptera frugiperda* I. Título

A minha família, em especial a minha mãe Sandra, meu Pai José e meu irmão Marcus, por sempre acreditarem em mim e tornarem este sonho possível.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial minha mãe Sandra Pereira da Silva, meu pai José Aparecido Mocheti e meu irmão Marcus Vinicius Mocheti, pelo amor, carinho e por sempre me apoiarem e me mostrarem os caminhos para conquistar meus objetivos.

Ao Professor Dr. Pedro Takao Yamamoto, por toda a ajuda nesses dois anos, agradecer a confiança e as oportunidades que me ofereceu. Pelo convívio, do qual pude tomar muito aprendizado.

Aos pesquisadores da Corteva, Paulo Roberto da Silva, Ademar Istchuk, Josemar Foresti pela paciência e toda ajuda possível para realização desse projeto.

Ao Dr. Professor Celso Omoto, à Doutora Mariana Regina Durigan, ao Doutorando Douglas Amado, Doutor Rogério Machado e Pós- Doutorando José Paulo Filho os quais foram meus tutores no período de estágio no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas-ESALQ/USP, pelo apoio e paciência no início do ensino sobre entomologia

Aos amigos, com quem tive o privilégio de trabalhar no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas – ESALQ/USP.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, por todo o ensinamento e oportunidades.

Aos amigos do Futebol de Campo da A.A.A.L.Q que se tornaram minha família e aos amigos que fiz durante a graduação e Pós-graduação, por todo companheirismo e dedicação nesses 7 anos de convivência.

Ao Programa de Pós-graduação da ESALQ-USP, por todo suporte e por tornar este sonho possível.

À Deus por todas as oportunidades e alegrias que vem me proporcionando.

Aos amigos da Corteva com quem tive o prazer de aprender muito tecnicamente e principalmente profissionalmente. Em especial a Milena Barreta, Cinthia Garllet, Ana Victoria, Beatriz Bonaldo e Lucas Teodoro.

Ao amigo José Bruno Malaquias, pela ajuda e paciência na execução deste trabalho.

Um agradecimento especial ao líder de pessoas Luiz Marques, por tornar possível este projeto, e a Pesquisadora Tamylin Ishizuka Kaori por toda paciência e ajuda neste período.

“A vida é sobre escolhas. Algumas que lamentamos algumas que ficamos orgulhosos. Nós somos o que escolhemos ser”.

Graham Brown

SUMÁRIO

RESUMO 7
ABSTRACT 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABELAS 11
1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Objetivo 14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 Aspectos gerais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) 15
2.2 Milho (*Zea mays* L.) 16
2.2.1 Fenologia 16
2.2.2 Produção de milho no Brasil 17
2.2.3 Plantas OGM (organismos geneticamente modificados) resistentes a insetos 18
3 MATERIAL E MÉTODOS 21
3.1 Local, época de plantio e condições climáticas 21
3.2 Híbridos avaliados 21
3.3 Plantio e manutenção dos híbridos nos ensaios 22
3.4 Avaliação 24
3.5 Análise estatística 26
4 RESULTADOS 29
4.1 Toledo-PR 29
4.2 Planaltina-DF 33
4.3 Comparação entre híbridos nas diferentes localidades 38
5 DISCUSSÃO 45
6 CONCLUSÃO 51
REFERÊNCIAS 53
ANEXOS 63

RESUMO

Monitoramento de híbridos comerciais de milho *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a praga de maior importância na cultura do milho no Brasil e outros países da América Latina. O controle deste inseto era baseado majoritariamente no uso de inseticidas sintéticos, entretanto, diversos casos de populações resistentes foram relatados, fazendo com que novas estratégias de controle fossem adotadas. A utilização de híbridos de milho com tecnologia *Bt* tem se mostrado uma tática eficaz no controle de *S. frugiperda*. Entretanto, populações da praga apresentaram resistência a algumas proteínas expressas pelos híbridos, sendo necessário incorporar novas tecnologias e avaliar o desempenho das mesmas em condições de campo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi monitorar a eficiência de híbridos de milho *Bt* no controle de *S. frugiperda* em campos experimentais nas regiões do Paraná e Distrito Federal. Foram avaliados 14 híbridos comerciais de milho (30F53, 30F35, 30F53H, 30F35H, 30F53Y, 30F35Y, 30F53YH, 30F53VYH, 30F35VYH, 2B810PW, 30A37PW, B2612PWU, DKB290PRO e DKB290PRO3), dos quais, há híbridos que expressam uma proteína, duas ou mais, e também híbridos não-*Bt*. Campos experimentais foram cultivados entre os anos de 2015 e 2018, nos municípios de Planaltina-DF e Toledo-PR, onde os cultivos foram realizados em duas épocas de plantio em cada ano (primeira safra e segunda safra). Ao atingirem o estágio V6, as plantas de milho foram avaliadas quanto aos danos gerados pelo ataque de *S. frugiperda*, e desta forma foram atribuídas notas para cada planta, de acordo com a escala Davis. Os híbridos 30F53, 30F53Y, 30F53YH e 30F53VYH também foram avaliados no estágio V8. O experimento seguiu um delineamento em blocos com parcelas casualizados, e as médias foram separadas pelo método de bootstrap (não paramétrico) em cada localidade. Com os resultados do presente experimento foi possível constatar que tecnologias com eventos que expressavam Cry1F e Cry1Ab (30F53H, 30F35H, 30F53Y, 30F35Y, 30F53YH) obtiveram danos iguais aos eventos que não expressavam nenhuma proteína (30F53 e 30F35), híbridos que expressavam Cry1A.105 e Cry2Ab2 (2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3) apresentaram danos intermediários e aqueles que expressam a proteína Vip3Aa20 (30F53VYH, 30F35VYH e B2612PWU) apresentaram melhor controle de *S. frugiperda* em condições de campo. Estes dados podem servir de subsídio para a tomada de decisão de agricultores ao escolher híbridos para plantios comerciais de milho.

Palavras-chave: *Zea mays*, Eventos transgênicos, *Bacillus thuringiensis*, Controle de *Spodoptera frugiperda*

ABSTRACT

Monitoring commercial *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) corn hybrids in the control of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is considered the most important corn pest in Brazil and other Latin American countries. Its control was relied mainly on synthetic insecticides; however, several cases of resistant populations were observed, resulting in the adoption of new control. The use of corn hybrids containing *Bt* technology has been shown to be an effective tactics in *S. frugiperda* control. However, several pest populations presented resistance to many of the proteins expressed by the hybrids, highlighting the necessity to incorporate new technologies and evaluate their performance under field conditions. Therefore, the aim of this research was to evaluate the efficiency of *Bt* corn hybrids on *S. frugiperda* in experimental fields in the states of Paraná and Distrito Federal. Fifteen commercial corn hybrids were evaluated (30F53, 30F35, 30F53H, 30F35H, 30F53Y, 30F35Y, 30F53YH, 30F35YH, 30F53VYH, 30F35VYH, 2B810PW, 30A37PW, B2612PWU, DKB290PRO e DKB290PRO3), of which there are hybrids that can express one protein, two or more, along with non-*Bt* hybrids. Experimental fields were cultivated between the years 2015 and 2018, in the municipalities of Planaltina-DF and Toledo-PR, where plantations were carried out in two planting seasons each year (summer and winter). Corn plants were evaluated for signs of *S. frugiperda* attack at the V6 stage, and scores were attributed to each plant, according to the Davis scale. The hybrids 30F53, 30F53Y, 30F53YH e 30F53VYH were also evaluated at the V8 stage. The experiment followed a randomized block design, and the means were separated by a non-parametric bootstrap method in each location. The results of the present experiment indicate that technologies with events that expressed Cry1F and Cry1Ab (30F53H, 30F35H, 30F53Y, 30F35Y, 30F53YH) obtained damages equal to the events that did not express any protein (30F53 and 30F35), hybrids that expressed Cry1A. 105 and Cry2Ab2 (2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO and DKB290PRO3) showed intermediate damage and those expressing the Vip3Aa20 protein (30F53VYH, 30F35VYH and B2612PWU) showed better control of *S. frugiperda* in field conditions. These data can serve as a subsidy for farmers' decision-making when choosing hybrids for commercial corn plantations.

Keywords: *Zea mays*, Transgenic events, *Bacillus thuringiensis*, Control of *Spodoptera frugiperda*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhes do plantio e condução dos experimentos. A. Semeadora de parcelas. B. Plantio do experimento. C. Pulverizador tratorizado. D. Pulverizador aplicando herbicida. E. Ensaio com milho em VE. F. Ensaio com milho em V5 23

Figura 2 - A. Avaliação do híbrido 30F53 em V6. B. Avaliação do híbrido 30F53H em V6. C. Avaliação do híbrido 30F53YH em V6.D. Avaliação do híbrido 30F53VYH em V6. E. Avaliação do híbrido 30F53 em V8. F. Avaliação do híbrido 30F53H em V8. G. Avaliação do híbrido 30F53YH em V8. H. Avaliação do híbrido 30F53VYH em V8..... 25

Figura 3 - Dendrograma da susceptibilidade dos híbridos de milho ao ataque de *S. frugiperda* em Toledo-PR 32

Figura 4 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Toledo-PR, de acordo com a escala Davis, considerando a média de todas as safras..... 32

Figura 5 - Dendrograma da susceptibilidade dos híbridos de milho ao ataque de *S. frugiperda* em Planaltina-DF..... 37

Figura 6 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Planaltina-DF, de acordo com a escala Davis, considerando a média de todas as safras..... 38

Figura 7 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53 (Não-*Bt*) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra..... 39

Figura 8 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53H (Cry1F) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra..... 40

Figura 9 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53YH (Cry1F × Cry1Ab) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra 40

Figura 10 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra 41

Figura 11 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Toledo-PR e Planaltina-DF, de acordo com a escala Davis, considerando a média de todas as safras 41

Figura 12 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53 (Não-*Bt*) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra..... 42

Figura 13 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53H (Cry1F) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra 43

Figura 14 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53YH (Cry1F ×Cry1Ab) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra..... 43

Figura 15 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Época de plantio contendo ano, data de plantio e colheita em Planaltina-DF* 21

Tabela 2 - Época de plantio contendo ano, data de plantio e colheita em Toledo-PR* . 21

Tabela 3 - Híbridos comerciais de milho testados, indicando os eventos transgênicos com suas proteínas *Bt* 22

Tabela 4 - Escala de notas para avaliação de injúrias causadas por *S. frugiperda* em plantas de milho (DAVIS; NC; WILLIANS, 1992)..... 26

Tabela 5 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Toledo-PR, de acordo com a escala Davis 32

Tabela 6 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Planaltina-DF, de acordo com a escala Davis 36

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o Brasil tem ganhado ênfase na atividade agrícola mundial, com destaque para a produção de grãos, na qual é líder na produção e exportação em vários segmentos (IBGE, 2020). Dentre eles, destaca-se o milho (*Zea mays* L.), cereal amplamente cultivado em diversas regiões do território nacional, utilizado tanto para alimentação humana quanto animal (ALVES; AMARAL, 2011). Com o incremento de novas tecnologias na produção dessa cultura, em um período de cerca de 20 anos, foi possível aumentar a produção de milho em 193,55%, associada a um aumento de área cultivada de 45,79% (ARTUZO et al., 2019). Dessa forma, no ano de 2019, 99,98 milhões de toneladas de milho foram colhidas no Brasil, com maiores produções registradas nos estados de Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo e Minas Gerais (CONAB, 2019). Apesar dos expressivos números relativos à produção de milho no Brasil, podem ocorrer perdas de produção em função do ataque de pragas, dentre as quais se destaca a lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

Spodoptera frugiperda é um inseto altamente polífago, podendo se alimentar de diversas espécies cultivadas, como sorgo, arroz e algodão, e é considerada a praga de maior importância na cultura do milho no Brasil e diversos países da América Latina (POGUE, 2002; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Lagartas de *S. frugiperda* podem causar danos à cultura do milho tanto em fases vegetativas quanto reprodutivas, e consequentemente significativas perdas de produção (DA ROSA; BARCELOS, 2012). O controle de *S. frugiperda* durante muitos anos foi feito majoritariamente por meio da aplicação de inseticidas sintéticos, entretanto, devido ao uso indiscriminado houve a seleção de populações resistentes à diversos inseticidas convencionais, e consequentes dificuldades no controle da praga (YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003; CARVALHO et al., 2013), o que levou a necessidade de adoção de táticas adicionais de controle.

Dentre as táticas adotadas, destaca-se o uso de híbridos geneticamente modificados. Por meio do processo de inserção de genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) em plantas cultivadas, ocorre a expressão de proteínas *Bt* com atividade inseticida em todos os tecidos da planta, causando efeitos sobre insetos que delas se alimentam (SCHNEP; WHITELEY, 1981; BABU et al., 2003). Inicialmente, era possível expressar apenas uma proteína *Bt* por híbrido, e com o tempo foi possível inserir eventos transgênicos que resultavam na expressão de duas ou mais proteínas (eventos piramidados) (CTNBio, 2007, 2009; BADRAN et al., 2016). No Brasil, o milho *Bt* tem sido amplamente utilizado em

cultivos comerciais com objetivo de controlar lepidópteros-praga, dentre os quais *S. frugiperda*, atingindo bons resultados e reduzindo a necessidade de aplicação de inseticidas (WAQUIL; VILLELA; FOSTER, 2010; CÉLERES, 2019).

Entretanto, devido à fatores como o uso sucessivo de tecnologias *Bts* que expressam as mesmas proteínas, nenhuma ou baixa adoção de áreas de refúgio, e características biológicas de *S. frugiperda*, diversos casos de populações resistentes ao milho *Bt* foram relatados no Brasil (BERNARDI et al., 2016b; MARTINELLI et al., 2017; MOSCARDINI et al., 2020). Além de resistência a proteínas do grupo "Cry", primeiro a ser inserido em plantas de milho (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016), há relatos também de populações resistentes a tecnologias mais recentes, como por exemplo a proteína Vip3Aa (AMARAL et al., 2020).

Com isto, associado ao manejo de resistência de pragas, é necessário inserir novas tecnologias *Bts* com maior eficiência no controle de *S. frugiperda*, e avaliar sua eficiência em condições de campo. Desta forma, o presente trabalho tem o intuito de avaliar o desempenho de híbridos de milho *Bt* no controle de *S. frugiperda* em diferentes regiões produtoras no Brasil.

1.1 Objetivo

Monitorar e analisar a eficácia dos principais eventos transgênicos resistentes a insetos liberados no Brasil, em híbridos de milho comerciais, no controle de *S. frugiperda*, acompanhando a primeira e segunda safra de milho no Brasil em uma série histórica de 4 anos (2015 a 2018) em duas regiões representativas na produção de milho no país (Distrito Federal e Paraná).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

Spodoptera frugiperda é um inseto originário do Hemisfério Ocidental, altamente polífago e com elevada capacidade de dispersão, sendo esta espécie considerada a principal praga na cultura do milho no Brasil (CRUZ; TURPIN, 1982; CASMUZ et al., 2010). Por apresentar o hábito de se alimentar de uma série de plantas cultivadas no país, tem ocorrência em praticamente todos os estados brasileiros. Foi inicialmente relatada em 1964 causando danos em milho, arroz e pastagens, e atualmente está presente em diferentes sistemas de cultivo, como por exemplo no sistema Santa Fé, onde há o consórcio de milho e braquiária (CRUZ; TURPIN, 1983; CONCEIÇÃO, 2019).

Nas américas, além da cultura do milho, foram relatados ataque na cultura do arroz, soja, sorgo, algodão, trigo, tomate, entre outras (MONTEZANO et al., 2018). Esta característica de ter diferentes hospedeiros contribuiu para a separação de duas linhagens geneticamente diferentes, porém, apresentando a mesma morfologia, conhecidas como raça "milho" que tem preferência por atacar milho, algodão e sorgo e raça "arroz" que apresenta preferência pela cultura de arroz e pastagens (BUSATO et al., 2004). Já, quando se analisa algodão e milho como plantas hospedeiras, não foi possível identificar nenhum agrupamento, que levasse a sugerir um agrupamento de populações de *S. frugiperda*, em um nível significativo de fluxo gênico (ARIAS et al., 2019).

Características biológicas de *S. frugiperda* podem variar de acordo com alguns fatores. Esta espécie pode apresentar de 4 e 7 instares larvais, dependo das condições climáticas como temperatura e umidade, além da planta hospedeira (PITRE; HOGG, 1983). A lagarta quando se alimentou de algodão e soja apresentou um desenvolvimento mais rápido e pupas mais leves quando comparada aquelas que se alimentaram de milho (PITRE; HOGG, 1983; BARROS; TORRES; BUENO, 2010).

O inseto tem hábito de atacar as folhas do milho, dando preferência às folhas jovens do cartucho no período vegetativo (CARVALHO, 1970; BUNTIN, 1986; YANG et al., 2018). Se a infestação da praga for nos primeiros estádios fenológicos do milho, os danos causados por *S. frugiperda* podem levar a planta à morte. Além de danos causados na fase vegetativa da cultura, a praga pode causar danos na fase reprodutiva, atacando o pendão e a espiga, gerando perdas quantitativas (redução na produção) e qualitativas (favorecimento do desenvolvimento de fungos e presença de microtoxinas nos grãos) (CRUZ; FIGUEIREDO; MATOSO, 1999; BUSATO et al., 2004).

