

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MESTRADO EM AGRONOMIA

PAULO GALLO

EFEITO DO EVENTO MON88017 (Cry3Bb1), DE INSETICIDA E DA ÉPOCA DE
SEMEADURA NA REDUÇÃO DO DANO DE *Diabrotica speciosa* (GERMAR,
1824) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) NA RAIZ DO MILHO.

PONTA GROSSA
2012

PAULO GALLO

EFEITO DO EVENTO MON88017 (Cry3Bb1), DE INSETICIDA E DA ÉPOCA DE SEMEADURA NA REDUÇÃO DO DANO DE *Diabrotica speciosa* (GERMAR, 1824) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) NA RAIZ DO MILHO.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração agricultura.

Orientador - Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

PONTA GROSSA
2012

G172 Gallo, Paulo
Efeito do evento Mon88017 (Cry3Bb1), de inseticida e da época de
semeadura na redução do dano de *Diabrotica Speciosa* (Germar, 1824)
(Coleoptera:Chrysomelidae) na raiz do milho / Paulo Gallo. Ponta
Grossa, 2012.
75 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração :
Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez.

1. Acamamento. 2 . Larva de *Diabrotica*. 3. Fiproni. 4. Toxina
Cry3Bb1. 5. *Bacillus thuringiensis*. 6. Manejo de praga I. Sosa-Gómez,
Daniel Ricardo . II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado
de Agronomia. III. T.

CDD: 630.7



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

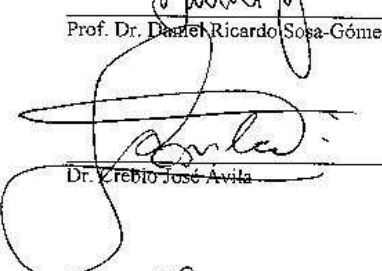
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “Efeito do evento MON88017 (Cry3Bb1), de inseticida e épocas de semeadura sobre o dano de *Diabrotica speciosa* (GERMAR, 1824) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) na raiz do milho”.

Nome: Paulo Gallo

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Aprovado pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez
Dr. Zélio José Ávila
Dra. Ana Paula Schneid Afonso da Rosa

Data da Realização: 13 de novembro de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, alegrias e coisas boas que tem me oferecido e por me proteger nos momentos difíceis, dar-me força para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A todos da minha família que acompanharam de perto minha trajetória durante esses quase dois anos de dedicação ao mestrado.

À Beatriz por estar sempre do meu lado com incentivo, apoio e compreensão não me deixando desistir.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente.

Ao professor e orientador Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez pela dedicação, apoio e compreensão durante o período de orientação.

Aos professores convidados da banca examinadora por aceitarem o convite e pela contribuição positiva na melhoria deste trabalho.

À Fundação ABC pela confiança e apoio na implantação, condução, avaliação e análise dos dados dos experimentos.

Aos colegas de trabalho Vanderlei Aparecido dos Santos, Jefferson Ramon Gonçalves de Oliveira, Ronaldo Rodrigues da Silva, Marcelo da Silva, Charles Almeida Lara e Nelson Ribeiro de Lima pelo empenho e dedicação durante o período de condução dos experimentos no campo.

Aos colegas Elderson Ruthes, Rodrigo Yoti Tsukahara, Patricia Aparecida Calisz Baptista, Rafael Mazer Etto e Carolina Weigert Galvão pelo incentivo e contribuição positiva no desenvolvimento deste trabalho.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe”.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A presença de larva de *Diabrotica speciosa* danifica o sistema radicular do milho e causa redução na produtividade de grãos, principalmente nas lavouras de segunda safra. A aplicação de inseticida no sulco de semeadura pode ser eficaz, porém, esta forma de controle assume caráter preventivo e implica maior custo de produção e impacto ambiental. Avaliaram-se a eficácia dos genótipos AG7000RW e DKB330RW (Cry3Bb1) e de suas isolíneas na redução do dano da larva de *D. speciosa* na raiz do milho, a eficácia do inseticida fipronil aplicado no sulco de semeadura e o efeito da interação de ambos os tratamentos sobre a produtividade dos genótipos de milho, bem como a época de semeadura em que ocorre maior dano da larva. O experimento de eficácia foi instalado em Itaberá, SP, na safra 2011/2012, sob sistema de plantio direto na palha após cultura de aveia. Os danos nas raízes foram avaliados aos 52 dias após a emergência, atribuindo-se nota visual de acordo com sua intensidade. O acamamento foi determinado contando-se as plantas com inclinação maior que 25° em relação ao próprio eixo no momento da colheita. Os genótipos AG7000 e DKB330 sem inseticida apresentaram dano, e as notas resultantes foram 1,62 e 1,85, enquanto as notas de suas isolíneas *Bt* foram 0,25 e 0,24, respectivamente. Os genótipos AG7000 e AG700RW obtiveram os maiores percentuais de matéria e quantidade de massa seca na raiz em relação a DKB330 e DKB330RW, independentemente da aplicação do inseticida. O acamamento de 46,7% encontrado para o genótipo DKB330 sem aplicação de inseticida refletiu negativamente na produtividade deste tratamento. Por outro lado, com a aplicação de inseticida, o acamamento variou de 0,2% a 2,2% entre os genótipos, não influenciando sua produtividade. A proteína Cry3Bb1 foi eficaz na redução dos danos na raiz independentemente do genótipo testado. Genótipos com alto potencial produtivo e com menor massa de raiz podem apresentar maior resposta de produtividade quando protegidos com a toxina ou o inseticida na presença de alta população de larvas. Na safra 2010/2011, avaliaram-se os danos na raiz do milho não *Bt* em quatro épocas de semeadura em Itaberá (14/10, 3/11, 25/11 e 20/12) e três em Castro, PR (29/9, 21/10 e 11/11). Na safra seguinte, de 2011/2012, avaliaram-se seis épocas em Itaberá (21/9, 18/10, 21/11, 28/12, 30/1 e 20/2) e quatro em Castro (20/9, 10/10, 30/10 e 20/11). Constatou-se que, a partir da segunda época, os danos na raiz atingiram nota superior a 3,0 e permaneceram acima de 4,0 em todas as demais épocas de semeadura em Itaberá, nas duas safras avaliadas. Em Castro, apenas a semeadura de 20/11/2011 atingiu nota superior a 3,0. A utilização da proteção na raiz do milho, pela utilização de inseticida ou toxina, apresentou maior resposta nas semeaduras realizadas a partir do mês de outubro na região de Itaberá.

Palavras-chave: Acamamento. Larva de *Diabrotica*. Fipronil. Toxina Cry3Bb1. *Bacillus thuringiensis*. Manejo de praga.

ABSTRACT

The presence of *Diabrotica speciosa* larvae causes damage to corn root system and reduction in grain yield, mainly in second season crops. Applying insecticide in the seed furrow can be effective, but this assumes a form of preventive control and implies higher production costs and environmental impact. We evaluated the efficacy of genotypes AG7000RW and DKB330RW (Cry3Bb1) and their isolines to reduce the damage caused by *D. speciosa* larvae to corn root system, the efficacy of the insecticide fipronil applied in the furrow, and the effect of the interaction of both treatments on the yield of maize hybrids, as well as the planting date when the most severe damage occurs. The efficacy experiment was carried out in Itaberá, SP, in no-till planting system after oat crop. The damage to the roots was evaluated 52 days after emergence, using a visual score according to its intensity. Stalk lodging was determined by counting the plants leaning more than 25° in relation to its own axis at harvest. Genotypes AG7000 and DKB330 with no insecticide application presented damage and the resulting scores were 1.62 and 1.85, whereas the scores of their *Bt* isolines were 0.25 and 0.24, respectively. Genotypes AG7000 and AG700RW had the highest percentage of matter and amount of dry root in relation to DKB330 and DKB330RW, regardless of insecticide application. Stalk lodging of 46.7% found in non-*Bt* genotype DKB330 with no insecticide application reflected negatively on the yield of this treatment. In contrast, with insecticide application, stalk lodging ranged from 0.2% to 2.2% between genotypes, not influencing their yield. Cry3Bb1 protein was effective in reducing the damage to the root regardless of the genotype tested. Genotypes with high yield potential and lower root mass may present higher yield response when protected by the toxin or insecticide in the presence of a large larval population. In the 2010/2011 season, we assessed the damage in non-*Bt* corn root at four planting dates in Itaberá (10/14, 11/3, 11/25, and 12/20) and three in Castro, PR (9/29, 10/21, and 11/11). In the following season, 2011/2012, we evaluated six planting dates in Itaberá (9/21, 10/18, 11/21, 12/28, 1/30, and 2/20) and four in Castro (9/20, 10/10, 10/30, and 11/20). We observed that, from the second planting date on, the root damage reached scores over 3.0 and remained above 4.0 in all other planting dates in Itaberá in both seasons. In Castro, only the seeding performed in 11/20/2011 reached a score above 3.0. The use of protection in corn root, by applying insecticide or toxin, presented a greater response in sowing carried out from October on in the region of Itaberá.