O controle de *S. frugiperda* no Brasil e no mundo tem se tornado cada vez mais difícil, pois, há diversos relatos de populações resistentes desta espécie à grande parte dos inseticidas convencionais (DA ROSA; BARCELOS, 2012). Até mesmo para produtos lançados há poucos anos, como o inseticida clorantraniliprole, populações resistentes foram relatadas (BOLZAN et al., 2019). Por conta deste cenário, a adoção da tecnologia *Bt* no controle de *S. frugiperda* faz-se necessária, seja através da inserção de genes em plantas ou na utilização de inseticidas a base de *B. thuringiensis* (WAQUIL; VILLELA; FOSTER, 2010; GOMES et al., 2018).

A utilização comercial de plantas *Bt* tem sido umas das principais ferramentas utilizadas hoje no controle de *S. frugiperda*. Porém, as características biológicas da praga como alta fecundidade, polifagia e muitas gerações durante o ano, associado ao modo de cultivo atual, onde há o plantio subsequente de culturas, muitas vezes expressando as mesmas proteínas *Bt,* faz com que tenhamos um cenário favorável para evolução de casos de resistência (BERNARDI et al., 2016a).

Em âmbito nacional, casos de populações de *S. frugiperda* resistentes a tecnologias de milho *Bt* foram relatados para as proteínas Cry1F, Cry1Ab e Vip3Aa (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016; AMARAL et al., 2020). Com isso, é fundamental o uso das estratégias de Manejo de Resistência de Insetos - MRI, além do monitoramento das biotecnologias, a fim de prolongar a vida útil dessas tecnologias no campo e retardar a seleção de populações resistentes.

2.2 Milho (*Zea mays* L.)

2.2.1 Fenologia

O milho é uma planta que pertence à família Poaceae, do gênero *Zea* e espécie *Zea* mays L, tem como características o colmo ereto e as folhas do tipo completa (limbo, pecíolo e bainha). Os híbridos de milho que são utilizados no Brasil e no mundo, tem origem do cruzamento de linhagens, que irão dar híbridos mais vigorosos (Heterose) e com as características desejadas para cada região. Suas sementes são do tipo cariopse, sendo divididas em: Pericarpo – que tem origem na parede do ovário; Endosperma – este representa a maior parte do grão de milho, e Embrião nesta parte não a reservas e sim o primórdio de todos os órgãos que irão dar origem a uma nova planta (MAGALHÃES et al., 2002; SANTOS, 2019).

A raiz por sua vez é fasciculada, e pode atingir mais de um metro de profundidade, dependendo das características do híbrido e do solo presente na região. A radícula da origem

a raiz primaria, esta por sua vez cresce no solo verticalmente até dar origem as raízes secundárias. Quando o milho apresenta maior desenvolvimento fisiológico há o surgimento das raízes adventícias, que terão papel fundamental na estruturação da planta, auxiliando também em sua fixação no solo. Seu colmo ereto, pode ultrapassar os 2 metros de altura, é raro o aparecimento de ramificações, sua função está relacionada em acumular reservas, em forma de sacarose, e promover a movimentação de nutrientes e água, através dos vasos (xilema e floema) do solo as partes que necessitam (MAGALHÃES; DURÃES; GOMID, 1996; BARROS; CALADO, 2014).

As folhas, como mencionado anteriormente, são completas e dispostas na planta de forma alternada. O comprimento destas folhas é superior a largura, gerando um formado que lembra uma lança, por isso o nome de folha lanceolada. Sua inflorescência apresenta separação, sendo a parte masculina agrupada em panícula, situada na parte superior da planta e a inflorescência feminina é designada de espiga, constituída por um eixo onde se dispõe os alvéolos e as espiguetas aos pares. Por a planta de milho apresentar a parte masculina antes da parte feminina a mesma e definida como protândrica (MAGALHÃES, 2006; LOPES, 2016).

A flor masculina é composta por três estames que tem a capacidade de produzir pólen por até oito dias. A inflorescência feminina é formada por um eixo onde ficam os alvéolos e as espiguetas. Assim cada espigueta é formada por duas flores, uma fértil e uma estéril e cada flor possui um estilo-estigma (BARROS; CALADO, 2014; CRUZ et al., 2018).

2.2.2 Produção de milho no Brasil

O milho é uma das culturas mais semeadas no mundo, como aponta o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA, com a produção estimada para a safra 2020/21 de 1.134,05 milhão de toneladas (USDA, 2020). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (IBGE, 2020), apontam que de 1990 a 2015, houve um aumento superior a 30% na área plantada de milho no país, o órgão ainda prevê uma safra recorde em 2021, com 262,2 milhões de toneladas de milho colhidas. Esses números mostram a importância da ciência associada a agriculta nos últimos anos, através do acréscimo de produtividade, ano após ano. A escolha de híbridos mais produtivos, com uma melhor carga genética e muitas vezes contando com tecnológicas inseridas, como por exemplo plantas Bt, faz com que a perspectiva seja sempre de crescimento e melhor retorno financeiro (CIB, 2019).

No decorrer dos últimos anos, houve mudanças nos principais produtores nacionais de milho. No início dos anos 90, as regiões Sul e Sudeste representavam mais de 60% da área

plantada de milho no país e contribuíam com mais de 75% da produção nacional. Em 2015, a região Centro Oeste passou a ser a mais importante para a cultura, plantando mais de 40% da área total de milho e contribuindo com cerca de 47% da produção nacional (IBGE, 2020). Em levantamento feito pela Conab, referente a safra 2020/2021, a área planta de milho foi 19.495,2 milhões de hectares com produtividade média de 5629 kg/ha e produção total de 108.068,7 milhões de toneladas (CONAB, 2021)

Como o milho é uma cultura de proporções mundiais, há uma enorme diversidade de condições climáticas e técnicas para o seu plantio, neste cenário a campos de produção de subsistência (pequenas áreas e com baixa adoção de tecnologia) até campos de produção extensiva (grandes áreas e com alta adoção de tecnologia), alguns autores dividem estes ambientes de produção de milho, levando em conta a adoção de tecnológicas. Segundo Coelho, Cruz e Pereira-filho (2004), essas classes tecnológicas se dividem em: marginal; baixa; média; e de alta tecnologia. Já Sangoi et al. (2002) propôs uma divisão em três níveis tecnológicos, de acordo com a produtividade da cultura. Com a classificação dos ambientes de produção em níveis tecnológicos torna-se mais prático adotar estratégias de cultivo que otimizem os investimentos e maximizem as produtividades (PADILHA, 2014).

Os fatores tecnológicos utilizados para a separação destes grupos citados a cima, podem ser divididos em dois grupos: fatores que influenciam a produtividade de forma direta (ex. potencial produtivo presente no híbrido de milho), e os fatores que podem influenciar na perca de produtividade (ex. insetos, plantas daninhas e doenças) (COELHO; CRUZ; PEREIRA-FILHO, 2004). Fatores que influenciam a produtividade de forma direta são o que darão um teto produtivo a ser alcançado e estão ligados ao melhoramento genético, ao posicionamento adequado da semeadura na janela de plantio e região de semeadura. Já os fatores ligados a perda de produtividade, como insetos praga, são responsáveis por a planta não atingir seu teto produtivo, sendo necessário medidas para mitigar este dano, como utilização de inseticidas ou plantas *Bt* (CRUZ; FIGUEIREDO; MATOSO, 1999).

2.2.3 Plantas OGM (organismos geneticamente modificados) resistentes a insetos

Com a utilização de engenharia genética, se tornou possível a introdução de genes que codificam proteínas inseticidas no genoma das plantas, possibilitando a expressão contínua dessas proteínas no tecido vegetal, atingindo assim os insetos-alvos que se alimentam dessas plantas (SCHNEP; WHITELEY, 1981). Como um dos principais exemplos na agricultura atual, temos a utilização de genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner

(*Bt*), que codificam proteínas capazes de intoxicar os insetos revelando novas perspectivas de uso desta tecnologia no controle de pragas (BABU et al., 2003).

Por conta de dificuldade mostrada no processo de inserção destes genes em plantas, as primeiras plantas *Bt* foram obtidas apenas em 1987 por meio da inserção do gene Cry, em plantas de tomate e tabaco (FISCHHOFF, 1987). Após esse período, várias outras proteínas Cry foram inseridas em diversas culturas, tais como soja, milho e algodão, auxiliando no controle de diversas pragas, na agricultura mundial (HOMRICH et al., 2008).

As proteínas *Bt* possuem um modo de ação único, levando os insetos a morte através de um processo complexo. As proteínas são ativadas no pH básico do mesêntero de lepidópteros, por meio de proteases específicas, e se acoplam às microvilosidades apicais das membranas das células, causando a formação de poros e lise das células epiteliais do mesêntero (GILL; COWLES; PIETRATONIO, 1992). Com isso, ocorre o rompimento do epitélio do mesêntero do inseto, liberando o conteúdo celular de seu interior, fornecendo aos esporos um meio favorável a esporulação, o que leva a uma infecção generalizada levando a morte por septicemia (BRAVO et al., 2007).

Um processo semelhante ao descrito, ocorre quando as proteínas *Bt* são expressas em plantas, entretanto neste caso as plantas transgênicas codificam a expressão de proteínas na forma ativa e solúvel, de forma que o único fator de especificidade é a presença de receptores na membrana do mesêntero (STOTZKY, 2000). As proteínas quando ativas se ligam a receptores na membrana do mesêntero dos insetos suscetíveis, inserindo-se na membrana apical e formando poros (JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017).

As plantas *Bt* são de fundamental importância na implementação de programas de manejo integrado de pragas (MIP) em diversas culturas, devido as proteínas com ação inseticidas estarem presentes durante todo o ciclo todo da planta, promovendo controle eficiente. Os eventos transgênicos inseridos nas plantas podem resultar na expressão de proteínas isoladas ou associadas, no caso da expressão de duas ou mais proteínas (neste caso chamados de eventos piramidados) (BABU et al., 2003; BADRAN et al., 2016).

As primeiras plantas de milho *Bt* expressavam uma única proteína em seus tecidos (CTNBio, 2007, 2008). Em 2009, ocorreu o registro e liberação de cultivos de milho comerciais *Bt* que expressam mais de uma proteína, consideradas “piramidadas”, como por exemplo o milho MON 89034 YieldGard VT PRO™ (Cry1A.105/Cry2Ab2), MON 89034 x TC 1507 PowerCore™ (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F); MIR 162 + Bt 11 (Cry1Ab/Vip3Aa20),

TC1507 + MON 810 (Cry1F/Cry1Ab) (CTNBIO, 2009; CTNBIO, 2010; BERNARDI et al., 2016a).

Dentre as plantas geneticamente modificadas mais recentes, pode-se citar como exemplo, a soja Conkesta™, que por sua vez, possui inserido os genes que expressam as proteínas inseticidas Cry1AC e Cry1F (Corteva AgriSciences, LLC, Indianapolis, IN). Tal biotecnologia apresenta alta eficácia no controle das espécies *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae), *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) *Chloridea virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (MARQUES et al., 2017). Pode-se citar também o milho PowerCore Ultra™, que expressa as proteínas Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2 e Vip3Aa20, apresentando bom controle para *S. frugiperda* nas fases iniciais da cultura (MOSCARDINI et al., 2020).

Atualmente, é cultivado no Brasil aproximadamente 50 milhões de hectares de com culturas transgênicas, levando em conta nesta estimativa as culturas de soja, milho e algodão. Com isso, o país ocupa a segunda colocação no ranking de países que mais utilizam esta tecnologia na proteção de suas lavouras. Atualmente, os eventos *Bt*, estão distribuídos da seguinte forma: 92,3% para soja; 86,7% para milho segunda safra (segunda safra); 74,7% para milho primeira safra e supera os 90% para o algodão (CÉLERES, 2019).

Espera-se que essas biotecnologias resistentes a insetos reduzam as perdas nas lavouras nos próximos anos, gerando aumento de produção, redução nas aplicações de inseticidas e maiores lucros para os produtores (CIB, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, época de plantio e condições climáticas

Os plantios foram realizados durante 4 anos, de 2015 a 2018, nos municípios de Toledo-PR (Tabela 1) e Planaltina-DF (Tabela 2). Em cada ano foram feitos plantios em duas safras (primeira safra e segunda safra de milho), quando a semeadura foi possível. No total, sete safras foram avaliadas em cada localidade, com início na segunda safra de 2015 e conclusão na segunda safra de 2018.

Tabela 1 - Época de plantio contendo ano, data de plantio e colheita em Planaltina-DF*.

Safra/ano	Plantio	Colheita
2° Safra 2015	28-Jan-15	27-Mai-15
1° Safra 2015/16	26-Nov-15	28-Mar-16
2° Safra 2016	18-Jan-16	6-Mai-16
1° Safra 2016/17	2-Dez-16	25-Mar-17
2° Safra 2017	18-Jan-17	19-Mai-17
1° Safra 2017/18	23-Nov-17	8-Mar-18
2° Safra 2018	13-Mar-18	10-Jul-18

(*) Coordenadas da estação experimental de Planaltina: 15°43'30" S e 47°36'32" W.

Tabela 2 - Época de plantio contendo ano, data de plantio e colheita em Toledo-PR*.

Safra/ano	Plantio	Colheita
2° Safra 2015	5-Jan-15	1-Jul-15
1° Safra 2015/16	22-Set-15	23-Fev-16
2° Safra 2016	8-Fev-16	21-Jul-16
1° Safra 2016/17	9-Set-16	23-Jan-17
2° Safra 2017	27-Jan-17	10-Mai-17
1° Safra 2017/18	5-Out-17	31-Jan-18
2° Safra 2018	23-Fev-18	20-Jul-18

(*) Coordenadas da estação experimental de Toledo: 24°40'23" S 53°45'28" W.

3.2 Híbridos avaliados

Os híbridos comerciais avaliados estão apresentados na Tabela 3, seguidos dos eventos transgênicos incorporados e proteínas *Bt* que são expressas por cada híbrido. Dentre os tratamentos, foram avaliados híbridos não *Bt*, híbridos que expressam proteínas isoladas, bem como eventos piramidados. Há híbridos que expressam o mesmo evento, como 30F53VYH e 30F35VYH, o que muda neste caso, seria o germoplasma em que o evento está inserido, estes híbridos apresentam características diferentes quanto a suscetibilidade a doenças, graus de maturação etc.

Tabela 3 - Híbridos comerciais de milho testados, indicando os eventos transgênicos com suas proteínas *Bt.*

Híbrido	Eventos transgênicos	Proteínas *Bt*
30F53	-	-
30F35	-	-
30F53H	DAS-Ø15Ø7-1	Cry1F
30F35H	DAS-Ø15Ø7-1	Cry1F
30F53Y	MON-89Ø34-3	Cry1Ab
30F35Y	MON-89Ø34-3	Cry1Ab
30F53YH	MON-ØØ81Ø-6 × DAS-Ø15Ø7-1	Cry1F × Cry1Ab
30F53VYH	DAS-Ø15Ø7-1 × MON-ØØ810-6 × SYN-IR162-4 × MON-ØØ6Ø3-6	VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F
30F35VYH	DAS-Ø15Ø7-1 × MON-ØØ810-6 × SYN-IR162-4 × MON-ØØ6Ø3-6	VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F
2B810PW	MON-89Ø34-3 × DAS-Ø15Ø7-1 × MON-ØØ6Ø3-6	Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F
30A37PW	MON-89Ø34-3 × DAS-Ø15Ø7-1 × MON-ØØ6Ø3-6	Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F
B2612PWU	MON-89Ø34-3 × DAS-Ø15Ø7-1 × MON-ØØ6Ø3-6 × SYN-IR162-4	VIP3Aa20 × Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F
DKB290PRO	MON-89Ø34-3	Cry1A.105/Cry2Ab2
DKB290PRO3	MON-89Ø34-3 × MON-88Ø17	Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry3Bb1

3.3 Plantio e manutenção dos híbridos nos ensaios

O plantio nos experimentos foi feito com o auxílio de uma semeadora de parcelas experimentais com 4 linhas, garantindo que os materiais não fossem misturados durante o plantio (Figura 1), quando não foi possível o plantio foi feito de forma manual. As sementes foram alocadas com 3 cm de profundidade, com densidade de semeadura de 4 sementes por metro linear com um espaçamento entre linhas de 0,5 m. As parcelas continham 4 linhas de 5 metros (4,2 de parcela útil e 0,8 de corredor|), totalizando 67 plantas na parcela, sendo o experimento conduzido em delineamento em blocos com parcelas casualizadas. Para o

controle de plantas daninhas utilizou-se os herbicidas Callisto® (mesotrione) + Proof® (atrazina), ambos utilizados na dose recomendada pela bula para a cultura do milho, visando o controle pré e pós emergente de plantas daninhas com folhas largas e estreitas. Para as adubações de cobertura foi utilizado o adubo com a formulação 20-00-20, na dose de 150 Kg/ha, esta adubação era feita quando o milho estava por volta de duas semanas após o plantio, garantindo melhor crescimento da lavoura e seguindo os protocolos utilizados pelos produtores.

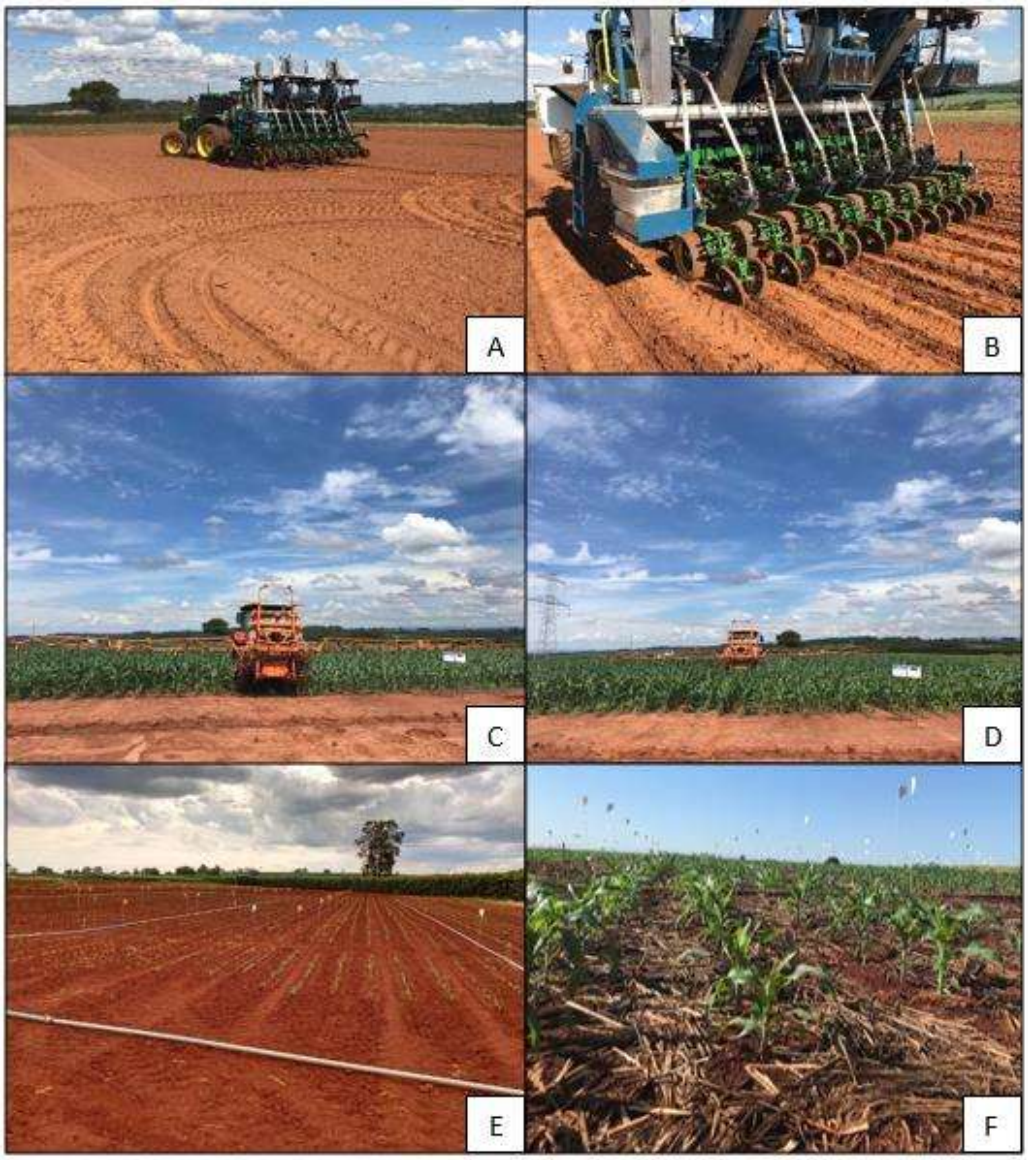

Figura 1 - Detalhes do plantio e condução dos experimentos. A. Semeadora de parcelas. B. Plantio do experimento. C. Pulverizador tratorizado. D. Pulverizador aplicando herbicida. E. Ensaio com milho em VE. F. Ensaio com milho em V5

3.4 Avaliação

A avaliação foi feita por meio da análise dos danos causados por *S. frugiperda* em 18 plantas de milho das duas linhas centrais, desprezando um metro nos extremos de cada parcela. Foi analisada a desfolha causada por *S. frugiperda* em plantas no estágio V6, e para isso, foi utilizada a escala Davis como referência (DAVIS; NC; WILLIANS, 1992) (Figura 2). Para os quatro híbridos 30F53, 30F53H, 30F53YH e 30F53VYH, também foi avaliado o dano causado por *S. frugiperda* no estágio V8 (Apenas na segunda safra de 2015 em Toledo-PR, não foi possível esta avaliação em V8). O dano observado foi comparado com descrições da escala de notas (Tabela 4), e desta forma foi atribuído um valor para cada planta de acordo com os danos.

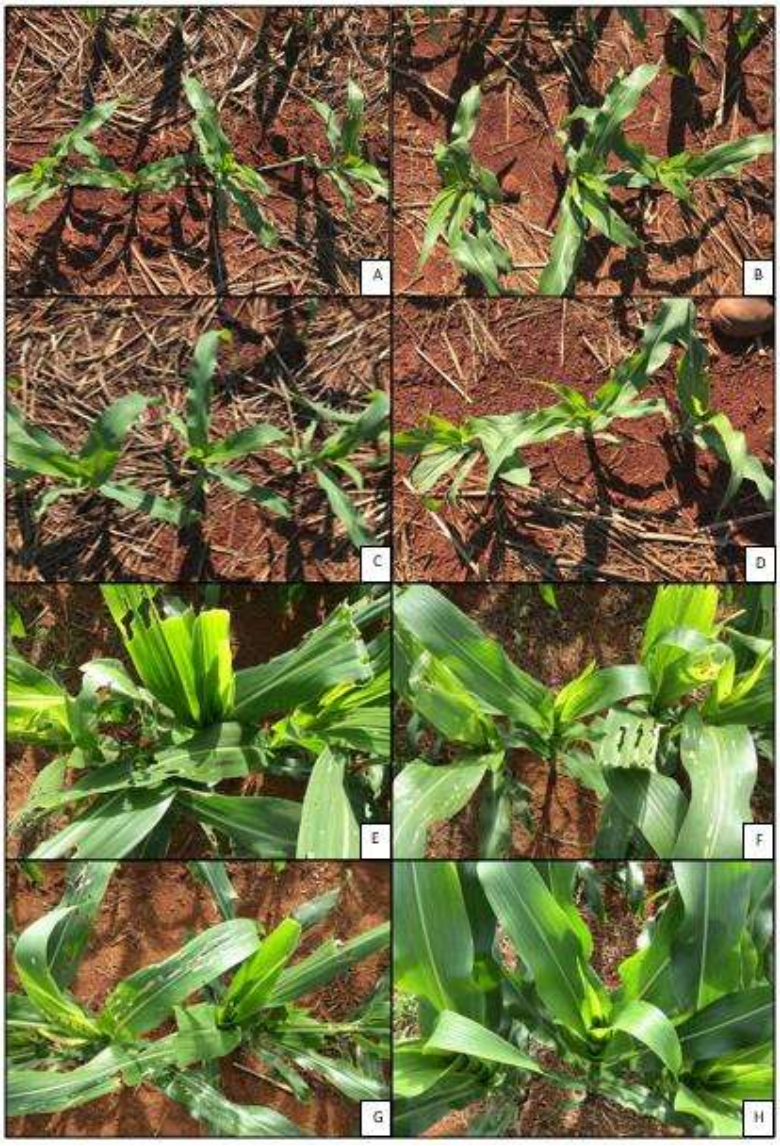

Figura 2 - **A.** Avaliação do híbrido 30F53 em V6. **B.** Avaliação do híbrido 30F53H em V6. **C.** Avaliação do híbrido 30F53YH em V6.**D.** Avaliação do híbrido 30F53VYH em V6. **E.** Avaliação do híbrido 30F53 em V8. **F.** Avaliação do híbrido 30F53H em V8. **G.** Avaliação do híbrido 30F53YH em V8. **H.** Avaliação do híbrido 30F53VYH em V8.

Tabela 4 - Escala de notas para avaliação de injúrias causadas por *S. frugiperda* em plantas de milho (DAVIS; NC; WILLIANS, 1992).

Valor da nota	Descrição das injúrias
0	Planta sem injúria
1	Planta com pontuações
2	Planta com pontuações, 1 a 3 lesões circulares pequenas (até 1,5 cm)
3	Planta com 1 a 5 lesões circulares pequenas (até 1,5 cm) + 1 a 3 lesões alongadas (maiores que 1,5 cm e menores que 3 cm) + pequenos furos circulares (até 0,5 cm)
4	Planta com 1 a 3 lesões alongadas grandes (maiores que 3 cm) em 1 a 2 folhas + 1 a 5 furos (até 1,5 cm)
5	Planta com 1 a 3 lesões alongadas grandes (maiores que 3 cm) em 1 a 2 folhas + 1 a 5 furos (até 1,5 cm)
6	Planta com 1 a 3 lesões alongadas grandes (maiores que 3 cm) em 2 ou mais folhas + 1 a 3 furos grandes (maiores que 1,5 cm) em 2 ou mais folhas
7	Planta com 3 a 5 lesões alongadas grandes (maiores que 3,5 cm) em 2 ou mais folhas + 3 a 5 furos grandes (maiores que 1,5 cm) em 2 ou mais folhas
8	Planta com muitas lesões alongadas (mais de 5) de todos os tamanhos na maioria das folhas + muitos furos médios a grandes (mais de 5 e maiores que 3 cm) em muitas folhas
9	Planta totalmente destruída

3.5 Análise estatística

As notas de dano dos genótipos em cada safra foram contrastadas por meio de comparação entre os genótipos em cada safra e entre as safras para cada genótipo. Foram

estimados intervalos de confiança com 95% de probabilidade, gerados com a técnica não-paramétrica de amostragem e re-amostragem bootstrap, com 10.000 pseudo-replicações, sendo as notas de dano re-amostradas em cada tratamento com o pacote “boot” (CANTY; RIPLEY, 2019). Os dendrogramas foram obtidos com base nas matrizes de distâncias, e os agrupamentos foram calculados pelo método estatístico de Ward. O método permitiu comparar as notas mais próximas ou mais distantes entre os genótipos, dentro de cada localidade. Para a comparação visual entre os dendrogramas de cada local foi empregada a função “tanglegram” do pacote “dendextend” (GALILI, 2015). A comparação das notas de dano do mesmo híbrido entre diferentes localidades foi feita por meio de análise com regressão não-paramétrica do tipo polinomial local, utilizando o método loess, função parametric= false no pacote “ggplot2” (WICKHAM, 2016). A comparação dos tratamentos foi dada conforme a sobreposição das regiões de confiança (α = 95%). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico R (R CORE TEAM, 2020).

4 RESULTADOS

4.1 Toledo-PR

Quando comparado os eventos nas safras, na segunda safra 2015, os híbridos 30F53 (Não-*Bt*), 30F35 (Não-*Bt*), 30F35H (Cry1F), 30F53YH (Cry1F × Cry1Ab) e DKB290PRO (Cry1A.105/Cry2Ab2) apresentaram os maiores valores na escala de Davis, portanto, apresentaram maior susceptibilidade à *S. frugiperda*, seguidos por 30F53H (Cry1F), e os menores valores foram observados para os híbridos 30F53H (Cry1F), 2B810PW (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F), 30A37PW (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F) e DKB290PRO3 (Tabela 5).

Na primeira safra 2015/16, os híbridos 30F53, 30F35, 30F53H, 30F35H, 30F53Y (Cry1Ab), 30F35Y (Cry1Ab) e 30F53YH foram os mais susceptíveis a *S. frugiperda*, seguido pelos híbridos 2B810PW, 30A37PW e DKB290PRO. Os híbridos 30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F) e 30F35VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F), apresentaram os menores valores, portanto, maior resistência à praga (Tabela 5). Na segunda safra 2016, os híbridos 30F53Y e 30F53 apresentaram os maiores valores na escala Davis, seguidos por 30F35, 30F53H, 30F35H, 30F53Y e 30F53YH (30F53 não diferiu dos tratamentos mencionados) (Tabela 5). Em seguida, 2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3, e por fim os menores valores foram observados mais uma vez para 30F53VYH e 30F35VYH.

Na primeira safra de 2016/17, 30F53 e 30F35 apresentaram maiores danos, seguidos por 30F53H, 30F35H, 30F35Y e 30F53YH (30F35 não diferiu dos tratamentos mencionados). Seguindo, tem-se o híbrido 30F53Y, seguido por 30A37PW e mais adiante 2B810PW, DKB290PRO e DKB290PRO3. Mais uma vez, 30F53VYH e 30F35VYH apresentaram os menores valores. Na segunda safra de 2017, os maiores valores da escala foram observados para 30F53, 30F35, 30F53H e 30F53Y, seguidos de 30F35Y e 30F53YH, sendo que este último foi similar a 30F35H (Tabela 5). Em seguida, 2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3. Novamente, 30F53VYH e 30F35VYH apresentaram os menores valores.

Na primeira safra de 2017/18, 30F53 e 30F35Y tiveram os maiores valores. Em seguida, 30F35, 30F53H, 30F35H e 30F53Y (esses tratamentos foram similares a 30F35Y, e, também, 30F53YH). Apresentando menores valores na escala Davis, que os citados anteriormente, temos os híbridos DKB290PRO, DKB290PRO3 e 2B810PW, sendo as duas últimas similares a 30A37PW. Novamente, 30F53VYH e 30F35VYH apresentaram os menores valores. Na segunda safra de 2018, os maiores valores da escala Davis foram observados para 30F53H e 30F35Y, sendo que o último híbrido foi similar a 30F35, 30F53Y

e 30F53YH (Tabela 5). Em seguida os híbridos 30F53, 30F35H e 30A37PW (que não diferiram estatisticamente de 30F53Y e 30F53YH), seguidos por 2B810PW, DKB290PRO e DKB290PRO3 (que não diferiram estatisticamente de 30A37PW). Os menores valores foram observados para B2612PWU (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F) e mais uma vez para 30F53VYH e 30F35VYH.

Quando comparamos os eventos entre as safras (primeira e segunda safra), nos diferentes anos, temos:

30F53 (Não-*Bt*): O maior valor de injúria pela escala Davis foi observado na primeira safra de 2016/17, seguido das segundas safras de 2015 e 2017, e pelas primeiras safras de 2015/16 e 2017/18, respectivamente. Em seguida, a segunda safra de 2018, e por fim os menores valores foram observados na segunda safra de 2016.

30F35 (Não-*Bt*): Os valores observados para 30F35 foram muito similares a 30F53, sendo a única diferença que maiores danos foram observados na primeira safra de 2017/18 em comparação com a segunda safra de 2018.

30F53H (Cry1F): Os maiores danos foram observados na primeira safra de 2016/17 e segunda safras de 2017 e 2018. Em seguida, a primeira safra de 2015/16 (que não diferiu da segunda safra de 2018), e depois a segunda safra de 2017. Os menores valores foram observados nas segundas safras de 2015 e 2016, sendo os menores valores na segunda safra de 2016.

30F35H (Cry1F): os maiores valores foram observados na primeira safra de 2016/17 e na segunda safra de 2015, sendo este último similar à primeira safra de 2015/16. Em seguida, por ordem de maior para menor dano, a segunda safra de 2017, primeira safra de 2017, segunda safra de 2018 e segunda safra de 2016 (todas as safras diferiram estatisticamente entre si).

30F53Y (Cry1Ab): os maiores danos foram observados na segunda safra de 2017, seguido pelas primeiras safras de 2015/16 e 2016/17. Menores danos foram observados na primeira safra de 2017/18 e segunda safra de 2018, e os melhores resultados foram observados na segunda safra de 2016.

30F35Y (Cry1Ab): na primeira safra de 2016/17 os maiores danos foram observados, seguidos das segundas safras de 2017 e 2018 e primeira safra de 2015/16. Em seguida, a primeira safra de 2017/18, e os menores valores foram observados para a segunda safra de 2016.

30F53YH (Cry1F × Cry1Ab): maiores valores foram observados nas primeiras safras de 2015/16 e 2016/17 e nas segunda safras de 2015 e 2017. Em seguida, primeira safra de

2017/18 e segunda safra de 2018, e os menores valores foram observados na segunda safra de 2016.

30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F): os maiores valores foram observados na segunda safra de 2017 e nas primeiras safras de 2015/16 e 2017/18, sendo que os dois últimos foram similares ao demais períodos avaliados.

30F35VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F): os maiores valores foram observados nas primeiras safras de 2015/16 e 2017/18 e segundas safras de 2017 e 2018, sendo que os valores observados na primeira safra de 2015/16 e segunda safra de 2018 foram similares aos demais períodos avaliados.