Keywords: Stalk lodging. Corn rootworm. Fipronil. Cry3Bb1 toxin. *Bacillus thuringiensis*. Pest management.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina Cry3D em Lepidoptera em nível molecular – (adaptada de PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2012).	26
FIGURA 2 - Número médio de adultos de <i>D. speciosa</i> capturados com rede entomológica de 35 cm de diâmetro em 15 pontos com sete redadas sobre uma linha de feijão. Itaberá - SP, 2012.	42
FIGURA 3 - Temperaturas máxima, mínima e média observadas em abrigo durante a condução do experimento. Itaberá - SP, 2012.....	43
FIGURA 4 - Balanço hídrico sequencial utilizando a evapotranspiração potencial por Penman-Monteith durante a condução do experimento. Itaberá - SP, 2012.	44
FIGURA 5 – Caracterização dos danos da larva de <i>D. speciosa</i> na raiz do milho. Sintoma de dano nas raízes e consequente curvatura do colmo (a), coroa da raiz adventícia totalmente destruída pela larva (b) e galeria deixada pela larva após a alimentação (c).	46
FIGURA 6 – Avaliação da consistência (0,25) realizada aos 52 DAE na fase VT. Itaberá - SP, 2012.	49
FIGURA 7 - Porcentagem de matéria seca na raiz avaliada aos 52 DAE na fase VT. Itaberá - SP, 2012.	52
FIGURA 8 - Dados envolvendo todas as parcelas do experimento demonstrando a relação entre dano, acamamento e produtividade total. Itaberá SP – 2012.	58
FIGURA 9 - Comparativo da relação de dano, acamamento e produtividade total entre os genótipos AG7000/7000RW e DKB330/330RW. Itaberá SP- 2012.	59
FIGURA 10 - Dano médio na raiz do milho na testemunha, de acordo com a época de semeadura no genótipo P30F53H em Itaberá – SP, safras 2010/2011 (a) e 2011/2012 (b). A linha tracejada no gráfico indica o nível de dano econômico segundo Hills e Peters (1971).	60
FIGURA 11 – Época e área média semeada com a cultura do feijão, soja e milho nas safras 2009/10, 2010/11 e 2011/12 na região de condução do experimento de eficácia. Amostra composta por 13 municípios para a cultura do feijão totalizando uma área de 14.480 hectares, 19 municípios para o milho com 23.830 hectares e 17 municípios para a cultura da soja com 23.830 hectares. Itaberá – SP, 2012.	61
FIGURA 12 - Dano médio na raiz do milho na testemunha, de acordo com a época de semeadura no genótipo P30F53H em Castro – PR, safras 2010/2011(a) e 2011/2012 (b). A linha tracejada no gráfico indica o nível de dano econômico segundo Hills e Peters (1971).	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características químicas do solo onde foi conduzido o experimento – Itaberá São Paulo - 2012.....	31
TABELA 2 - Características agronômicas apresentadas pelos genótipos utilizados no experimento – Itaberá São Paulo - 2012.....	31
TABELA 3 - Esquema da análise de variância (ANOVA) aplicada no experimento de eficácia – Itaberá São Paulo - 2012.....	34
TABELA 4 - Descrição detalhada da escala de nota para avaliação de sintomas de injúria nas raízes do milho aplicada no experimento.....	35
TABELA 5 – Local, safra, data de semeadura, avaliação de raiz e estágio fenológico do milho em Itaberá, São Paulo e Castro, Paraná.....	40
TABELA 6 - Dano médio nas raízes (0,00-3,00) ocasionado pela alimentação da larva de <i>D. speciosa</i> nos diferentes tratamentos, avaliado aos 52 DAE (Dias Após a Emergência) na fase VT, Itaberá - SP, 2012. Os valores mostrados referem-se aos dados não transformados, porém na análise estatística foi utilizada a seguinte transformação ($tdan = dan^{-1,5}$).....	45
TABELA 7 - Avaliação da consistência 0,25, 0,50 e 0,75 com a interação aberta por inseticida realizada aos 52 DAE na fase VT. Itaberá São Paulo, 2012.....	50
TABELA 8 - Massa de matéria seca (g) de dez raízes avaliadas aos 52 DAE na fase VT. Itaberá - SP, 2012.	53
TABELA 9 - Plantas com sintoma de acamamento (%) avaliado aos 121 DAE no momento da colheita Itaberá - SP, 2012. Os valores mostrados referem-se aos dados não transformados, porém na análise estatística foi utilizada a seguinte transformação ($tacam = acam^{-0,5}$).....	54
TABELA 10 - Avaliação de produtividade das plantas acamadas ($kg\ ha^{-1}$) realizada no momento da colheita aos 121 DAE. Itaberá - SP, 2012.	56
TABELA 11 - Produtividade total ($kg\ ha^{-1}$) - soma da produtividade das plantas com e sem sintomas de acamamento em colheita realizada aos 121 DAE. Itaberá - SP, 2012.	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 DISTRIBUIÇÃO E COMPORTAMENTO DE <i>D. speciosa</i> NO BRASIL	18
3.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS, CICLO DE VIDA E PLANTAS HOSPEDEIRAS DE <i>D. speciosa</i>	19
3.3 DANOS DE <i>D. speciosa</i> NA CULTURA DO MILHO	20
4. FATORES QUE INFLUENCIAM A OCORRÊNCIA DE <i>D. speciosa</i>	22
4.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE <i>D. speciosa</i>	22
4.2 TIPOS DE SOLO E TEOR DE UMIDADE	22
5. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E MECANISMO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY	24
6. IMPORTÂNCIA DA ÁREA DE REFÚGIO PARA O MANEJO DE POPULAÇÕES DE <i>D. speciosa</i>	27
7. MATERIAIS E MÉTODOS	29
7.1 EFICÁCIA DE GENÓTIPOS DE MILHO CONTENDO O GENE Cry3Bb1 NA REDUÇÃO DE DANO DE <i>D. speciosa</i>	29
7.1.1 Clima, solo e adubação	29
7.1.2 Genótipos utilizados, tratamento de semente, pulverização do inseticida no sulco e semeadura do feijão para atração dos adultos	30
7.1.3 Tratos culturais	33
7.1.4 Delineamento experimental	33
7.2 AVALIAÇÕES	34

7.2.1 Estande inicial e final, dano na raiz, massa seca na raiz e número de espigas.....	34
7.2.2 Avaliação de acamamento e colheita	36
7.2.3 Monitoramento e coleta de adultos de <i>D. speciosa</i>	37
8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ÉPOCA DE SEMEADURA SOBRE O DANO	
DE <i>D. speciosa</i> EM RAIZ DE MILHO	38
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
9.1 EFICÁCIA DE GENÓTIPOS DE MILHO EXPRESSANDO A TOXINA	
Cry3Bb1 NA REDUÇÃO DE DANO DE <i>D. speciosa</i>	41
9.1.1 Monitoramento de adultos de <i>D. speciosa</i>	41
9.1.2 Clima	42
9.1.3 Comparação de estande inicial e final, massa de mil grãos e percentual de	
ardidos e número de espigas por planta nos tratamentos avaliados	44
9.1.4 Avaliação do dano da larva de <i>D. speciosa</i> na raiz do milho	45
9.1.5 Avaliação da consistência das notas de dano na raiz	48
9.1.6 Avaliação do percentual de massa seca da raiz	51
9.1.7 Avaliação da massa seca da raiz	52
9.1.8 Avaliação do percentual de plantas acamadas	53
9.1.9 Avaliação da produtividade das plantas acamadas.....	54
9.1.10 Avaliação da produtividade total.....	56
10. EFEITO DA ÉPOCA DE SEMEADURA SOBRE O DANO DE <i>D. speciosa</i>	
EM RAIZ DE MILHO	60
10.1 AVALIAÇÃO DE DANO NA RAIZ DO MILHO EM ITABERÁ - SP	60
10.2 AVALIAÇÃO DE DANO NA RAIZ DO MILHO EM CASTRO - PR	62
11. CONCLUSÕES.....	64
12. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÊNDICE.....	74
ANEXO	75

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a cultura do milho ocupou área semeada de aproximadamente 15.128 milhões de hectares na safra 2011/2012, sendo 7.940 na primeira safra e 7.188 na segunda safra (22% maior em relação a safra anterior), com a região Centro-Oeste do país semeando uma área expressiva após a colheita da soja (CONAB, 2012).

O Paraná é líder na produção brasileira de milho, participando, em média, com 23% da produção total do país e com consumo médio estimado deste cereal no estado ao redor de 8,8 milhões de toneladas anuais das quais 70% é destinada à alimentação animal, principalmente para a avicultura de corte e suinocultura que são responsáveis pelo consumo de 62% (SEAB, 2011).

Com o incremento da área de milho de segunda safra, tem aumentado a incidência de larvas de *Diabrotica speciosa* as quais causam consideráveis danos ao sistema radicular dessa gramínea, especialmente em sistema de plantio direto na palha (GASSEN, 1994). *D. speciosa* é uma praga polífaga que afeta diversas culturas no Brasil (HAJI, 1981; GASSEN, 1989). A semeadura de milho após feijão, na presença de plantas voluntárias de feijão, apresenta os maiores riscos devido ao aumento da densidade dos adultos deste inseto que se alimentam da área foliar desta cultura. O controle do adulto por meio da aplicação de inseticidas químicos foliares não tem se mostrado eficiente devido às constantes reinfestações provenientes de áreas vizinhas (MARTINEZ, 2003).

Nas condições do Brasil, entender a bioecologia deste inseto na cultura do feijão e da batata é fundamental para se definir medidas de controle na cultura do milho. Em experimento conduzido em condições controladas, Carvalho e Hohmann (1982) utilizaram plantas de feijão para estimar consumo foliar médio de *D. speciosa* obtendo valores de 0,70 cm² por adulto por dia, podendo atingir 10,32 cm² durante toda a fase adulta.

Estudo realizado com a cultura do feijão em seu estágio inicial mostrou que cada inseto adulto de *D. speciosa* provocou 7,8%, 5,6% e 3,2% de redução foliar nas plantas com uma, duas e três semanas de idade, respectivamente (SILVA et al., 2003). O controle do adulto nos nossos sistemas de cultivo é realizado quase que exclusivamente com pulverizações de inseticidas sintéticos resultando em

constantes reinfestações o que leva os agricultores a repetir as aplicações (ARRUDA-GATTI; VENTURA, 2003).

A aplicação de inseticida no sulco de semeadura (líquido ou granulado) proporcionou redução no dano da larva de *D. speciosa* na raiz do milho e no acamamento de plantas, resultando em 54% de aumento no rendimento de grãos; a mesma resposta não foi observada com a aplicação via tratamento de sementes, devido à baixa dose, pequena distribuição no solo e seu curto efeito residual (VIANA; MAROCHI, 2002). Segundo Ávila e Gomez (2001) a aplicação dos inseticidas terbufós, clorpirifós e fipronil no sulco de semeadura, concomitantemente à operação de semeadura do milho, oferecem uma alternativa eficiente no controle de larva de *D. speciosa* nesta cultura.

Estudo realizado para avaliar o número de larva por planta capaz de causar dano em raiz de milho foi conduzido em vasos contendo vermiculita como substrato. Utilizou-se, então, 0, 40, 80, 160 e 320 larvas por planta, infestada aos sete dias após a emergência, onde se concluíram que menos de 40 larvas são suficientes para reduzir o peso seco da raiz, peso seco da parte aérea e a altura de planta em relação ao tratamento sem a presença da larva (MARQUES; ÁVILA; PARRA, 1999). Gassen (1994; 1996) propõe que dez larvas *D. speciosa* por raiz de milho são capazes de causar dano suficiente para causar acamamento das plantas e consequente redução da produção de grãos.

Segundo estimativa realizada por Mitchell (2002), considerando-se as condições típicas de pressão populacional de larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) nos EUA, a utilização de híbridos que expressam a proteína Cry3Bb1 oferecerá um maior rendimento de grãos entre 9-28% em relação aos não *Bt* sem controle, e em torno de 1,5-4,5% aos não *Bt* tratados com inseticida de solo.

Diabrotica v. virgifera, nos Estados Unidos da América, causa prejuízo de um bilhão de dólares anuais aos agricultores americanos incluindo perdas na produtividade e custo com controle (CHANDLER, 2003). No Brasil em condições de alta densidade de larva presente na raiz, tem-se relatado redução na produtividade que pode variar entre 10 e 13% na cultura do milho (VIANA, 2010).

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficácia de genótipos de milho que expressam a proteína Cry3Bb1, de inseticida aplicado no sulco e da época de semeadura na redução do dano *D. speciosa* na raiz do milho.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possíveis diferenças na eficácia da redução de dano entre os genótipos AG7000RW⁽¹⁾ e DKB330RW;
- Avaliar a eficácia da aplicação de inseticida pulverizado no sulco de semeadura na redução do dano na raiz, comparado ao uso de plantas geneticamente modificadas;
- Avaliar o efeito dos inseticidas e genótipos sobre a produtividade de grãos de milho;
- Avaliar o acamamento de plantas, sua produção de grãos e seu efeito sobre a produção total;
- Avaliar o efeito dos inseticidas e genótipos sobre o percentual e a quantidade de massa seca da raiz, estande inicial e final;
- Avaliar o efeito da época de semeadura sobre a intensidade de danos na raiz do milho.

⁽¹⁾ RW refere-se ao Inglês Corn Rootworm.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Experimentos conduzidos pela Fundação ABC desde a década de noventa demonstram que o manejo de *D. speciosa* na cultura do milho torna-se difícil devido ao dano da larva ocorrer na raiz e que depois de constatado não é possível adotar ações curativas. Até o momento é possível, através de levantamentos, identificar apenas a região onde ocorre maior frequência e intensidade de dano dentro das épocas de semeadura do milho.

A adoção da rotação de culturas, com a presença da soja, feijão, batata, milho, aveia, azevém e trigo, proporciona abundância de alimento com qualidade e boa distribuição durante o ano todo para as larvas e adultos. Esta prática é um aliado importante a favor da praga, pois a alimentação de boa qualidade na fase larval é decisiva para a viabilidade e boa capacidade reprodutiva do adulto (MILANEZ, 1995).

O adulto, após a sua emergência do solo, voa para o interior das lavouras de milho para realizar a postura. A atividade de voo dos insetos é muito variável e pode ser influenciada por fatores bióticos e abióticos, e a sua compreensão pode ser útil para melhorar a eficácia de programas de manejo de pragas (NAVA; ÁVILA; PARRA, 2004).