2B810PW (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F): o maior valor foi observado na segunda safra de 2017, seguido da primeira safra 2015/16 e segunda safra de 2015. Em seguida, valores menores foram observados para a primeira safra de 2017/18 e segunda safras de 2016 e 2018, e o menor valor foi observado para a segunda safra 2016.

30A37PW (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F): o maior valor foi observado na segunda safra de 2017, seguido das primeiras safras de 2015/16 e 2016/17 e segunda safras de 2015 e 2018. Em seguida, a primeira safra de 2017/18, e o menor valor foi observado para a segunda safra de 2016.

B2612PWU (VIP3Aa20 × Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F): No caso deste híbrido, como o mesmo foi plantado apenas em 2018, não a comparação com as outras safras. Porém ele apresentou eficácia semelhante ao 30F53VYH e 30F35VYH.

DKB290PRO (Cry1A.105/Cry2Ab2): os maiores valores foram observados nas segunda safras de 2015 e 2017, seguido da primeira safra de 2015/16. Em seguida, valores menores foram observados para a primeira safra de 2017/18 e segunda safras de 2016 e 2018, e o menor valor foi observado para a segunda safra 2016.

DKB290PRO3 (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry3Bb1): os maiores valores foram observados nas segunda safras de 2015 e 2017, seguido das primeiras safras de 2015/16, 2016/17 e 2017/18 e segunda safra de 2018, e o menor valor foi observado para a segunda safra de 2016.

Tabela 5 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Toledo-PR, de acordo com a escala Davis.

Evento	Segunda safra | 2015			Primeira safra | 2015/16			Segunda safra | 2016			Primeira safra | 2016/17			Segunda safra | 2017			Primeira safra | 2017/18			Segunda safra | 2018		
30F53	2,56 (2,38 - 2,75)	a	B	2,04 (1,89 - 2,19)	a	C	0,80 (0,67 - 0,94)	a	E	3,38 (3,15 - 3,62)	a	A	2,46 (2,25 - 2,67)	ab	B	1,93 (1,80 - 2,05)	a	C	1,24 (1,03 - 1,47)	c	D
30F35	2,38 (2,20 - 2,55)	a	B	2,01 (1,85 - 2,17)	a	C	0,51 (0,38 - 0,63)	b	E	2,97 (2,77 - 3,17)	a b	A	2,53 (2,36 - 2,70)	a	B	1,56 (1,38 - 1,75)	bc	D	1,76 (1,48 - 2,05)	b	C
30F53H	1,87 (1,73 - 2,01)	b	D	2,26 (2,08 - 2,43)	a	B	0,17 (0,09 - 0,25)	c	E	2,67 (2,49 - 2,85)	b	A	2,61 (2,41 - 2,81)	a	A	1,40 (1,24 - 1,56)	bc	C	2,36 (2,06 - 2,66)	a	A B
30F35H	2,40 (2,20 - 2,61)	a	AB	2,20 (2,08 - 2,33)	a	B	0,37 (0,25 - 0,50)	b	F	2,69 (2,51 - 2,88)	b	A	1,91 (1,79 - 2,04)	c	C	1,49 (1,33 - 1,66)	bc	D	1,01 (0,82 - 1,21)	c	E
30F53Y	-	-	-	2,21 (2,04 - 2,38)	a	B	0,37 (0,26 - 0,49)	b	D	2,08 (1,93 - 2,24)	c	B	2,58 (2,42 - 2,75)	a	A	1,35 (1,17 - 1,53)	bc	C	1,41 (1,14 - 1,69)	bc	C
30F35Y	-	-	-	2,24 (2,09 - 2,38)	a	B	0,53 (0,37 - 0,69)	ab	D	2,72 (2,53 - 2,92)	b	A	2,23 (2,12 - 2,34)	b	B	1,72 (1,52 - 1,92)	ab	C	2,05 (1,76 - 2,34)	ab	B
30F53YH	2,31 (2,20-2,43)	a	A	2,18 (2,05 - 2,30)	a	A	0,35 (0,24 - 0,45)	b	C	2,47 (2,30 - 2,64)	b	A	2,12 (1,94 - 2,31)	bc	A	1,34 (1,19 - 1,49)	c	B	1,54 (1,25 - 1,84)	bc	B
30F53VYH	-	-	-	0,13 (0,06 - 0,20)	d	AB	0,02 (0,00 - 0,05)	d	B	0,07 (0,03 - 0,11)	f	B	0,18 (0,11 - 0,25)	e	A	0,13 (0,07 - 0,20)	f	AB	0,04 (0,01 - 0,07)	e	B
30F35VYH	-	-	-	0,19 (0,12 - 0,27)	d	AB	0,02 (0,00 - 0,05)	d	B	0,07 (0,03 - 0,10)	f	B	0,18 (0,12 - 0,24)	e	A	0,19 (0,11 - 0,26)	f	A	0,08 (0,03 - 0,13)	e	A B
2B810PW	1,12 (1,05-1,22)	c	B	0,94 (0,80 - 1,07)	b	B	0,18 (0,12 - 0,25)	c	D	0,56 (0,46 - 0,67)	e	C	1,38 (1,25 - 1,52)	d	A	0,44 (0,34 - 0,55)	de	C	0,46 (0,32 - 0,60)	d	C
30A37PW	1,20 (1,12-1,29)	c	B	1,00 (0,86 - 1,15)	b	B	0,06 (0,02 - 0,12)	c	D	1,06 (0,89 - 1,22)	d	B	1,43 (1,28 - 1,58)	d	A	0,33 (0,24 - 0,42)	e	C	0,83 (0,63 - 1,04)	cd	B
B2612PWU	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01 (0,00 - 0,03)	e	-
DKB290PRO	2,30 (2,08-2,54)	a	A	0,83 (0,69 - 0,97)	bc	B	0,07 (0,03 - 0,11)	c	D	0,62 (0,53 - 0,71)	e	C	1,40 (1,25 - 1,55)	d	A	0,56 (0,44 - 0,68)	d	C	0,51 (0,36 - 0,67)	d	C
DKB290PRO3	1,36 (1,26-1,45)	c	A	0,71 (0,58 - 0,84)	c	B	0,06 (0,02 - 0,12)	c	C	0,55 (0,43 - 0,68)	e	B	1,36 (1,22 - 1,49)	d	A	0,45 (0,35 - 0,55)	de	B	0,49 (0,33 - 0,64)	d	B

(*) Média e intervalos de confiança gerados por bootstrap não paramétrico com 10.000 simulações. Letras maiúsculas comparam as épocas para cada híbrido, letras minúsculas comparam os híbridos dentro de cada época de plantio.

Nota: Eventos 30F53 e 30F35 – Não *Bt*; 30F53H e 30F35H – Cry1F; 30F53Y e 30F35Y – Cry1Ab; 30F53YH – Cry1F × Cry1Ab; 30F53VYH e 30F35VYH – VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F; 2B810PW - Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F; 30A37PW - Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F; B2612PWU - VIP3Aa20 × Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F; DKB290PRO - Cry1A.105/Cry2Ab2; e DKB290PRO - Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry3Bb1.

Analisando o dendrograma (Figura 3), percebe-se que houve uma clara separação de 2 grandes grupos, quando se efetuou um corte na altura próximo 1,5 do dendrograma, no primeiro grande grupo (esquerda), houve a formação de dois subgrupos, sendo que dentro do primeiro subgrupo, ocorre uma alta similaridade entre os híbridos 30F53Y (Cry1Ab), 30F35H (Cry1F) e 30F53YH (Cry1F × Cry1Ab). Dentro ainda deste primeiro grande grupo, ainda se tem a formação do segundo subgrupo constituído pelos híbridos 30F53 (Não-*Bt*), 30F53H (Cry1F), 30F35 (Não-*Bt*) e 30F35Y (Cry1Ab). No segundo grande grupo, observa-se que os eventos DKB290PRO (Cry1A.105/Cry2Ab2), 30A37PW, 2B810PW (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F) e DKB290PRO3 (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry3Bb1) possuem uma alta similaridade, formando um subgrupo. Por outro lado, este apresenta uma certa dissimilaridade em relação aos demais, incluindo o segundo subgrupo formado por: 30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F) e 30F35VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F).

Ao ser feita a análise das proteínas que estes eventos expressam e na sua suscetibilidade ao ataque da praga, na esquerda ficaram os híbridos mais susceptíveis ao ataque de *S. frugiperda,* neste lado podemos encontrar dois subgrupos, formados por híbridos que não expressavam proteína *Bt* (30F53 e 30F35) ou expressavam as proteínas Cry1F (30F53H e 30F35H) ou Cry1Ab (30F53Y e 30F35Y) ou sua combinação (30F53YH). No grupo da direita, ficaram os híbridos que apresentaram maior tolerância aos ataques da *S. frugiperda,* neste lado podemos encontrar dois subgrupos novamente, sendo o mais à direita composto por híbridos que expressavam as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 (2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO), Cry3Bb1 (DKB290PRO3), Cry1F (2B810PW, 30A37PW), e o outro composto por dois híbridos que apresentaram o melhor desempenho frente ao ataque da praga, estes híbridos expressavam a proteína VIP3Aa (30F53VYH e 30F35VYH). Isso é confirmado pela Figura 4, onde podemos ver que o dano médio de todas as safras, causado pela *S. frugiperda,* mensurado pela escala Davis, repete o padrão encontrado no dendrograma.

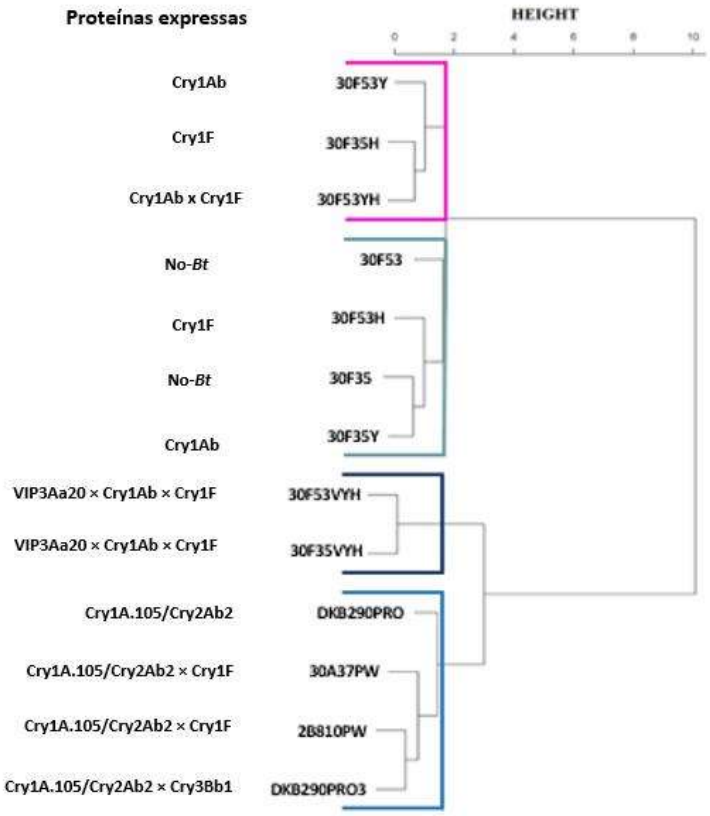

Figura 3 - Dendrograma da susceptibilidade dos híbridos de milho ao ataque de *S. frugiperda* em Toledo-PR

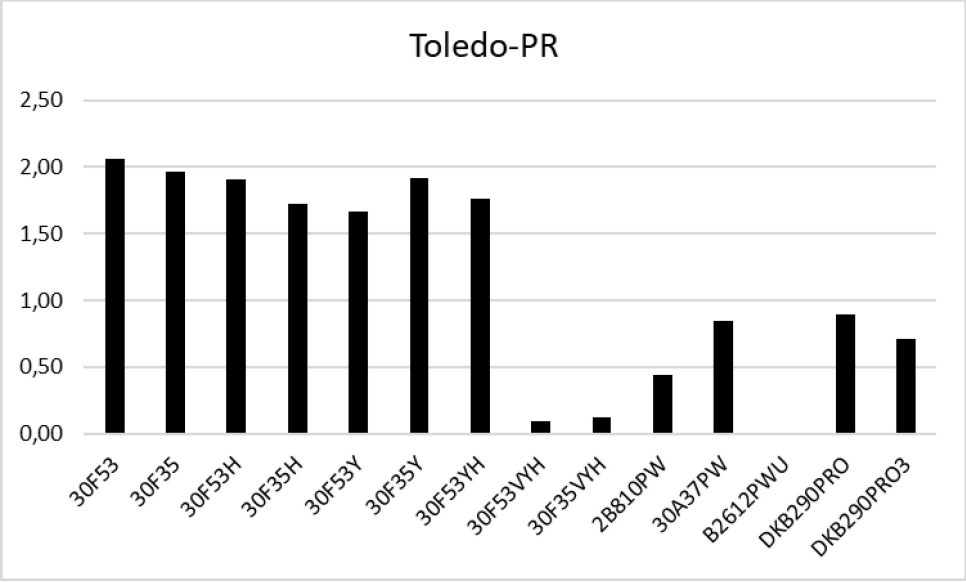

Figura 4 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Toledo-PR, de acordo com a escala Davis, considerando a média de todas as safras.

4.2 Planaltina-DF

Quando comparado os eventos nas safras, na segunda safra 2015, os híbridos 30F35 e 30F35H apresentaram os maiores valores na escala de Davis, seguidos por 30F53, 30F53H e 30F53YH (Tabela 6). Em seguida vieram os híbridos 2B810PW e 30A37PW, e os menores valores foram observados para DKB290PRO e DKB290PRO3.

Na primeira safra 2015/16, os híbridos 30F53, 30F35, 30F53H e 30F35Y foram os mais susceptíveis a *S. frugiperda*, seguidos por 30F53H, 30F53YH, 30F35H e 30F35Y (sendo estes dois últimos similares aos previamente mencionados). Adiante, o tratamento 30F53Y, seguido de 2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3. Os tratamentos 30F53VYH e 30F35VYH apresentaram os menores valores, portanto maior resistência para a praga. Na segunda safra 2016, os híbridos 30F35, 30F53, 30F35H e 30F35Y apresentaram os maiores valores, seguidos por 30F53H, 30F35Y e 30F53YH, e posteriormente por 2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3 (Tabela 6). Os tratamentos 30F53VYH e 30F35VYH mais uma vez apresentaram os menores valores na escala Davis.

Na primeira safra de 2016/17, 30F53, 30F35, 30F35H e 30F53H apresentaram maiores danos, seguidos por 30F53Y e 30F53YH. Seguindo, tem-se o híbrido 30F35Y, seguido por 2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO, DKB290PRO3 e 30F35VYH. O híbrido 30F53VYH apresentou os menores valores. Na segunda safra de 2017, os maiores valores de injúria pela escala de Davis foram observados para 30F53, 30F35, 30F35H, 30F53H e 30F35Y, seguidos por 30F53Y e 30F53YH, sendo que este último foi similar a 30F35H (Tabela 6). Em seguida, 2B810PW, DKB290PRO e DKB290PRO3, e adiante 30A37PW (os três últimos tratamentos mencionados não diferiram estatisticamente). Novamente, 30F53VYH e 30F35VYH apresentaram os menores valores, sendo que ambos os tratamentos foram similares a 30A37PW.

Na primeira safra de 2017/18, os híbridos 30F53, 30F35, 30F35H, 30F53H, 30F35Y, 30F53Y e 30F53YH apresentaram os maiores valores. Em seguida, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3, e adiante 2B810PW (que não diferiu estatisticamente de 30A37PW e DKB290PRO3). Em seguida o híbrido 30F35VYH, e 30F53VYH foi o híbrido que apresentou os menores valores na escala Davis. Na segunda safra de 2018, os maiores valores da escala Davis foram observados para 30F53Y e 30F35, seguidos de 30F53, 30F35H e 30F35Y (Tabela 6). Adiante, os híbridos 30F53H, 30F53YH, 2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3 (sendo que 30F53 e 30F35H não diferiram destes híbridos). Em seguida, os híbridos 30F35VYH e B2612PWU (sendo que 30F53YH, 30A37PW,

DKB290PRO e DKB290PRO3não diferiram destes híbridos), e os menores valores foram observados para 30F53VYH.

Quando comparamos os eventos entre as safras (safra e segunda safra), nos diferentes anos, temos:

30F53 (Não-*Bt*): O maior valor de Davis foi observado na primeira safra de 2015, seguido da segunda safra e primeira safra de 2016, e adiante pelas segunda safras de 2015 e 2017. Os menores valores foram observados na primeira safra de 2017 e na segunda safra de 2018.

30F35 (Não-*Bt*): O maior valor de Davis foi observado na primeira safra de 2015, seguido da segunda safra e primeira safra de 2016. Adiante, as segundas safras de 2015 e 2017, e o primeira safra de 2017 (que foi similar à segunda safra de 2017). Por fim, menores danos foram observados na segunda safra de 2018.