Segundo EMBRAPA (2004), as larvas atacam o sistema radicular do milho causando expressivos prejuízos nas lavouras de segunda safra nos estados do Sul e em algumas áreas das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

A aplicação de inseticida granulado ou pulverizado no sulco de semeadura pode ser eficaz, porém devido ao desconhecimento da técnica de previsão de ocorrência desta praga no Brasil, esta forma de controle assume um caráter preventivo (GASSEN, 1996).

A possível utilização da biotecnologia pelos produtores brasileiros para manejar esta praga através da utilização dos genótipos geneticamente modificados que expressam uma ou mais proteínas tóxicas depende das informações que devem ser geradas no campo, visto que não existe informação local.

Experimentos de campo conduzidos por Steffey et al. (2006) demonstraram que genótipos YGRW apresentaram dano médio acima do aceitável recebendo

nota de dano de 3,15 em julho e 3,60 em agosto (escala 1-6), com consequente presença de plantas com sintomas de acamamento.

Estudos realizados sobre o comportamento da alimentação de larva de *D. v. virgifera* sobre genótipo com o evento MON863 (Cry3Bb1) demonstraram dois tipos de comportamento: no primeiro as larvas apresentavam tecido de raiz no sistema digestivo, indicando alimentação, segmentos abdominais reduzidos e pequeno movimento corporal. No segundo as larvas apresentavam deslocamento no sentido vertical da massa de raiz, com fragmentos de raízes nas mandíbulas, sistema digestivo vazio indicando ausência de alimentação e morrendo provavelmente devido à inanição, indicando uma possível não preferência por raízes com a toxina (CLARK et al., 2006).

Entre os benefícios esperados nos Estados Unidos da América com o uso desta tecnologia estão incluídos: aumento na proteção das raízes, redução do uso de inseticida aplicado no momento da semeadura, redução do tempo destinado ao manuseio de produtos e máquinas para aplicação e consequente melhora na eficiência das semeadoras, redução da incidência de plantas com podridão de colmo, redução do impacto ambiental negativo causado pelo uso de inseticidas, economia de água utilizada na aplicação dos inseticidas, entre outros (RICE, 2004).

3.1 DISTRIBUIÇÃO E COMPORTAMENTO DE *D. speciosa* NO BRASIL

Devido à oferta de alimento e adaptação climática, esta espécie é encontrada em todas as regiões agrícolas do país. A vaquinha é o besouro facilmente encontrado causando danos econômicos nas culturas do feijão e hortaliças. A fase larval é uma das principais pragas em milho e milheto no sul do Brasil atacando as raízes adventícias e causando o tombamento de plantas (GASSEN, 2002).

Em condições de campo, na cultura do feijão, a maior parte dos adultos de *D. speciosa* foi encontrada na parte superior das plantas, independentemente do período do dia, porém as atividades de alimentação, movimentação e voo foram correlacionadas positivamente com o aumento da temperatura do ambiente (LAUMANN et al., 2003). Os adultos apresentam maior atividade de voo na cultura do milho, independente do sexo, entre 17 e 19 horas (NAVA, ÁVILA; PARRA, 2004).

3.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS, CICLO DE VIDA E PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *D. speciosa*

O adulto de *D. speciosa* possui coloração esverdeada, antenas escuras, cabeça variando do pardo avermelhado ao negro e labro, escutelo, metatorax, tíbias e tarsos negros; em cada élitro apresenta três manchas transverso-ovais, de coloração amarela (HAJI, 1981). Os ovos são de cor alaranjada medindo menos de 0,5 mm de diâmetro. As larvas apresentam aproximadamente um centímetro de comprimento e são afiladas na extremidade anterior. Apresentam coloração branca com placa anal e cabeça preta (GASSEN, 1984).

D. speciosa passa por três instares larvais e o ciclo biológico completo transcorre num período inferior a dois meses, permitindo fazer entre cinco e seis gerações por ano já que não ocorre diapausa no inverno (GASSEN, 1996). O adulto faz a postura na superfície do solo e na base das plantas hospedeiras (GASSEN, 1994).

Os ovos apresentam um período de incubação médio de 8,8 dias a temperatura de 25°C. O período larval dura, em média, 17,5 dias a uma temperatura de 25°C e umidade relativa de 60%. Completado o período larval, estas constroem abrigos (câmara pupais), para se transformarem em pré-pupa e pupa. As fases de pré-pupa e de pupa transcorrem em 4,8 e 6,9 dias, respectivamente (MILANEZ, 1995).

A cópula desta espécie predomina no período noturno (18 às 24hs) e possui uma duração média de 2,7 horas. Fêmeas com idade superior a três dias apresentam capacidade de atração dos machos através dos feromônios sexuais e em alguns casos compostos cuticulares agem como feromônio sexual de contato (NARDI, 2010).

Os adultos da *D. speciosa* alimentam-se de folhas de feijão, girassol, ervilhaca, abóbora, hortaliças em geral e milho dentre outras culturas (VIANA: MAROCHI, 1995).

Fêmeas adultas alimentadas com folhas de batata e feijão demonstraram capacidade superior de postura em relação a soja e milho podendo este comportamento estar relacionado ao teor de nitrogênio na folha destas culturas, porém ao avaliar a sobrevivência de grupo de adultos alimentados com as mesmas folhas apenas no milho ocorreu significativa mortalidade a partir do sétimo dia

acumulando mais de 90% aos 22 dias (ÁVILA: PARRA, 2002). Bitencourt (2007) demonstrou que fêmeas adultas alimentadas com folhas de trigo e milho realizaram oviposição de um reduzido número de ovos ou não realizaram oviposição respectivamente, indicando que estas espécies não são hospedeiras adequadas para a alimentação da fase adulta.

De acordo com Nardi (2010), estudando-se os estímulos olfativos envolvidos na seleção hospedeira de *D. speciosa*, observou-se que as fêmeas fecundadas, aparentemente, são repelidas pelos voláteis produzidos por plantas atacadas por larvas.

As larvas se alimentam de raízes com preferência pelas de gramíneas ou tubérculos de batata. Milanez (1995) utilizando teste de livre escolha comparou a preferência de postura de *D. speciosa* em plantas hospedeiras, sendo a do milho à preferida como local para oviposição quando comparada à soja, feijão, arroz e o solo nu.

Segundo Ávila e Parra (2002) radículas de milho e tubérculos de batata enraizada constituíram os melhores alimentos para o desenvolvimento de larvas de *D. speciosa*, enquanto as folhas de batata e feijão foram os alimentos mais adequados para os adultos.

3.3 DANOS DE *D. speciosa* NA CULTURA DO MILHO

Os sintomas podem ser descritos como escoriação nas raízes primárias, formando galerias e destruição das raízes secundárias, consequências da alimentação da fase larval do inseto. Quando os danos ocorrem nas raízes adventícias estes provocam o tombamento das plantas denominado de "pescoço de ganso" ou "milho-ajoelhado" (GASSEN, 1996).

Segundo Fancelli (2000) o potencial de produção do milho é definido entre a fase de quatro a seis folhas expandidas, e a confirmação do número de fileiras da espiga ocorrerá entre a sétima e nona folha expandida; portanto estresse nesta etapa do crescimento resulta em redução de produtividade. O consumo da raiz reduz a capacidade da planta de absorver água e nutrientes, tornando-a menos produtiva como também mais suscetível às doenças radiculares e ao tombamento, o que acarreta perdas da produção (KHALER et al., 1985).

Plantas com danos moderados a severos nas raízes estão sujeitas ao acamamento e, como consequência, produzem espigas menores e, conseqüentemente, as perdas na colheita mecanizada são maiores devido à dificuldade de recolhimento pela plataforma da colhedora (WEDBERG, 1996). As espigas produzidas pelas plantas caídas poderão entrar em contato com o solo proporcionando condições favoráveis para a infecção por fungos e/ou germinação dos grãos em épocas chuvosas.

Segundo Viana e Marochi (2002) em estudo conduzido na área de atuação da FUNDAÇÃO ABC durante três anos (1993-1995), as perdas de produtividade foram maiores quando a cultura foi conduzida em condições de estresse hídrico.

4. FATORES QUE INFLUENCIAM A OCORRÊNCIA DE *D. speciosa*

Os fatores que afetam a ocorrência de *D. speciosa* podem ser divididos em abióticos (temperatura, umidade e tipo de solo) e bióticos (tipos de alimento e inimigos naturais).

4.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE *D. speciosa*

A fisiologia, tanto do adulto como das formas imaturas, é afetada diretamente pela temperatura. Quando submetidos à temperatura de 18, 20, 22, 25, 30 e 32°C a viabilidade dos ovos variou de 67 a 82%, não apresentando diferença significativa entre as temperaturas avaliadas; por outro lado, larvas mantidas a temperaturas entre 20 e 30°C apresentaram sobrevivência entre 48,4 e 59,2%, reduzindo para 28% quando mantida nas duas temperaturas extremas 18 e 32°C (MILANEZ; PARRA, 2000a).

A sensibilidade de ovos de *Diabrotica viridula* a baixa temperatura é maior que a de *D. speciosa* (CABRERA WALSH, 2003). *D. viridula* parece se comportar como uma espécie mais vigorosa em relação a *D. speciosa* demonstrando um tempo médio de vida e fertilidade maior em laboratório; no entanto, em condições não controladas apresenta maiores restrições para realização da postura em ambiente com baixa temperatura, por isso espera-se sua distribuição em regiões tropicais e subtropicais com pequena frequência em áreas temperadas (CABRERA WALSH, 2005).

O multivoltinismo e a não ocorrência de diapausa nos ovos, já foi demonstrada para outras espécies de *Diabrotica* da América do Sul (CABRERA WALSH, 2003).

4.2 TIPOS DE SOLO E TEOR DE UMIDADE

Milanez e Parra (2000b) estudaram a preferência de oviposição de *D. speciosa* em quatro tipos de solos e níveis diferentes de umidade e de maneira geral as fêmeas realizaram postura de um maior número de ovos em solos escuros com maiores teores de matéria orgânica e com teor de umidade entre 26 e 63%.

A umidade do solo está diretamente ligada ao conteúdo de argila, à profundidade no solo e à topografia da área, sendo a umidade um dos fatores que afetam o comportamento de postura das fêmeas.

Fêmeas de *D. v. virgifera* preferem fazer posturas em solos mais úmidos, e nas fissuras, protegendo os ovos de predadores e da dessecação devido à falta de umidade (TURPIN, 1972).

O intervalo ideal de umidade do solo para postura de *D. speciosa* está entre 26 e 63%, sendo que em solos mais secos com teores abaixo de 22% as fêmeas evitam realizar a postura (MILANEZ, 1995). No Brasil a maior área cultivada com milho não utiliza irrigação e se encontra em solos bem drenados com disponibilidade irregular de água da chuva, provocando frequentes períodos de estresse hídrico durante o ciclo da cultura, podendo afetar organismos sensíveis à falta de umidade do solo, como as larvas de *Diabrotica*.

As larvas de *D. v. virgifera* recém-eclodidas precisam movimentar-se no interior da camada do solo à procura de alimento, e as partículas grosseiras de areia presentes no solo podem causar efeito abrasivo danificando suas cutículas em ambiente seco, podendo levá-las à morte devido à desidratação (TURPIN, 1972). A redução do teor de areia, ou aumento do conteúdo de argila do solo aumenta a sobrevivência das larvas de *D. v. virgifera* no campo (TURPIN; PETERS, 1971).

A influência destes fatores sobre *D. speciosa* precisam ser mais bem estudados, devido à postura ocorrer na base das plantas e no momento da eclosão a larva está próxima da raiz, reduzindo a necessidade de movimentação no interior do solo em busca de alimento.

Tanto o tipo quanto a cor do solo afetam o comportamento dos adultos de *D. speciosa*. Comparando quatro tipos de solo, Milanez (1995) verificou que em Terra Roxa Estruturada Distrófica, as fêmeas de *D. speciosa* colocaram cerca de cinco vezes mais ovos em relação ao Latossolo Roxo Distrófico, Cambissolo Húmico Álico e Terra Roxa Estruturada Latossólica. Apenas a cor do substrato é suficiente para interferir no comportamento do adulto.

Entretanto, a quantidade de ovos colocada pela fêmea de *D. speciosa* foi cerca de seis vezes maior nas cores escuras (preta e verde), em comparação às claras (vermelha, amarela e branca) todas incorporadas em gaze (MILANEZ, 1995).

5. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E MECANISMO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY

As toxinas Cry são classificadas baseando-se na sequência primária em aproximadamente 70 tipos (Cry1 a Cry70) e diversos subtipos (ex: Cry1Aa e Cry1Ba). Existe uma alta especificidade entre tais tipos, sendo ativas apenas contra um número limitado de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e nematoides (CRICKMORE et al., 1998; BRAVO et al., 2007). A família de toxinas Cry3D representa o maior grupo, com mais de 53 diferentes tipos. Os demais tipos estão divididos nas demais famílias de toxinas Cry mosquitocida (Mtx), binária (Bin) e a Cyt (CRICKMORE et al., 2011).

A estrutura tridimensional é conservada entre os membros da família Cry3D, sugerindo que os membros desta proteína podem dividir mecanismo de ação similar embora apresentem pequena similaridade na sequência dos aminoácidos. A estrutura da proteína Cry3Bb1 apresenta três domínios: o domínio I é composto pelos resíduos 64-294 distribuídos em sete alfa-hélices que formam uma super hélice ao redor de uma hélice central, o domínio II composto pelos resíduos 295-503 que estão distribuídos em três folhas betas antiparalelas e o domínio III composto pelos resíduos 504-652 distribuídos em duas folhas betas antiparalelas (GALITSKY et al., 2001).

Dois modelos têm sido postulados para o modo de ação das toxinas Cry3D: o da formação de poro e o da sinalização celular, sendo o primeiro mais aceito (SOBERÓN et al., 2009).

Segundo Fabrick et al. (2009) existem semelhanças no modo de ação da proteína Cry3D em Lepidoptera e Coleoptera sendo a caderina o receptor chave para as toxinas Cry em ambas as ordens. Em Lepidoptera, a toxina Cry1A é ativada por uma protease e se liga em receptores da caderina na superfície apical da membrana do intestino médio. A morte da célula é devido à ativação de uma via de sinalização intracelular, ou através da formação de oligômeros de toxina que se ligam a aminopeptidase-N (APN) e/ou fosfatase alcalina (ALP) para formação dos poros na membrana resultando no desequilíbrio osmótico da célula. A figura 1 representa esquematicamente o mecanismo de ação em nível molecular da toxina Cry3D em Lepidoptera.

Estudos realizados por Murdock et al. (1987) sugerem que a proteinase thiol-dependente ativa em pH ácido no intestino médio do inseto está presente entre muitas espécies de Coleoptera, atuando como enzima digestiva. Em seguida, no intestino médio a toxina Cry3 interage com uma ADAM específica (desintegrina e metaloprotease) e a toxina se liga à caderina resultando na sua oligomerização. Apesar da reduzida informação a respeito de receptores específicos para as toxinas Cry3 em Coleoptera, no intestino médio, sabe-se que a transcrição para caderina em *D. v. virgifera* é mais abundante no primeiro, segundo e terceiro instar larval e parece ser reduzida em pupas, retornando em adultos, estando a expressão limitada ao intestino médio não sendo encontrada em tegumento ou gordura corporal (SAYED et al., 2007).