30F53H (Cry1F): Os maiores danos foram observados na primeira safra de 2015, seguido da primeira safra de 2016 e adiantes pela segunda safra de 2016. Em seguida, as segundas safras de 2015 e 2017 e a primeira safra de 2017, e os menores valores foram observados na segunda safra de 2018.

30F35H (Cry1F): os maiores valores foram observados na primeira safra de 2015, seguido pela segunda safra e primeira safra de 2016. Em seguida, as segundas safras de 2015 e 2017, a primeira safra de 2017, e os menores valores foram observados para a segunda safra de 2018.

30F53Y (Cry1Ab): os maiores danos foram observados na primeira safra de 2015, seguido pela segunda safra e primeira safra de 2016, segunda safra e primeira safra de 2017, e os melhores resultados foram observados na segunda safra de 2018.

30F35Y (Cry1Ab): os maiores danos foram observados na primeira safra de 2015, seguido pela segunda safra de 2016, primeira safra de 2016, segunda safra e primeira safra de 2017, e os melhores resultados foram observados na segunda safra de 2018.

30F53YH (Cry1F × Cry1Ab): maiores valores foram observados na primeira safra de 2015, seguido da segunda safra e primeira safra de 2016, e adiante pela segunda safra de 2015. Em seguida, a segunda safra e primeira safra de 2017, e os melhores resultados foram observados na segunda safra de 2018.

30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F): os maiores valores foram observados na segunda safra de 2016 e nas primeiras safras de 2015 e 2017, e os menores foram observados nas primeiras safras de 2016 e 2017 e segunda safra de 2018.

30F35VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F): os maiores valores foram observados nas primeiras safras de 2015 e 2017 e segundas safras de 2016 e 2017. Os menores valores foram observados na primeira safra de 2016 e segunda safra de 2018.

2B810PW (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F): o maior valor foi observado na primeira safra de 2015, seguido da segunda safra e da primeira safra de 2016, e em seguida a segunda safra de 2015. Adiante, por ordem de maior para menor dano, a segunda safra de 2017, primeira safra de 2017 e segunda safra de 2018.

30A37PW (Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F): o maior valor foi observado na primeira safra de 2015, seguido da primeira safra de 2016, segunda safra de 2016 e segunda safra de 2015. Em seguida, segunda safra e primeira safra de 2017 e os menores valores foram observados na segunda safra de 2018.

B2612PWU (VIP3Aa20 × Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F): No caso deste híbrido, como o mesmo foi plantado apenas em 2018, não a comparação com as outras safras. Porém ele apresentou eficácia semelhante ao 30F53VYH e 30F35VYH.

DKB290PRO (Cry1A.105/Cry2Ab2): o maior valor foi observado na primeira safra de 2015, seguido da primeira safra de 2016, segunda safra de 2016 e segunda safra de 2015. Em seguida, segunda safra e primeira safra de 2017 e os menores valores foram observados na segunda safra de 2018.

DKB290PRO3(Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry3Bb1): o maior valor foi observado na primeira safra de 2015, seguido da primeira safra de 2016, segunda safra de 2016 e segunda safra de 2015. Em seguida, segunda safra e primeira safra de 2017 e os menores valores foram observados na segunda safra de 2018.

Tabela 6 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Planaltina-DF, de acordo com a escala Davis

Evento	Segunda safra | 2015			Primeira safra | 2015/16			Segunda safra | 2016			Primeira safra | 2016/17			Segunda safra | 2017			Primeira safra | 2017/18			Segunda safra | 2018		
30F53	2,47 (2,34 - 2,59)	b	C	5,51 (5,37 - 5,65)	a	A	4,62 (4,50 - 4,75)	a	B	4,80 (4,66 - 4,94)	a	B	2,25 (1,98 - 2,52)	a	C	2,29 (2,09 - 2,50)	a	D	0,61 (0,43 - 0,80)	bc	E
30F35	2,84 (2,72 - 3,00)	a	C	5,47 (5,43 - 5,61)	a	A	4,76 (4,65 - 4,87)	a	B	4,80 (4,65 - 4,95)	a	B	2,80 (2,52 - 3,08)	a	CD	2,43 (2,23 - 2,63)	a	D	1,02 (0,81 - 1,25)	a	E
30F53H	2,43 (2,33 - 2,52)	b	D	5,31 (5,19 - 5,44)	ab	A	4,13 (3,98 - 4,29)	b	C	4,79 (4,63 - 4,94)	a	B	2,58 (2,27 - 2,88)	a	D	2,26 (2,04 - 2,48)	a	D	0,33 (0,20 - 0,47)	c	E
30F35H	2,59 (2,47 - 2,72)	a	C	5,16 (5,01 - 5,31)	bc	A	4,52 (4,37 - 4,68)	a	B	4,69 (4,52 - 4,86)	a	B	2,38 (2,08 - 2,70)	a	C	2,23 (2,01 - 2,45)	a	D	0,59 (0,43 - 0,77)	bc	E
30F53Y	-	-	-	4,97 (4,83 - 5,11)	c	A	4,22 (4,11 - 4,33)	b	B	4,26 (4,12 - 4,40)	b	B	1,84 (1,58 - 2,11)	b	C	2,27 (2,06 - 2,48)	a	C	0,69 (0,54 - 0,84)	a	D
30F35Y	-	-	-	5,41 (5,29 - 5,54)	ab	A	4,56 (4,44 - 4,69)	a	B	3,77 (3,63 - 3,91)	c	C	2,52 (2,25 - 2,81)	a	D	2,02 (1,80 - 2,25)	a	D	0,79 (0,61 - 0,97)	b	E
30F53YH	2,56 (2,44 - 2,69)	b	C	5,20 (5,06 - 5,34)	b	A	4,09 (3,97 - 4,22)	b	B	4,06 (3,90 - 4,23)	b	B	1,94 (1,74 - 2,14)	b	D	2,04 (1,84 - 2,23)	a	D	0,27 (0,16 - 0,40)	cd	E
30F53VYH	-	-	-	0,36 (0,26 - 0,47)	f	A	0,22 (0,13 - 0,30)	d	A	0,05 (0,01 - 0,09)	e	B	0,20 (0,12 - 0,30)	e	A	0,04 (0,01 - 0,08)	e	B	0,01 (0,00 - 0,04)	e	B
30F35VYH	-	-	-	0,48 (0,34 - 0,62)	f	A	0,30 (0,22 - 0,40)	d	A	0,11 (0,04 - 0,17)	d	B	0,33 (0,23 - 0,43)	e	A	0,34 (0,25 - 0,44)	d	A	0,08 (0,02 - 0,15)	d	B
2B810PW	1,94 (1,84 - 2,04)	c	C	3,20 (3,04 - 3,37)	d	A	2,52 (2,36 - 2,69)	c	B	2,66 (2,52 - 2,80)	d	B	1,07 (0,89 - 1,25)	c	D	0,66 (0,55 - 0,77)	c	E	0,34 (0,22 - 0,47)	c	F
30A37PW	1,79 (1,68 - 1,90)	c	D	3,81 (3,68 - 3,95)	d	A	2,25 (2,05 - 2,43)	c	C	2,84 (2,69 - 3,00)	d	B	0,61 (0,41 - 0,81)	de	E	0,72 (0,61 - 0,83)	bc	E	0,20 (0,11 - 0,31)	cd	F
B2612PWU	-	-		-	-	-	-	-	-	-			-			-			0,12 (0,05 - 0,20)	d	
DKB290PRO	1,54 (1,43 - 1,65)	d	D	3,38 (3,23 - 3,54)	d	A	2,29 (2,12 - 2,46)	c	C	2,88 (2,76 - 3,01)	d	B	0,88 (0,68 - 1,12)	cd	E	0,91 (0,79 - 1,04)	b	E	0,26 (0,15 - 0,38)	cd	F
DKB290PRO3	1,52 (1,41 - 1,63)	d	D	3,38 (3,25 - 3,52)	d	A	2,20 (2,00 - 2,43)	c	C	2,77 (2,66 - 2,88)	d	B	0,54 (0,44 - 0,70)	cd	E	0,80 (0,68 - 0,94)	bc	E	0,27 (0,16 - 0,40)	cd	F

(*) Média e intervalos de confiança gerados por bootstrap não paramétrico com 10.000 simulações. Letras maiúsculas comparam as épocas para cada híbrido, letras minúsculas comparam os híbridos dentro de cada época de plantio.

Nota: Eventos 30F53 e 30F35 – Não *Bt*; 30F53H e 30F35H – Cry1F; 30F53Y e 30F35Y – Cry1Ab; 30F53YH – Cry1F × Cry1Ab; 30F53VYH e 30F35VYH – VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F; 2B810PW - Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F; 30A37PW - Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F; B2612PWU - VIP3Aa20 × Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry1F; DKB290PRO - Cry1A.105/Cry2Ab2; e DKB290PRO - Cry1A.105/Cry2Ab2 × Cry3Bb1.

De acordo com o dendrograma (Figura 5), houve novamente uma clara separação de 2 grandes grupos, quando se efetuou um corte na altura próximo 1,5 do dendrograma, neste caso, o primeiro grande grupo (esquerda) apresenta dois subgrupos, um formado por 30F35, 30F53H, 30F53 e 30F35H, e outro formado por 30F35Y, 30F53Y e 30F53YH. No segundo grande grupo (direita) também há formação de dois subgrupos com similaridade entre os componentes: o primeiro é composto por 2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3, enquanto o outro é composto por 30F35VYH e 30F53VYH.

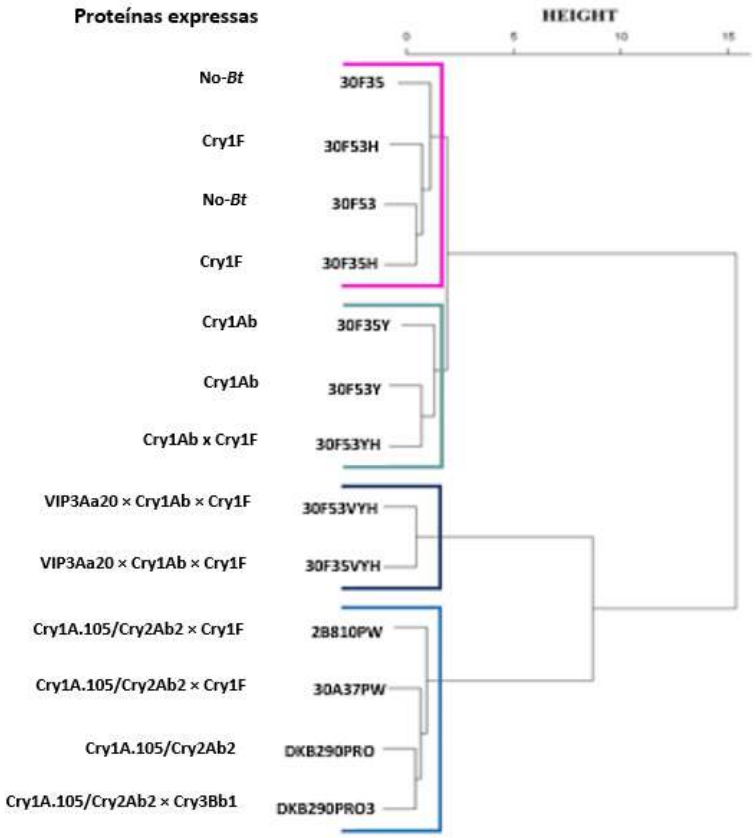

Figura 5 - Dendrograma da susceptibilidade dos híbridos de milho ao ataque de *S. frugiperda* em Planaltina-DF.

Ao ser feita a análise das proteínas que estes eventos expressam e na sua suscetibilidade ao ataque da praga, assim como em Toledo-PR, na esquerda ficaram os híbridos mais susceptíveis ao ataque de *S. frugiperda,* neste lado podemos encontrar dois subgrupos, formados por híbridos que não expressavam proteína *Bt* (30F53 e 30F35) ou expressavam as proteínas Cry1F (30F53H e 30F35H) ou Cry1Ab (30F53Y e 30F35Y) ou sua combinação (30F53YH). No grupo da direita, ficaram os híbridos que apresentaram maior

tolerância aos ataques da *S. frugiperda,* neste lado, podemos encontrar dois subgrupos novamente, sendo o mais à direita composto por híbridos que expressavam as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 (2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO), Cry3Bb1 (DKB290PRO3), Cry1F (2B810PW, 30A37PW), e o outro composto por dois híbridos que apresentaram o melhor desempenho frente ao ataque da praga, estes híbridos expressavam a proteína VIP3Aa (30F53VYH e 30F35VYH).). O padrão é confirmado pela da Figura 6, onde podemos ver que o dano médio de todas as safras, causado pela *S. frugiperda,* mensurado pela escala Davis, repete o padrão encontrado no dendrograma.

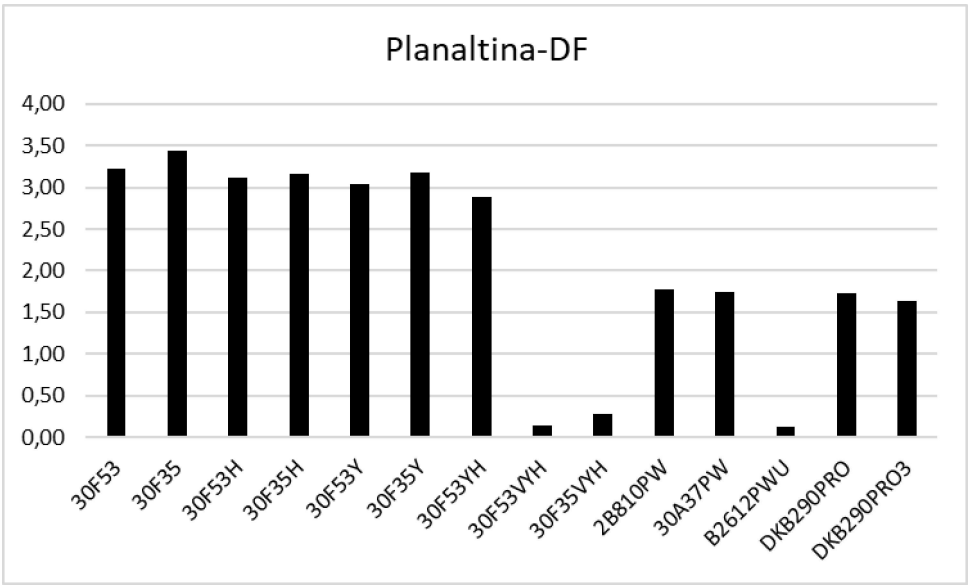

Figura 6 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Planaltina-DF, de acordo com a escala Davis, considerando a média de todas as safras

4.3 Comparação entre híbridos nas diferentes localidades

No estágio V6, o desempenho do híbrido 30F53 foi similar nas duas localidades nas segundas safras de 2015 e 2017 e primeira safra de 2017. Na segunda safra de 2016 e primeiras safras de 2015 e 2016, os maiores danos foram observados em Planaltina-DF, e na segunda safra de 2018 maiores danos foram observados em Toledo-PR (Figura 7). Para os híbridos 30F53H e 30F53YH houve similaridade entre as localidades apenas na segunda safra de 2017. Em todas as outras épocas de cultivo, maiores notas de dano foram observadas em Planaltina-DF, exceto na segunda safra de 2018, quando maiores danos foram observados em Toledo-PR (Figuras 8 e 9). O híbrido 30F53VYH apresentou baixas notas de dano em ambas as localidades em todas as safras avaliadas, sendo que houve diferença apenas na segunda

safra de 2016 e primeira safra de 2015, com valores levemente maiores para Planaltina-DF (Figura 10). Observando os danos médios de todas as safras em V6, podemos notar que os ataques da praga foram mais severos em Planaltina-DF, principalmente quando notamos os dois híbridos não-*Bt,* onde se esperava danos maiores (Figura 11).