O conhecimento do mecanismo de ação das proteínas Cry é fundamental devido ao uso crescente de plantas que expressam as toxinas *Bt*, particularmente em sistemas de cultivo onde refúgio não é regulamentado por lei e a seleção de insetos resistentes provavelmente se tornará um problema, com isto novas formas de combater a resistência precisam ser desenvolvidos e colocadas em prática muito em breve, além das estratégias de piramidação de genes e de alta dose (BRAVO; SOBERÓN, 2008).

Identificar os níveis de expressão da proteína Cry3D nas culturas em seus diferentes órgãos e fases de crescimento torna-se necessário para melhor traçar planos de manejo de resistência. Ao analisar tecidos provenientes das raízes, colmos, folhas baixas e superiores de milho MON88017, Nguyen e Jehle (2009) demonstraram que os níveis de expressão da proteína Cry3Bb1 são menores nestes tecidos a partir do estágio fenológico de nove folhas abertas até grão massa seca (45% matéria seca) e que a quantidade total de proteína produzida por hectare no final do ciclo é maior devido o aumento da biomassa na planta. Estudo conduzido por Meissle; Pilz e Romeis (2009) demonstraram que larvas de segundo instar de *D. v. virgifera* que se alimentaram em raízes de plântulas de milho que expressavam a proteína Cry3Bb1 não diferiram em mortalidade daquelas que se alimentaram das raízes de plântulas não *Bt*, sugerindo que os níveis observados de Cry3Bb1 nos tecidos de raízes do milho *Bt* podem ser suficientes para afetar apenas o primeiro instar larval.

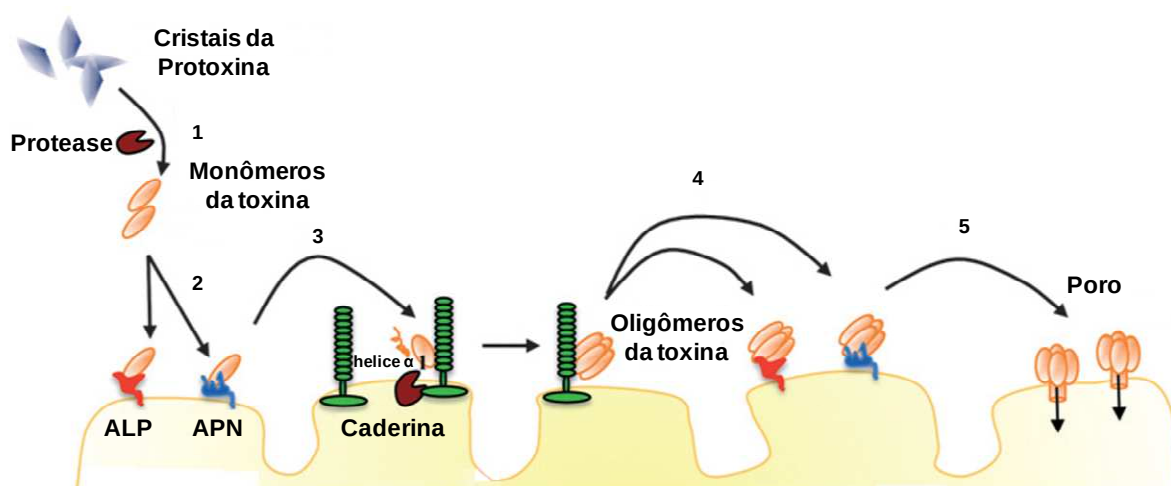


FIGURA 1 - Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina Cry3D em Lepidoptera em nível molecular – (adaptada de PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2012).

O mecanismo de ação mais recente em nível molecular da toxina Cry3D em Lepidoptera envolve as seguintes etapas: (1) ingestão da protoxina Cry3D, a qual é solubilizada no intestino médio da larva devido ao alto pH e condições redutoras e ativado por proteases, gerando o fragmento da toxina; (2) ligação dos monômeros da toxina Cry3D com baixa afinidade a receptores ALP e APN, e assim sua aproximação da membrana; (3) indução da clivagem da região N-terminal e oligomerização da toxina Cry3D a partir da sua interação com o receptor CAD (caderina) com alta afinidade; (4) ligação do oligômero ao receptor ALP e APN e (5) formação do poro (adaptado de PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2012).

6. A IMPORTÂNCIA DA ÁREA DE REFÚGIO PARA O MANEJO DAS POPULAÇÕES DE *D. speciosa*

O evento MON863 (Cry3Bb1) foi o primeiro a obter registro em 2003 nos Estados Unidos da América para controle de larva de *D. v. virgifera* em milho. Desde então se adotou um plano de manejo de resistência para esta praga, o qual deveria conter 20% da área plantada com milho não *Bt* na forma de refúgio estruturado em blocos dentro da lavoura, na adjacência ou faixas dentro da lavoura *Bt* apresentando pelo menos quatro linhas contínuas, além de um plano de ação corretiva, um programa educativo e de observância por parte do produtor e o monitoramento da resistência de acordo com a Agência de Proteção Ambiental - EPA (EPA, 2010a).

A aplicação de inseticida no sulco de semeadura para a redução dos danos da larva na raiz é permitida na área de refúgio, porém o controle do adulto via aplicação de inseticida foliar não se permite, visto que isto comprometeria a finalidade do refúgio. Havendo a necessidade de controle de outras pragas em toda a lavoura, é permitida a aplicação sobre a área de refúgio e neste caso devem-se utilizar produtos registrados para esta finalidade (EPA, 2007).

A preocupação com o desempenho e o prolongamento da vida útil desta tecnologia no campo tem sido motivo de intensos estudos nos EUA e Europa, principalmente após o primeiro relato de lavoura envolvida em resistência de *D. v. virgifera* a toxina Cry3Bb1 nos Estados Unidos da América (GASSMANN et al., 2011).

Logo após a liberação comercial dos genótipos piramidados com Cry3Bb1 e Cry34Ab1/Cry35Ab1, estes foram registrados com um plano de manejo de resistência de apenas 5% de não *Bt* plantados em blocos ou faixas (EPA, 2009).

Mais recentemente, para lavouras semeadas com genótipos que expressam a proteína binária Cry34Ab1/Cry35Ab1, foi aprovado o refúgio ensacado através da mistura de 10% de sementes não *Bt* (EPA, 2010b). Em abril de 2011 os genótipos piramidados com a proteína Cry3Bb1 mais Cry34Ab1/Cry35Ab1 obtiveram registro para refúgio ensacado com a mistura de 5% de sementes não *Bt* (EPA, 2011). Após uma década da aprovação da tecnologia *Bt* para controle de *D. v. virgifera* nos Estados Unidos da América, Tabashnik e Gould (2012) concluíram que o refúgio de 20% e 5% para genótipos contendo uma e duas proteínas, respectivamente, não estão adequados por se tratar de proteínas que não expressam alta dose para a

praga alvo podendo desenvolver resistência em condição de lavoura. Estes autores recomendam ao EPA um aumento da área de refúgio para 50% e 20% para os genótipos que expressam uma e duas proteínas ativas para a praga alvo, respectivamente.

No Brasil as exigências para as áreas de refúgio para o evento MON88017 deverão ser definidas após estudo de fatores como: multivoltinismo de *D. speciosa*; possibilidade da fase de larval se desenvolver em outras espécies hospedeiras que atuariam como refúgio alternativo; plantas hospedeiras preferências para as larvas e adultos são diferentes; o adulto não apresenta dano econômico na cultura do milho; ocorrência de sobreposição de gerações; ausência de diapausa em todas as fases do ciclo; inverno menos rigoroso em relação aos EUA; além das plantas expressarem apenas uma proteína de moderada a baixa dose.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados cinco experimentos: um para avaliar a eficácia da toxina na redução dos danos da larva de *D. speciosa* na raiz do milho e os demais para avaliar o efeito da época de semeadura sobre os danos.

7.1 EFICÁCIA DE GENÓTIPOS DE MILHO CONTENDO O GENE Cry3Bb1 NA REDUÇÃO DE DANO DE *D. speciosa*.

O experimento foi conduzido na área da Estação Experimental da Fundação ABC no município de Itaberá, São Paulo – Brasil, localizada nas coordenadas de 24° 04' 4,62" de latitude Sul e 49° 09' 5,18" de longitude Leste com altitude de 730 metros.

A cultura do milho foi conduzida sob o sistema de plantio direto na palha, não irrigado, após a cultura da aveia dessecada com 960 g i.a. ha⁻¹ de glifosato com sessenta e cinco dias de antecedência. A semeadura foi realizada em 27/12/2011 adotando o espaçamento de 0,80 metros entre linhas com população de aproximadamente 70.000 plantas por ha⁻¹.

7.1.1 Clima, solo e adubação

O clima é classificado como Cwa (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente) (KÖPPEN, 1928). O solo é classificado como LVd1(Latossolo Vermelho distrófico típico de textura argilosa, relevo suave ondulado) (EMBRAPA, 2006).

A área experimental foi adubada com semeadora modelo SHM 15/17, utilizando-se facão como condutor de fertilizante, na dose de 16, 60, 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio CO(NH₂)₂, fósforo (P₂O₅) e potássio (K₂O) respectivamente. Aos nove dias após a emergência (DAE) na fase V3⁽²⁾ foi aplicado manualmente em cobertura para cada parcela o equivalente a 157,5 kg ha⁻¹ de nitrogênio CO(NH₂)₂ e 30 kg ha⁻¹ de potássio (K₂O). As características químicas do solo estão apresentadas na tabela

⁽²⁾ Na página 75 no anexo A, encontra-se a descrição dos estágios fenológicos da planta de milho conforme descrito por RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003.

1. A análise física do solo apresentou em g kg⁻¹ de argila – 479; silte -123; areia – 398.

7.1.2 Genótipos utilizados, tratamento de semente, pulverização do inseticida no sulco e semeadura do feijão para atração dos adultos

Foram utilizados os genótipos AG7000RW e DKB330RW geneticamente modificadas contendo o gene que expressa a proteína Cry3Bb1 para controle das larvas de *D. speciosa* e suas isolíneas não modificadas denominadas AG7000 e DKB330. As sementes foram obtidas da Monsanto do Brasil. As características agronômicas dos genótipos estão apresentadas na tabela 2.

TABELA 1 - Características químicas do solo onde foi conduzido o experimento – Itaberá São Paulo - 2012

Local	Prof cm	P	M.O.	pH	H+Al	Al	K	Ca	Mg	S.B.	C.T.C.	V	Al CTC
		mg dm ³	g dm ³	mmolc/dm ³								%	
Itaberá	00-10	56	31,68	6,3	16	ND	3,7	120	40	163,7	180,1	91	ND
	10-20	34	22,56	4,8	40	2	3,2	34	7	43,8	83,9	52	4,4

CTC= Capacidade de troca de cátions do solo a pH 7,0; Al= Saturação por alumínio; V= Saturação por bases; Método de extração: pH- CaCl₂; H + Al = Solução tampão SMP; Al, Ca e Mg= KCl 1 mol L⁻¹; P e K = Resina; C- orgânico= Dumas.

TABELA 2 - Características agronômicas apresentadas pelos genótipos utilizados no experimento – Itaberá São Paulo - 2012.

Genótipos	Tipo Genótipo	Ciclo	Altura planta (cm)*	Altura espiga (cm)*	Evento / Proteína	Textura do grão	Potencial produtivo
AG7000	Simples	Precoce	276,09	139,10	--	Semiduro /	Médio/alto
AG7000RW			277,00	141,15	MON88017 (Cry3Bb1)	Alaranjado	
DKB330	Simples	Superprecoce	254,40	127,83	--	Semidentado /	Alto
DKB330RW			255,34	129,43	MON88017 (Cry3Bb1)	Amarelo	

*Dados provenientes da área experimental.

O manejo da área experimental foi realizado um dia antes da semeadura do milho aplicando-se glifosato na dose de 960 g i.a. ha⁻¹. Logo após a semeadura aplicou-se metomil 480 g i.a. ha⁻¹ com objetivo de controle da lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) presente no solo debaixo da palhada de aveia e nas plantas daninhas hospedeiras, visto que estes genótipos não são *Bt* para Lepidoptera e esta praga poderia reduzir o estande inicial devido ao hábito de cortar plantas no nível do solo.

A semente foi tratada com inseticida e fungicida antes da semeadura. Foram utilizados os fungicidas carbendazim + thiram na dose de 9,0 e 21,0 g i.a. ha⁻¹, respectivamente, com objetivo de proteção das sementes e plântulas contra ataque de *Phytophthora* sp e *Fusarium* sp e garantir a uniformidade na emergência. Aplicou-se o inseticida tiametoxam na dose de 42,0 g i.a. ha⁻¹ a fim de proteger as plântulas do dano do percevejo *D. melacanthus*, já que este inseticida, nesta modalidade de aplicação, apresenta pequeno efeito sobre larvas de *D. speciosa* devido ao curto período residual e à baixa dose utilizada.

Aplicou-se no sulco de semeadura o inseticida fipronil na dose de 80 g i. a. ha⁻¹, conforme protocolo de campo apresentado no apêndice “A” na página 75. Fipronil apresenta solubilidade em água de 1,9 e 2,4 mg/L quando submetido a pH 5,0 e 9,0, respectivamente, e meia vida maior que 100 dias (Cal/EPA, 2007).

Após a realização da adubação de base nas linhas de semeadura do milho, demarcou-se o experimento com estacas de madeira, os sulcos foram abertos em forma de “V” com auxílio de sacho de jardinagem na profundidade de aproximadamente 8 cm e 12 cm de largura na superfície do solo apenas nas parcelas em que recebeu o tratamento com o inseticida no sulco.

Para a aplicação do inseticida utilizou-se equipamento costal pressurizado a CO₂ operando com pressão constante de 18,5 lb pol⁻², equipado com uma lança para acoplar na sua extremidade uma ponta tipo leque XR8002EVS mantida à altura de 3 cm da superfície do sulco aberto, e caminhando à velocidade de 5,0 km h⁻¹ obteve-se um volume de calda de 75,0 L ha⁻¹.

Imediatamente após a aplicação do inseticida, o sulco foi fechado e em seguida realizou-se a semeadura do milho com auxílio de matraca manual do tipo “saraquá” colocando-se uma semente por cova espaçada de 17,8 cm, utilizando-se régua graduada ao lado da linha para manter as mesmas equidistantes.

Aproveitou-se a operação de adubação de base para a semeadura de feijão na entrelinha do milho utilizando-se a semeadora com sete linhas, sendo quatro adubando o sulco para milho e três semeando feijão sem fertilizante. Semeou-se feijão com o objetivo de atrair os adultos, em busca de alimento, para dentro da área experimental para que posteriormente realizassem postura na base das plantas de milho a fim de se obter alta densidade de larvas, para se testar a eficácia da proteína em condições do alto dano na raiz.

7.1.3 Tratos culturais

Após a emergência do milho, o controle de lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) foi realizado por meio de pulverização foliar de spinosad na dose de 28,8 g i.a. ha⁻¹ quando 20% das plantas apresentaram pelo menos uma folha com sintomas de dano (CRUZ, 1995).

O controle de plantas daninhas e do feijão semeado na entrelinha foi realizado na fase V7 aos 29 (DAE) através da aplicação de atrazine mais tembotrione na dose de 2400 e 100,8 g i.a. ha⁻¹, respectivamente, sob a forma de jato dirigido na entrelinha.

Devido à semeadura tardia e à diferente susceptibilidade a doenças dos genótipos, houve necessidade de manejo de doenças foliares o qual foi realizado com o milho na fase de V6 (seis folhas desenvolvidas) aos 27 DAE e 11 dias após VT (emissão da inflorescência masculina) aos 63 DAE com a aplicação de azoxystrobina mais óleo mineral na dose de 75g e 600 mL i.a. ha⁻¹, respectivamente.