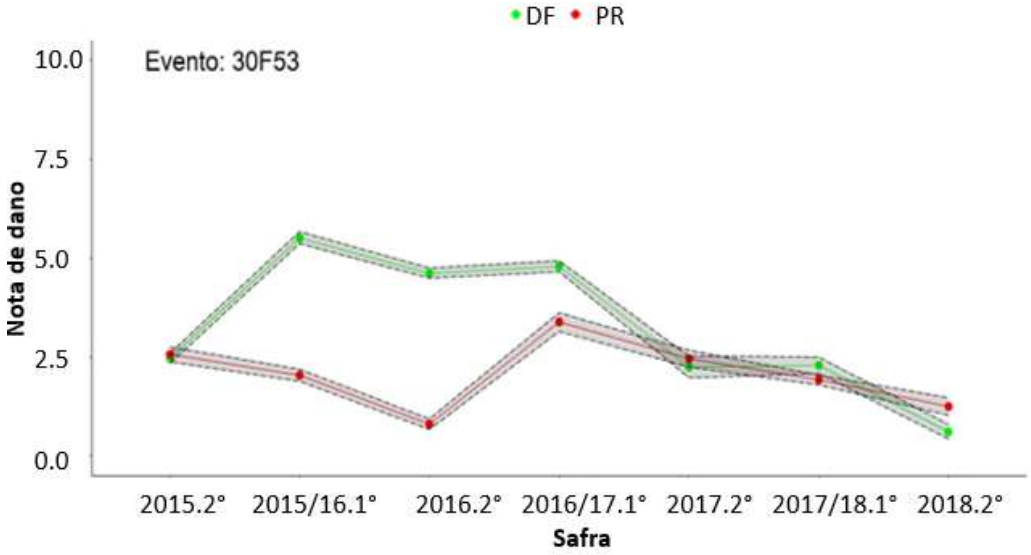

Figura 7 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53 (Não-*Bt*) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

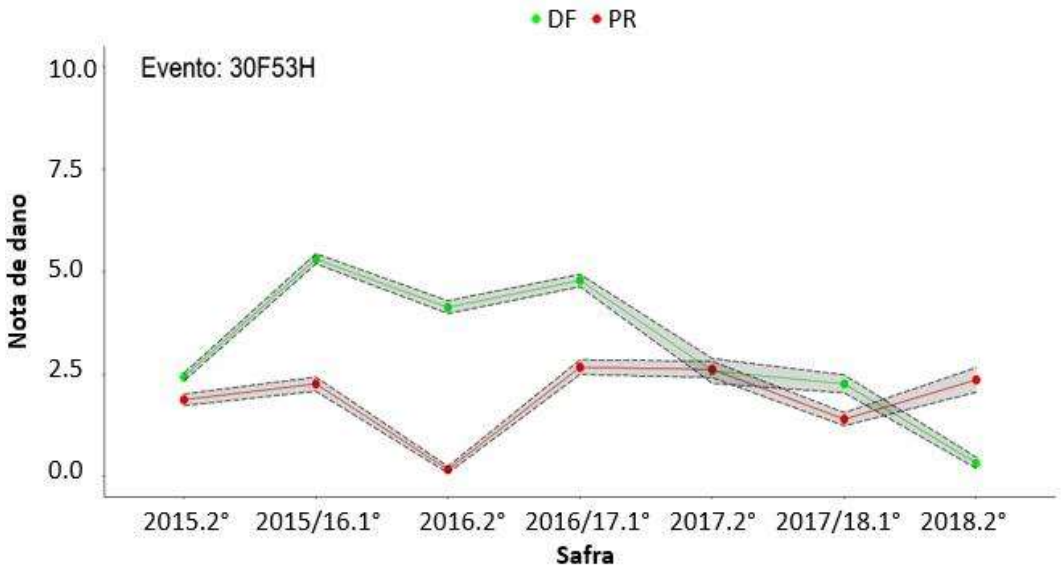

Figura 8 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53H (Cry1F) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

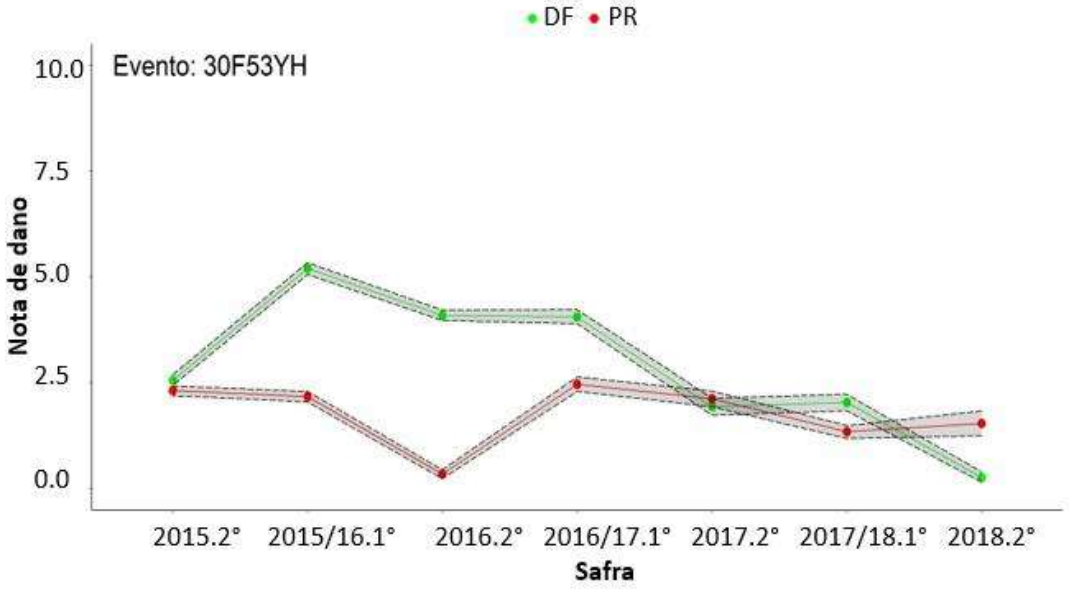

Figura 9 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53YH (Cry1F × Cry1Ab) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

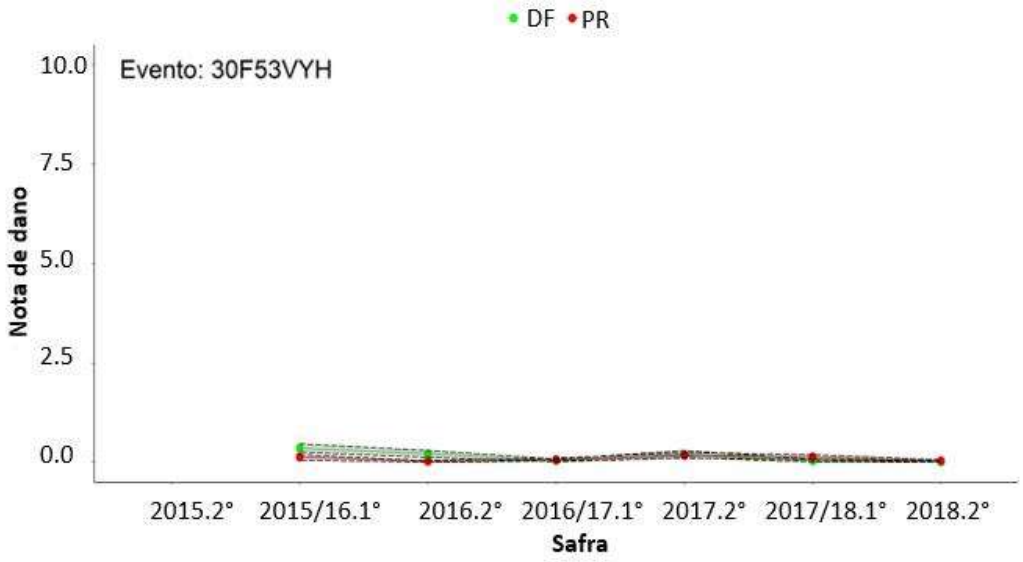

Figura 10 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F) no estágio V6 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

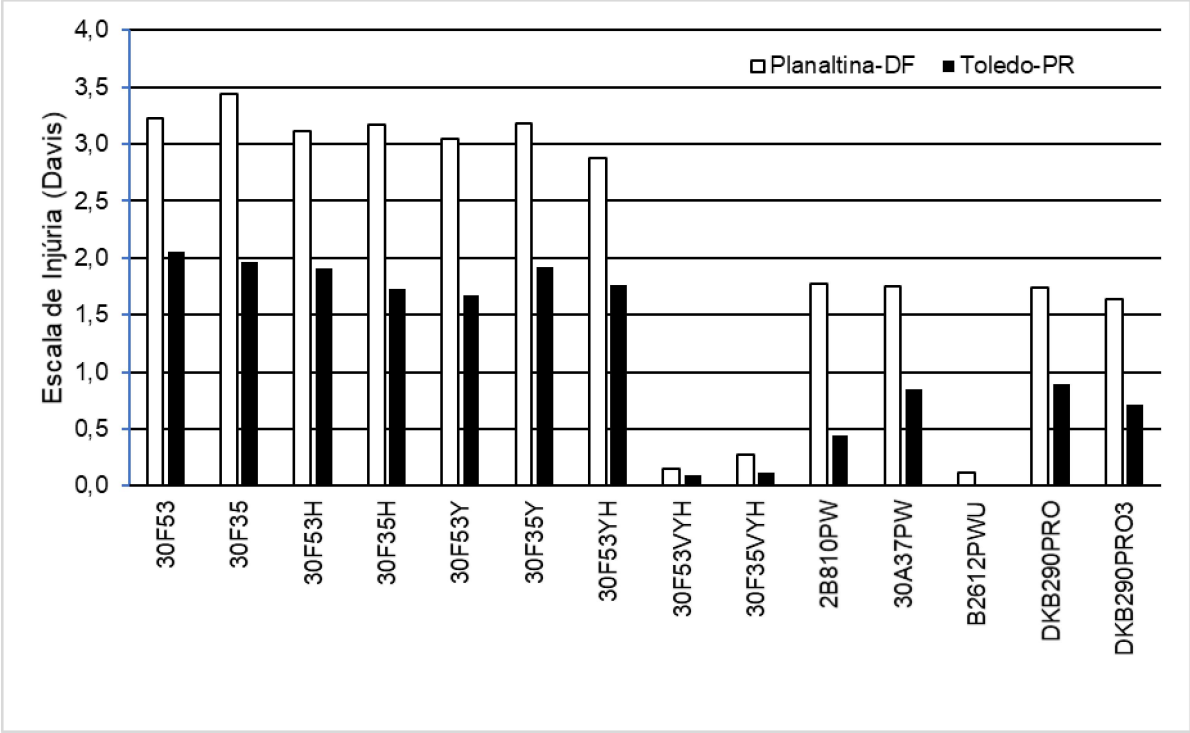

Figura 11 - Injúrias causadas por *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho em Toledo-PR e Planaltina-DF, de acordo com a escala Davis, considerando a média de todas as safras.

Para os híbridos no estágio V8, os resultados foram similares aos observados em V6, apesar de notas de dano mais altas em algumas situações, o que era esperado em função de

um maior tempo que as plantas permaneceram em campo expostas ao ataque de *S. frugiperda*. O desempenho do híbrido 30F53 foi similar nas duas localidades apenas na segunda safra de 2017. Em todas as outras épocas de cultivo o desempenho do híbrido foi melhor em Planaltina-DF, com exceção da segunda safra de 2018 quando maiores notas de dano foram observadas em Toledo-PR (Figura 12). A mesma situação foi observada para os híbridos 30F53H (Figura 13) e 30F53YH (Figura 14). Para o híbrido 30F53VYH os valores observados da escala Davis se mantiveram baixos no estágio V8, sem diferença estatística entre as localidades nas diferentes épocas de cultivo (Figura 15).

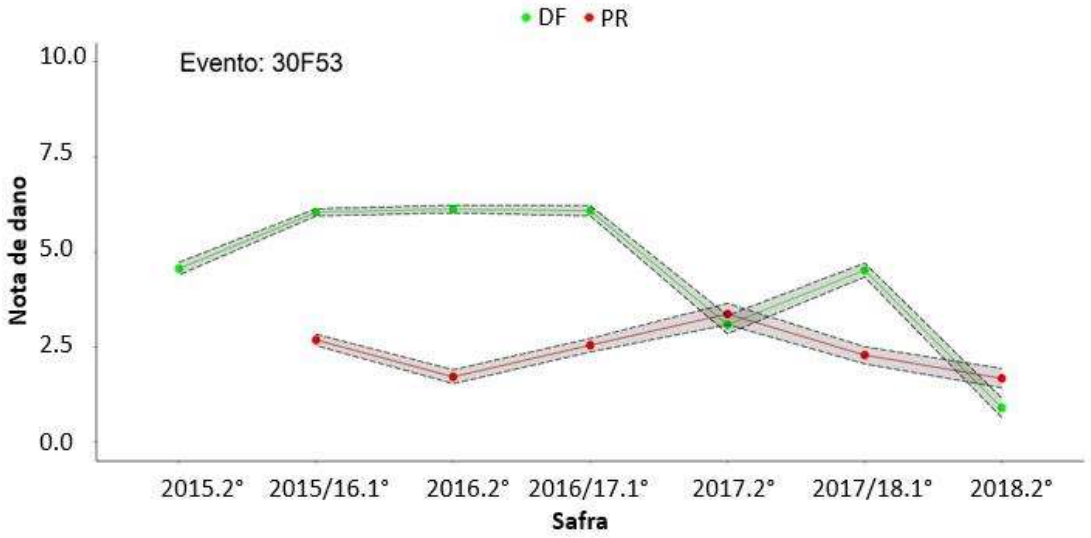

Figura 12 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53 (Não-*Bt*) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

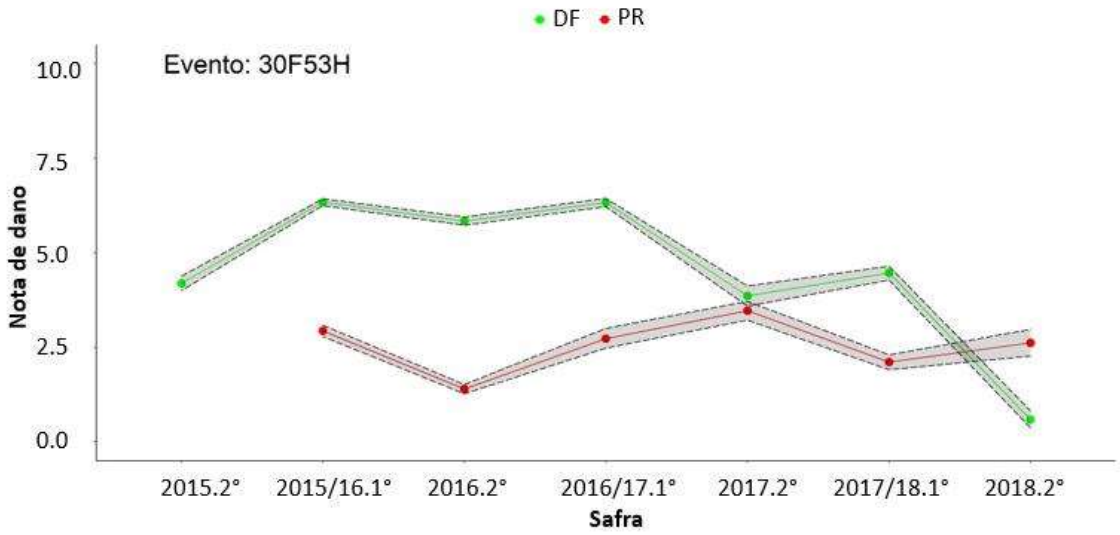

Figura 13 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53H (Cry1F) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

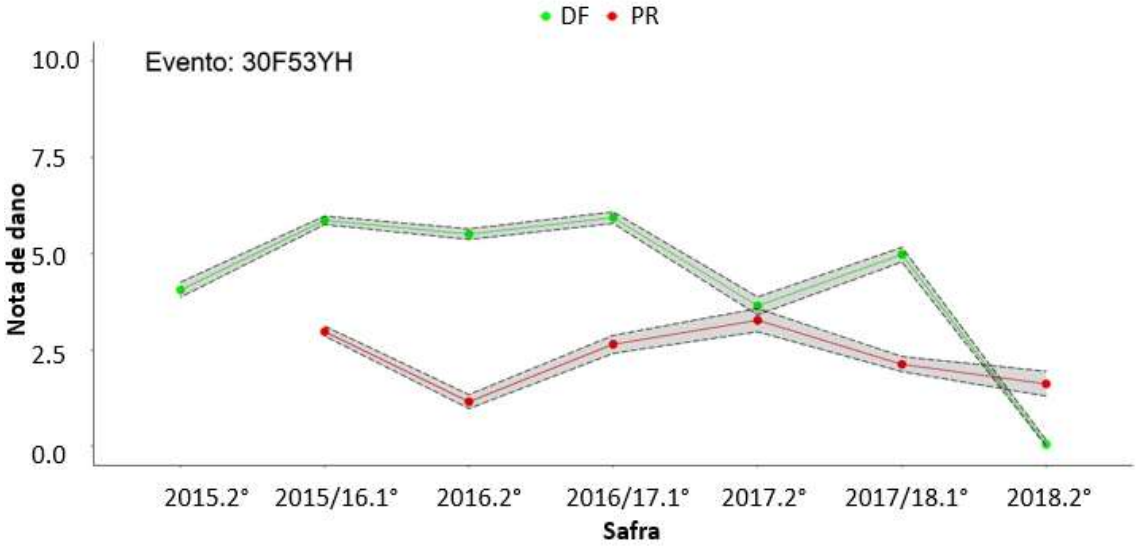

Figura 14 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53YH (Cry1F ×Cry1Ab) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

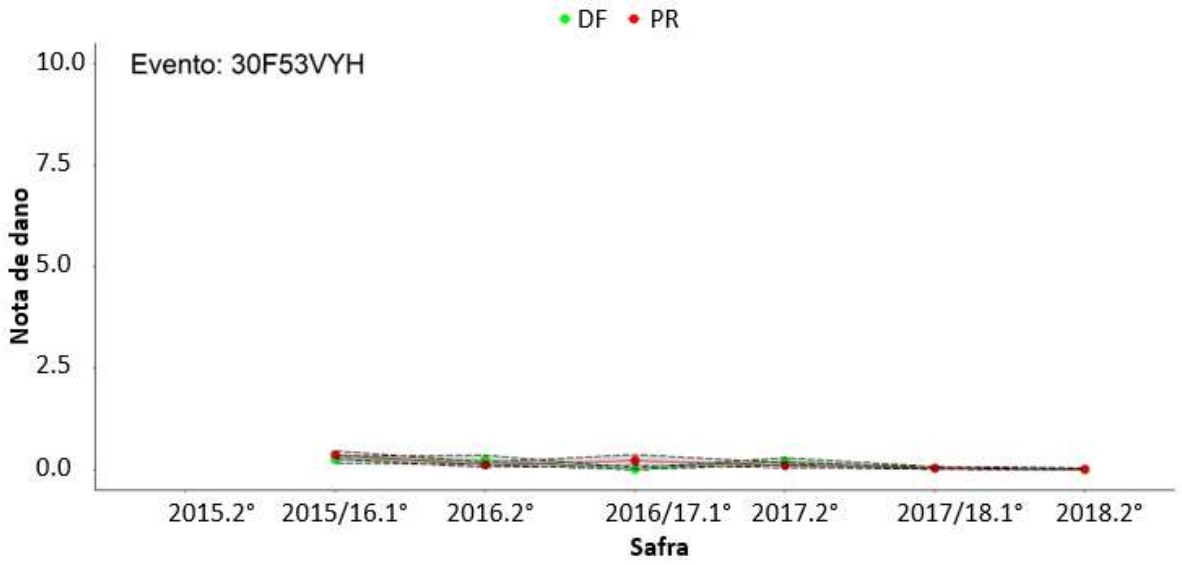

Figura 15 - Comparação do desempenho do híbrido 30F53VYH (VIP3Aa20 × Cry1Ab × Cry1F) no estágio V8 entre diferentes localidades nos períodos de plantio avaliados, sendo o número um após o ano representando a primeira safra e o dois segunda safra.

5 DISCUSSÃO

A manutenção da população de *S. frugiperda* abaixo dos níveis que causam danos econômicos tem se mostrado um grande desafio no Brasil e outros países que possuem condições similares de clima, práticas agrícolas e composição de paisagem (MOSCARDINI et al., 2020). No Brasil, a espécie *S. frugiperda* é um dos principais alvos de controle de plantas que expressam as proteínas *Bt*, entre elas, os híbridos de milho transgênico resistentes a insetos. Estes híbridos de milho *Bt* vêm sendo adotados em todo o território nacional e tem apresentado relativo sucesso no controle desta praga desde que foram regulamentados (OKUMURA et al., 2013), entretanto, diversos casos de populações resistentes às proteínas *Bt* foram relatados (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016; AMARAL et al., 2020). Desta forma, a constante avaliação do desempenho de híbridos no controle de *S. frugiperda* em diferentes regiões do Brasil se torna necessária.

De acordo com os dados obtidos, a época de plantio (primeira safra ou segunda safra) aparentemente não foi determinante para a performance dos híbridos, visto que não foi possível observar padrões em relação à época de plantio. No campo experimental em Toledo-PR, de maneira geral, menores valores de injúria, obtidos pela escala Davis, foram observados na segunda safra de 2016 para todos os híbridos, maiores na primeira safra de 2016 e segunda safra de 2017, e valores intermediários nas primeiras safras de 2017 e 2018 e segunda safra de 2018. Em Planaltina-DF, por sua vez, de maneira geral, menores valores foram observados na segunda safra de 2018 e primeira safra de 2017, maiores na primeira safra de 2015 e 2016 e segunda safra de 2016, e valores intermediários nas segundas safras de 2015 e 2017. Desta forma, não se pode afirmar que determinada época de plantio (primeira safra ou segunda safra) seja mais vantajosa que outra em relação ao controle de *S. frugiperda*.

A variação nos danos causados pela praga, no decorrer dos anos, pode estar relacionada com variações climáticas, em cada uma das épocas de plantio, e incidência natural da praga, visto que não foram feitas infestações artificias de *S. frugiperda* nos cultivos, nota-se que os danos em Planaltina-DF foram mais severos que Toledo-PR, isso pode estar relacionado as maiores temperaturas médias presentes nesta localidade, essa maior média de temperatura faz com que tenhamos mais ciclos do inseto e um maior consumo foliar pela aceleração de seu metabolismo (PANIZZI; PARRA, 1991; PARRA et al., 2021).

Quando pensamos nas condições climáticas, temperatura média e acumulado de chuvas mensal, não houve variações bruscas de temperatura nos meses de condução do experimento, que justificassem tais variações de danos nos anos estudados. O acumulado de

chuva mensal, porém, aumentou de 2015 até 2018 nas duas regiões (Anexo A e B) podendo ser um fator de diminuição da população de *S. frugiperda*, por conta da água que se acumula no cartucho do milho (MILANO et al., 2008; BIALOZOR et al., 2020).

Outros dois fatores a serem levados em consideração e que podem influenciar nesta variação de danos, seriam que não houve adoção de inseticidas na condução do experimento, o que faz com que o número de inimigos naturais se torne elevado, promovendo o controle das pragas de forma natural ou o aumento da área com adoção de plantas *Bt* pelos produtores, que acaba afetando as populações de *S. frugiperda*, de tal forma que um número de menor de mariposas e lagartas cheguem até o experimento, isso se nota principalmente a partir do ano de 2016 onde há um decréscimo nos danos (FIGUEIREDO; MARTINS-DIAS; CRUZ 2006; CIB, 2019).

Entretanto, foram observadas significativas diferenças entre os híbridos dentro de cada época de cultivo. Os híbridos 30F35 e 30F53 (não-*Bt*), apresentaram os maiores valores de danos pela escala de Davis em praticamente todos os períodos avaliados. Como não havia nenhum evento *Bt* inserido nestes híbridos e não foi feito nenhum tipo de controle adicional, era de se esperar que maiores danos fossem observados nestes tratamentos. Entretanto, os demais híbridos que apresentam apenas a proteína Cry1F (30F35H e 30F53H) ou apenas Cry1Ab (30F35Y e 30F53Y) ou o híbrido que apresentavam essas duas proteínas (30F53YH) foram estaticamente similares aos híbridos não-*Bt*, apresentando sempre desempenhos inferiores aos demais híbridos, que não possuíam outras proteínas associadas que não fossem Cry1F ou Cry1Ab. Este fato pode ser explicado pela presença de populações resistentes de *S. frugiperda* às proteínas Cry1F e/ou Cry1Ab, uma vez que há relatos de casos resistência cruzada entre essas proteínas, no Brasil (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016; Machado et al., 2020), além de, também, terem sido reportadas populações resistentes a Cry1F nos Estados Unidos (HUANG et al., 2014) e Porto Rico (STORER et al., 2010). Devido à ampla adoção de milho *Bt* no Brasil expressando as mesmas proteínas nas primeiras safras e segundas safras, ocorre sobreposição espacial e temporal de cultivos transgênicos, o que, associado à baixa adesão de áreas de refúgio, aumenta a pressão de seleção de populações resistentes (FARIAS et al., 2014; LEITE et al., 2016).

A resistência a plantas *Bt* está associada à modificação dos sítios de ação específicos das proteínas (BERNARDI et al., 2017), e *S. frugiperda* foi a primeira praga a apresentar resistência a plantas transgênicas (TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009). Populações resistentes de *S. frugiperda* podem se desenvolver bem em milho *Bt* e gerar descendentes férteis, e a resistência é essencialmente recessiva (BERNARDI et al., 2017).

Híbridos *Bt* expressando apenas uma proteína muitas vezes requerem suplementação de medidas de controle, que podem ser até 4 aplicações de inseticidas, de forma que para o controle de *S. frugiperda* no Brasil e países latino-americanos é recomendado que se dê preferências a híbridos que expressem duas ou mais proteínas (BLANCO et al., 2016).

Desta forma, tecnologias de milho com eventos piramidados, ou seja, híbridos com eventos que expressam mais de um tipo de proteína *Bt*, têm sido amplamente incorporadas no Brasil para o controle de *S. frugiperda* e outros lepidópteros (BERNARDI, 2015). Estes híbridos são empregados visando evitar a seleção de populações resistentes de *S. frugiperda* a uma proteína específica, visto que a expressão de mais de uma proteína apresenta benefícios como alta mortalidade de insetos susceptíveis a cada proteína expressa (BERNARDI et al., 2017). Além disso, há menor probabilidade de resistência cruzada entre proteínas piramidadas visto que diferentes proteínas atuam em diferentes sítios de ação, sendo esta considerada uma estratégia no manejo de resistência de *S. frugiperda* (ZHU et al., 2019).

Eventos piramidados podem ser favoráveis à prevenção da resistência, entretanto, proteínas similares (como as do grupo Cry1) podem induzir resistência cruzada em populações de *S. frugiperda* e consequentemente resultar em perda de durabilidade desta tecnologia (BERNARDI et al., 2015). Quando se observa lagartas resistentes a híbridos que expressam mais de uma proteína, há a probabilidade de que tenha ocorrido a modificação de múltiplos sítios de ação, ou ainda outro mecanismo de resistência não envolvido com alterações de sítios receptores (BERNARDI et al., 2017). Sabe-se que as proteínas Cry1F e Cry1A.105 compartilham o mesmo sítio de ação (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013), e insetos resistentes a Cry1F podem apresentar resistência cruzada a outras proteínas Cry1 (em especial Cry1A.105, Cry1Ac e Cry1Ab) (HUANG et al., 2014, MACHADO et al., 2020).

Por sua vez, os híbridos DKB290PRO, DKB290PRO3, 2B810PW e 30A37PW apresentaram resultados mais satisfatórios que os híbridos de base 30F35 e 30F53 (exceto 30F53VYH e 30F35VYH). Estes híbridos piramidados expressam, dentre outras proteínas Cry, a proteína Cry2Ab2. Insetos resistentes a Cry1F não apresentam resistência cruzada a Cry2Ab2 (HUANG et al., 2014), fortalecendo a tese de que há resistência à Cry1F nas localidades avaliadas. O híbrido DKB290PRO3 também expressa a proteína Cry3B1, entretanto, este híbrido não apresentou desempenho superior à DKB290PRO, 2B810PW e 30A37PW na maioria das safras observadas.

Os melhores desempenhos em todas as safras avaliadas, em ambas as localidades, foram dos híbridos B2612PWU, 30F53VYH e 30F35VYH, únicos híbridos que, além de

expressaram proteínas Cry, também expressam a proteína Vip3Aa20. Os híbridos 30F53VYH e 30F35VYH contam com quatro eventos transgênicos em sua composição, que resultam na expressão de três proteínas *Bt* (Vip3Aa20, Cry1Ab e Cry1F). Uma maior variedade de proteínas expressas na composição da planta implica em uma maior eficiência para pragas, uma vez que populações resistentes de *S. frugiperda* podem ser resistentes a determinada proteína, mas não a outra. O mesmo foi observado para o híbrido B2612PWU (avaliado apenas na segunda safra de 2018), que teve desempenho semelhante à 30F53VYH e 30F35VYH, e que conta com uma semelhante composição de proteínas (a diferença está na adição de Cry1Ac presente no complexo Cry1A.105, juntamente com Cry1Ab e Cry1F). A proteína Vip3Aa20 atua em um sítio de ação diferente das proteínas Cry, indicando que o emprego de híbridos que expressem os dois grupos de proteínas é altamente vantajoso no manejo de resistência pois estes não apresentam de resistência cruzada (SENA; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; FERRÉ, 2009; GOUFFON et al., 2011; HUANG et al., 2014).

Ademais, outros autores também observaram alta eficiência de híbridos que expressam Vip3Aa20. Scoton et al. (2020) observaram menos lesões foliares de *S. frugiperda* em plantas que expressam a proteína Vip3Aa20 em comparação com híbridos que apresentavam somente proteínas Cry, piramidadas ou não. Michelotto et al. (2017) também observaram alta eficiência de híbridos de milho expressando Vip3a20 sobre *S. frugiperda*. Marques et al. (2019) observaram alta eficiência do híbrido expressando Cry1F + Cry1A.105 + Cry2Ab2 + Vip3Aa20 sobre diversas pragas da cultura do milho, como *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae).

Em um trabalho realizado por Moscardini et al. (2020) foi observado que o híbrido expressando Cry1F + Cry1A.105 + Cry2Ab2 + Vip3Aa20 promoveu significante proteção em relação à diferentes tipos de injuria (destruição de plântulas, consumo foliar e danos em espigas) causado por duas populações de *S. frugiperda* (uma coletada em campo e outra resistente a Cry1F), em diferentes regiões e condições climáticas do Brasil. O híbrido expressando apenas a proteína Vip3Aa20 (não piramidado) foi igualmente eficiente em relação ao dano foliar e danos em espigas, mas apresentou baixa eficiência no controle de destruição de plântulas (para qual todos eventos piramidados apenas com proteínas Cry foram eficientes). Os resultados indicam que este híbrido contribui para a proteção do dossel, crescimento da planta, qualidade da espiga e colheita total, e que a proteína Vip3Aa20 é uma boa opção para contribuir no manejo de *S. frugiperda* (MOSCARDINI et al., 2020).

Entretanto, mesmo com a eficiência observada em ambas as localidades, esta tecnologia deve ser empregada com cautela. Apesar da baixa frequência em campo, o alelo de resistência a Vip3aA20 está amplamente distribuído em regiões produtoras de milho no Brasil, podendo gerar populações resistentes (AMARAL et al., 2020). Indivíduos resistentes a esta proteína pode se desenvolver e formar adultos com progênies viáveis, mas foi observada redução na taxa reprodutiva em comparação com uma população suscetível, indicando um custo adaptativo para a resistência (BERNARDI et al., 2017). Custos adaptativos também foram observados em populações resistentes às proteínas Cry, como menor performance reprodutiva, aumento do tempo de desenvolvimento e maior mortalidade (DANGAL; HUANG, 2015; BERNARDI et al., 2016b, BERNARDINI et al., 2017), embora nem sempre custos relevantes tenham sido observados (VELEZ et al., 2014, HORIKOSHI et al., 2016).

Spodoptera frugiperda possui uma alta capacidade de dispersão, alta fecundidade, além da polifagia que faz com que sejam selecionadas populações resistentes, reduzindo a eficiência de híbridos *Bt,* em um menor tempo. Estudos demonstram que populações resistentes à proteína Cry1F adquirem genes de resistência via herança autossômica recessiva (FARIAS et al., 2014; LEITE et al., 2016), e que proteínas Cry podem ser passadas para a progênie uma vez ingerida pela geração paternal (ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006). Segundo Souza et al. (2018), proteínas Cry1F ingeridas por lagartas de *S. frugiperda* podem ser transmitidas para os ovos de descendentes, de forma que o embrião pode ter sido exposto às proteínas antes mesmo da emergência das lagartas, o que pode aumentar as chances de selecionar indivíduos resistentes. Foi observado também que a proteína estava presente na progênie quando tanto um ou ambos os genitores se alimentaram de plantas *Bt* na fase de lagarta, entretanto o efeito foi potencializado quando ambos sexos foram expostos, ressaltando a necessidade de adoção de áreas de refúgio adequadas para que ocorra o acasalamento de indivíduos resistentes e suscetíveis, diluindo a resistência. Além disso, no experimento de Souza et al. (2018) as lagartas foram expostas a plantas *Bt* apenas durante 5 dias, sendo que a exposição pode ocorrer durante todo o ciclo de vida do inseto em condições de campo, o que pode resultar em ainda maiores proporções de proteínas transferidas para a progênie, e assim maiores chances de seleção de resistência.

Visando a manutenção da eficiência de híbridos *Bt*, é necessário adotar medidas que previnam ou retardem a seleção de populações resistentes, dentre elas a adoção de áreas de refúgio com plantas não-*Bt* como fonte de indivíduos suscetíveis para acasalar com sobreviventes de áreas *Bt* (BERNARDI et al., 2017). Leite et al. (2016) observaram que em

apenas quatro gerações em laboratório é possível selecionar lagartas resistentes à Cry1F. Se insetos suscetíveis forem mantidos na população, a evolução de resistência pode ser reduzida, o que salienta a importância da adoção de áreas de refúgio. Entretanto, estima-se que apenas 15% dos produtores brasileiros adotem áreas de refúgio, visto que a adoção não é obrigatória, mas voluntária. Com isso, a maior adoção de áreas de refúgio é de fundamental importância para o manejo de resistência de *S. frugiperda* às proteínas *Bt*, inclusive Vip3Aa20 (BERNARDI et al., 2016b; MOSCARDINI et al., 2020).

Além da adoção de áreas de refúgio, outras medidas que devem ser estimuladas para impedir ou retardar a seleção de populações resistentes de *S. frugiperda*, como monitoramento populações da praga a fim de detectar alelos de resistência, alta dose (uso de cultivares com elevada expressão de proteínas), controle químico conforme recomendado pelo IRAC-BR (Milho não *Bt*-Nível de ação recomendado pela Embrapa 20% plantas com nota Davis ≥ 3; Refúgio estruturado-Nível de ação recomendado pela IRAC 20% plantas com nota Davis ≥ 3, *Bt* com Vip3A- 4% de plantas com nota Davis ≥ 3, *Bt* sem Vip3A - 10% de plantas com nota Davis ≥ 3) e adoção de eventos piramidados, cuja combinação de genes proporciona controle independente das mesmas pragas (por exemplo, a proteína Vip3Aa20 que controla insetos resistentes à proteínas do grupo Cry) (ZHAO et al., 2005; HUANG; ANDOW; BUSCHMAN, 2011; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009; BERNARDI et al., 2016b; MENDES; MARUCCI; WAQUIL, 2018; BARCELOS; ANELINI, 2018; MOSCARDINI et al., 2020). Desta forma, é possível manter a eficiência de cultivares transgênicos por mais tempo em campo, o que implica em maiores produtividades de milho e um produto de maior qualidade.

6 CONCLUSÃO

Os híbridos de milho com eventos que expressavam Cry1F e Ab (30F53H, 30F35H, 30F53Y, 30F35Y, 30F53YH) obtiveram danos iguais aos eventos que não expressavam nenhuma proteína (30F53 e 30F35), híbridos que expressavam Cry1A.105 e Cry2Ab2 (2B810PW, 30A37PW, DKB290PRO e DKB290PRO3) apresentaram danos intermediários e aqueles que expressam a proteína Vip3Aa20 (30F53VYH, 30F35VYH e B2612PWU) apresentaram melhor controle de *S. frugiperda* em condições de campo, independentemente do local de estudo (Toledo – PR ou Planaltina – DF) ou época de plantio (primeira safra ou segunda safra). Estes híbridos que apresentam melhor controle devem ser adotados para um manejo mais eficiente de *S. frugiperda.*

REFERÊNCIAS

ALVES, H. C. R.; AMARAL, R. F. **Produção, área colhida e produtividade do milho no Nordeste.** Banco do Nordeste. Fortaleza: Informe Rural Etene, 2011.

AMARAL, F. S. et al. Geographical distribution of Vip3Aa20 resistance allele frequencies in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Pest Management Science**, v. 76, n. 1, p. 169-178, maio 2020.

ARIAS, O. et al. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2948-2957, mar. 2019.

ARTUZO, F. D. et al. O potencial produtivo brasileiro: uma análise histórica da produção de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 515-540, maio 2019.

BABU, R. M. et al. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an overview. **Crop protection**, v. 22, n. 9, p. 1071-1086, nov. 2003.

BADRAN, A. H. et al. Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. **Nature**, v. 533, n. 7601, p. 58, abr. 2016.

BARCELOS, P. H. S.; ANGELINI, M. R. Controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) em diferentes tecnologias *Bt*s (*Bacillus thuringiensis*) na cultura do milho. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 35-40, 2018.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996-1001, dez. 2010.

BARROS J. F. C; CALADO J. G. **A cultura do milho**. Universidade de Évora, Escola de Ciências e Tecnologia, 2014.

BLANCO, C. A. et al. Current situation of pests targeted by *Bt* crops in Latin America. **Current opinion in insect science**, v. 15, p. 131-138, jun. 2016.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, mar. 2007.

BERNARDI, D. **Resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a eventos piramidados de milho que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner.** 2015. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2015.

BERNARDI, D. et al. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided *Bt* maize hybrids in Brazil. **PloS one**, v. 10, n. 10, e0140130, out. 2015.

BERNARDI, D. et al. Selection and characterization of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to MON 89034× TC1507× NK603 maize technology. **Crop Protection**, v. 94, p. 64-68, abr. 2017.

BERNARDI, O. et al. **Manejo da Resistência de Insetos a Plantas *Bt.*** Engenheiro Coelho/SP: PROMIP, 2016a.

BERNARDI, O. et al. Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1794-1802, set. 2016b.

BIALOZOR, A. et al. Água em cartucho de milho melhora o controle *de Spodoptera frugiperda* com inseticidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. e59517, abr. 2020.

BOLZAN, A. et al. Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, p. 2682-2689, fev.2019.

BUNTIN, G. D. A review of plant response to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), injury to select field and forage crops. **Florida Entomologist** v. 69, n. 3, p. 549–559, mar. 1986.

BUSATO, G. et al. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709-716, dez. 2004.

CANTY, A.; RIPLEY, B. Boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. R package version 1.3-24, 2019.

CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação populacional, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de**

milho em condições de campo. 1970.170 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1970.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One**, v. 8, n. 4, abr. 2013.

CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 69, n. 3-4, p. 209-231, 2010.

CELERES. **Informativo biotecnologia**. 2019. Disponível em: http:/celeres.com.br/wordpress/wpcontent/uploads/2013/12/IB13021.pdf. Acesso em: 03 fev. 2020.

COELHO, A. M.; CRUZ, J. C; PEREIRA-FILHO, I. A. Desafios para alta produtividade de milho. **Comunicado técnico 112. Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, 2004.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas 2018 e 2019.** Disponível em: <https:/portaldeinformacoes.conab.gov.br/index.php/safra-serie--historica-dashboard>. Acesso em: 27 nov. 2019.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras de grãos 2020-2021. 6º levantamento.** 61 p. Disponível em: < file:///C:/Users/Marcelo/Downloads/E-book_BoletimZdeZSafrasZ-Z6oZlevantamento.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2021

CONCEIÇÃO, L. **Movimentação Larval de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho Cultivado no Sistema Santa Fé.** 2019. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019.

CIB - CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Benefícios das culturas *Bt* – Análise histórica e perspectivas até 2028**. 2019. Disponível em: Acesso em: 25 novembro. 2019.

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

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 355-359, mar. 1982.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*.** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1999.

CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; FILHO, I. A. P. **Caracterização dos sistemas de produção de milho para altas produtividades**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.

CTNBIO, 2007. Disponível em <www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15713.html>. Acesso em 28 de dezembro de 2020.

CTNBIO, 2008. Disponível em <www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15713.html>. Acesso em 28 de dezembro de 2020.

CTNBIO, 2009. Disponível em <www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15713.html>. Acesso em 28 de dezembro de 2020.

CTNBIO, 2010. Disponível em <www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/15713.html>. Acesso em 28 de dezembro de 2020.

DA ROSA, A. P. S. A.; BARCELOS, H. **Bioecologia e controle de *Spodoptera frugiperda* em milho.** Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E), 2012.

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

DANGAL, V.; HUANG, F. Fitness costs of Cry1F resistance in two populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith), collected from Puerto Rico and Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 81–86, maio 2015.

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, out. 2014

FIGUEIREDO, M.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Associação entre inimigos naturais e *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, n. 3, p. 340-350, 2006.

FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nature Biotechnology**, v. 5, n. 8. p. 807-813, ago. 1987.

GALILI, T. Dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering. Bioinformatics, v. 31, n. 22, p. 3718-20, nov. 2015.

GILL, S. S.; COWLES, E.A.; PIETRATONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 615-636, 1992.

GOMES, J. M. et al. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera Noctuidae) por bactérias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 13, n. 2, p. 156-162, mar. 2018.

GOUFFON, C. V. et al. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3182-3188, maio 2011.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S. et al. Shared midgut binding sites for Cry1A. 105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from Bacillus thuringiensis in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PloS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68164, jul. 2013

HOMRICH, M. S. et al. Agronomic performance, chromosomal stability and resistance to velvetbean caterpillar of transgenic soybean expressing cry1Ac gene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 801-807, jul. 2008.

HORIKOSHI, R. J. et al. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 2, p. 854-859, abr. 2016.

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, jun. 2011.

HUANG, F. J. et al. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single gene versus pyramided *Bt* maize. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e112958, nov. 2014

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil.** Levantamento sistemático da produção agrícola, v. 29, n. 1, 2020.

JURAT-FUENTES, J.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 5-10, jan. 2017.

LEITE, N. A. et al. Rapid selection and characterization of Cry1F resistance in a Brazilian strain of fall armyworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 158, n. 3, p. 236-247, fev. 2016.

LOPES, V. S. **Avaliação agronómica de variedades e efeito da densidade de sementeira em milhos híbridos.** 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária, Beja, 2016.

MACHADO, E. P. et al. Cross-crop resistance of Spodoptera frugiperda selected on Bt maize to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins in Brazil. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

MAGALHAES, P. C. et al. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002

MAGALHAES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

MAGALHÃES, P. C; DURÃES, F. O. M; GOMIDE, R. L. **Fisiologia da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1996.

MARQUES, L. H. et al. Assessing the efficacy of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pyramided proteins Cry1F, Cry1A. 105, Cry2Ab2, and Vip3Aa20 expressed in *Bt* maize against Lepidopteran pests in Brazil. **Journal of economic entomology**, v. 112, n. 2, p. 803-811, mar. 2019.

MARQUES, L. H. et al. Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. **Crop Protection**, v.96, p.109-115, jun. 2017.

MARTINELLI, S. et al. Resistance of *Spodoptera frugiperda* to *Bacillus thuringiensis* Proteins in the Western Hemisphere. In: FIUZA L., POLANCZYK R., CRICKMORE N. (Eds) ***Bacillus thuringiensis*** **and** ***Lysinibacillus sphaericus*****.** Springer: Cham, 2017. p. 273-288.

MENDES, S. M.; MARUCCI, R. C.; WAQUIL, J. M. **Manejo de pragas nos sistemas de produção de milho no Brasil: inovações tecnológicas no manejo de lagartas em lavouras de milho não-Bt e *Bt.*** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018.

MICHELOTTO, M. D. et al. Eficácia de milho transgênico tratado com inseticida no controle da lagarta-do-cartucho no milho segunda safra no estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 2, p. 128-138, abr. 2017.

MILANO, P. et al. Influência da temperatura na freqüência de cópula de *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 528-535, out. 2008.

MONTEZANO, D. G. et al. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n. 2, p. 286-300, set. 2018.

MOSCARDINI, V. F. et al. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize expressing Cry1F, Cry1A. 105, Cry2Ab2 and Vip3Aa20 proteins to manage the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 137, p. 105269, nov. 2020.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida entomologist**, v. 91, n. 4, p. 546-554, DEZ. 2008.

OKUMURA, R. S. et al. Agronomic efficiency of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) maize hybrids in pests control on Lucas do Rio Verde city, State of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 19, p. 2232-2239, 2013.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, set. 2016.

PADILHA, F. A. **Desempenho de híbridos de milho em dois níveis de investimento tecnológico na região de Sete Lagoas – MG.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrarias) – Universidade Federal de São João del Rei, Sete Lagoas, 2014.

PITRE, H. N.; HOGG, D. B. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn [*Spodoptera frugiperda*]. **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 18, n. 2, p. 182-187, abr. 1983.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. Introdução à ecologia nutricional de insetos. In:_____ (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas.** São Paulo: Manole, 1991, cap. 1, p. 1-7.

PARRA, J. R.P. et al. Important pest species of the Spodoptera complex: Biology, thermal requirements and ecological zoning. **Journal of Pest Science**, p. 1-18, 2021.

POGUE, M. G. A world revision of the genus *Spodoptera Gueneé* (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, p. 1-201, 2002.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 63-71, jan. 2006.

SANGOI, L. et al. Response of Brazilian maize hybrids from different eras to change in plant density. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 79, p. 39-51, dez. 2002.

SANTOS, B. B. de O. **Avaliação fenológica de diferentes cultivares de milho destinados à produção de silagem**. 2019. 11 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Engenharia Agronômica) - Fundação Carmelitana Mário Palmério, Faculdade de Ciências Humanas e Sociais, Monte Carmelo, 2019.

SCHNEPF, H. E; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 5, p. 2893-2897, 1981.

SCOTON, A. M. N. et al. *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) control and productive performance of *Bt* maize genotypes. **Brazilian Journal of Agriculture v**, v. 95, n. 1, p. 68-82, 2020

SENA, J. A. D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, abr. 2009.

SOUZA, C. S. F. et al. Transfer of Cry1F from *Bt* maize to eggs of resistant *Spodoptera frugiperda*. **PloS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203791, set. 2018.

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, ago. 2010.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, p. 691-705, jan. 2000.

TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to *Bt* crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 6, p. 2011-2025, dez. 2009.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2020. **Production, Supply and Distribution Online**. Disponível em: < https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/home> Acesso em: 20 dez. 2020.

VÉLEZ, A. M. et al. Fitness costs of Cry1 F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, n. 5, p. 315-325, dez. 2014.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (*Bt*) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 03, 2010.

WICKHAM, H. **ggplot2:** Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.

YANG, F. et al. F2 screen, inheritance and cross-resistance of field-derived Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected from Louisiana, USA. **Pest Management Science**, v. 74, n. 8, p. 1769-1778, ago. 2018.

YU, S. J.; NGUYEN, S. N.; ABO-ELGHAR, G. E. Biochemical characterization of insecticide resistance in the fall armyworm. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 1, p. 1-1, set. 2003.

ZHAO, J. Z. et al. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two Bacillus thuringiensis genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, p. 8426–8430, 2005.

ZHU, C. et al. Survival and effective dominance level of a Cry1A.105/Cry2Ab2-dual gene resistant population of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) on common pyramided *Bt* corn traits. **Crop Protection**, v. 115, p. 84-91, jan. 2019.

ANEXOS

ANEXO A - Temperatura média e acumulado de chuvas mensal em Planaltina-DF

Mês	Ano	Acumulado de chuvas mensal (mm)	Temperatura Média mensal (°C)
Janeiro	2015	81,2	23,0
Fevereiro	2015	115,4	21,8
Março	2015	295,6	20,8
Abril	2015	192	21,5
Maio	2015	43,8	19,8
Junho	2015	0	19,2
Julho	2015	0,8	20,0
Agosto	2015	0	21,3
Setembro	2015	19	24,5
Outubro	2015	43	25,6
Novembro	2015	143,6	23,6
Dezembro	2015	153,2	23,2
Janeiro	2016	345	21,3
Fevereiro	2016	75,2	23,1
Março	2016	130,2	22,6
Abril	2016	9,8	22,9
Maio	2016	3,2	21,7
Junho	2016	0	20,1
Julho	2016	0	20,6
Agosto	2016	17,4	21,7
Setembro	2016	52,8	23,8
Outubro	2016	87,6	23,3
Novembro	2016	248,4	21,5
Dezembro	2016	171,2	21,9
Janeiro	2017	143,8	22,3
Fevereiro	2017	242,6	21,3
Março	2017	178	22,1
Abril	2017	25,4	22,4
Maio	2017	64,2	20,9
Junho	2017	0	19,7
Julho	2017	0	17,6
Agosto	2017	0	21,8
Setembro	2017	10	21,9
Outubro	2017	36	24,6
Novembro	2017	328,8	21,5
Dezembro	2017	263	21,4
Janeiro	2018	150	21,9
Fevereiro	2018	265	21,5
Março	2018	226,6	22,0
Abril	2018	216,8	20,5
Maio	2018	9,6	19,7
Junho	2018	0	19,4
Julho	2018	0	19,3
Agosto	2018	23	21,6
Setembro	2018	39,6	23,3
Outubro	2018	263,6	23,1
Novembro	2018	308,6	20,9
Dezembro	2018	166,4	21,7

ANEXO B - Temperatura média e acumulado de chuvas mensal em Toledo-PR

Mês	Ano	Acumulado de chuvas mensal (mm)	Temperatura Média mensal (°C)
Janeiro	2015	40,2	25,7
Fevereiro	2015	58,2	23,6
Março	2015	75,2	23,7
Abril	2015	157,4	22,0
Maio	2015	221	18,9
Junho	2015	57,8	18,7
Julho	2015	373	17,2
Agosto	2015	247	21,9
Setembro	2015	108	23,0
Outubro	2015	126,6	24,4
Novembro	2015	372	23,0
Dezembro	2015	416,8	23,8
Janeiro	2016	171,8	26,0
Fevereiro	2016	143	25,9
Março	2016	61,2	23,1
Abril	2016	94,4	23,6
Maio	2016	249,8	17,0
Junho	2016	78,6	15,0
Julho	2016	35,4	17,3
Agosto	2016	276	18,5
Setembro	2016	47,2	19,5
Outubro	2016	175	22,2
Novembro	2016	99,4	22,7
Dezembro	2016	110,4	23,6
Janeiro	2017	202,4	25,1
Fevereiro	2017	184,8	25,8
Março	2017	83	24,1
Abril	2017	210	20,5
Maio	2017	168,4	20,0
Junho	2017	65	17,6
Julho	2017	1	17,9
Agosto	2017	104,6	20,2
Setembro	2017	78	25,2
Outubro	2017	113,8	23,7
Novembro	2017	217	22,7
Dezembro	2017	293	24,3
Janeiro	2018	347,2	23,9
Fevereiro	2018	304,2	24,5
Março	2018	237,8	24,9
Abril	2018	42,2	23,2
Maio	2018	62,8	19,6
Junho	2018	85,8	16,4
Julho	2018	2,6	18,2
Agosto	2018	120,8	16,3
Setembro	2018	232	20,6
Outubro	2018	214,8	22,2
Novembro	2018	178,2	23,5
Dezembro	2018	47	25,0