7.1.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos aleatorizados dispostos em um esquema fatorial (2x4), sendo dois níveis de inseticidas no sulco de semeadura (fipronil 80 g i.a. ha⁻¹ e sem inseticida) e quatro níveis de genótipos (AG7000, AG7000RW, DKB330 e DKB330RW) obtendo-se oito tratamentos com seis repetições totalizando quarenta e oito parcelas⁽³⁾. As parcelas experimentais

⁽³⁾ A tabela contendo a descrição dos tratamentos encontra-se na página 74 no apêndice A.

foram constituídas de 24,0 m² (6 linhas de 5,0 metros), com área útil para colheita de 9,6 m² (3 linhas de 4,0 metros).

O esquema de análise da variância aplicada no experimento está demonstrado na tabela 3.

TABELA 3 - Esquema da análise de variância (ANOVA) aplicada no experimento de eficácia – Itaberá São Paulo - 2012.

Causas da variação	Graus de liberdade (GL)
Genótipos	3
Inseticidas	1
Interação entre genótipos e Inseticida	3
(Tratamentos)	(7)
Bloco	5
Resíduo	35
Total	47

A normalidade dos dados foi verificada aplicando-se o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida os dados foram submetidos à verificação da homogeneidade de variância utilizando-se o método Box-Cox, ferramenta oferecida pelo programa SAS System for Windows Version 9.3. Não foi detectada a falta de normalidade, apenas a não homogeneidade nas variâncias das variáveis dano e acamamento. Estes dados foram transformados de acordo com a metodologia de Box-Cox (BOX e COX, 1964). Depois de transformados, os dados foram submetidos à análise de variância, e detectada diferença entre as médias, estas foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

7.2 AVALIAÇÕES

7.2.1 Estande inicial e final, dano na raiz, massa seca na raiz e número de espigas

O estande inicial foi determinado aos 17 DAE na fase V4 contando-se as plantas presentes em duas linhas de quatro metros de comprimento. O estande final foi realizado em 2/5/2012 aos 121 DAE no momento da colheita contando-se as plantas presentes em três linhas de quatro metros de comprimento.

Com o auxílio de cortadeira aos 52 DAE na fase VT, foram removidas na quinta linha de cada parcela 10 plantas com raiz juntamente com o solo que as envolviam nas dimensões de 20x20x20cm. Após lavagem individual com água sob pressão, as mesmas foram avaliadas utilizando-se a escala de notas entre zero e

três, segundo Oleson et al. (2005), sendo: nota 0 - ausência de danos; nota 1 - a soma dos danos equivale a uma coroa danificada; nota 2 - a soma dos danos equivale a duas coroas danificadas; nota 3 - a soma dos danos equivale a três coroas danificadas. Os danos entre uma coroa inteiramente danificada e outra foram anotados em percentual de 0,25%; 0,50% e 0,75% conforme descritos na tabela 4. As raízes receberam nota visual de dano, não havendo a contagem do número de raízes por coroa.

TABELA 4 - Descrição detalhada da escala de nota para avaliação de sintomas de injúria nas raízes do milho aplicada no experimento.

Nota atribuída	Descrição dos sintomas de injuria na raiz
0,000	Ausência de injúrias da larva nas raízes.
0,025	2,5% das raízes apresentando sintomas de escoriações e/ou presença de galerias deixadas devido à alimentação da larva.
0,050	5,0% das raízes apresentando sintomas de escoriações ou presença de galerias ou apenas várias raízes com as pontas danificadas.
0,10	10% das raízes de uma coroa cortadas à distância de 3,8 centímetros em relação ao colmo, ou menos.
0,25	25% das raízes de uma coroa cortadas à distância de 3,8 centímetros em relação ao colmo, ou menos.
0,50	50% das raízes de uma coroa cortadas à distância de 3,8 centímetros em relação ao colmo, ou menos.
0,75	75% de raízes de uma coroa cortadas à distância de 3,8 centímetros em relação ao colmo, ou menos.
1,00	A soma das injúrias equivale a uma coroa com raízes cortadas a uma distância de 3,8 centímetros em relação ao colmo, ou menos.
1,25	
1,50	Uma coroa cortada + injúria adicional da segunda
1,75	
2,00	
2,25	Duas coroas cortadas + injúria adicional da terceira
2,50	
2,75	
3,00	Três coroas completamente cortadas

Fonte: Oleson et al., 2005.

A escala aplicada é utilizada na Universidade de Iowa (<http://www.ent.iastate.edu/pest/rootworm/nodeinjury/nodeinjury.html>). As plantas cujas raízes receberam notas de dano superior a 0,25 são mais susceptíveis ao acamamento e à perda de produtividade quando cultivadas em condições de estresse hídrico e térmico se comparada com aquelas que obtiveram notas de danos menores. No momento da análise dos dados informaram-se as notas atribuídas às raízes das dez plantas da parcela permitindo, desta forma, calcular a consistência 0,25, 0,50 e 0,75 do tratamento expressa em percentual. Neste trabalho utilizou-se a consistência como uma medida de frequência de plantas que apresentaram raízes com notas de dano igual ou inferior a 0,25, 0,50 e 0,75. A consistência 0,25 indica o percentual de vezes que o tratamento protegeu as raízes para que o dano não ultrapassasse o nível econômico, permitindo a planta expressar seu potencial produtivo.

Após a avaliação de danos, todos os colmos foram cortados logo acima da raiz adventícia e as raízes foram levadas para o laboratório para determinação da massa seca após expor as amostras a 72°C durante 72 horas.

O número de espigas foi contado no momento da colheita dentro da área útil colhida (três linhas de quatro metros), separando-se aquelas provenientes de plantas acamadas e não acamadas.

7.2.2 Avaliação de acamamento e colheita

Aos 121 DAE juntamente com a operação de colheita, foi contado o número total de plantas em três linhas de quatro metros onde se separou aquelas com curvatura característica na base do colmo e com desvio maior que 25° em relação ao próprio eixo vertical sendo classificadas como acamadas.

A colheita das plantas acamadas e não acamadas foi realizada de forma separada e as espigas foram debulhadas manualmente e em seguida retiradas a impureza e determinada a umidade. Para determinação da produtividade de cada parcela as amostras foram padronizadas para umidade de 13%.

O percentual de grão ardido foi determinado pesando-se 250 gramas de grãos por amostra e em seguida identificando e pesando-se aqueles que apresentaram sintomas característicos. A massa de mil grãos foi obtida contando e pesando-se, ao acaso, 250 grãos por amostra.

7.2.3 Monitoramento e coleta de adultos de *D. speciosa*

O acompanhamento da dinâmica populacional dos adultos teve início em 18/11/2011 (39 dias antes da semeadura) e foi realizado semanalmente até V13, por meio de rede entomológica de varredura de 35 cm de diâmetro entre o período que compreende das 17h00min as 19h00min. As amostras foram realizadas sobre uma linha de feijão com dez metros de comprimento, totalizando sete redadas em cada ponto e repetidas em quinze pontos aleatorizados dentro da área experimental.

Os golpes de redes foram realizados sobre as folhas superiores das plantas e os insetos capturados foram coletados com auxílio de um aspirador entomológico, contados e liberados na área experimental no final de cada avaliação. Após a aplicação dos herbicidas continuou-se com os mesmos procedimentos até a morte completa das plantas de feijão.

Durante o período de condução do experimento retirou-se uma amostra contendo aproximadamente trezentos insetos adultos que foram acondicionados em álcool 92° GL e em seguida encaminhados para a Embrapa Soja, em Londrina Paraná, para identificação e confirmação da espécie.

8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ÉPOCA DE SEMEADURA SOBRE O DANO DE *D. speciosa* EM RAIZ DE MILHO

Os experimentos foram conduzidos nos anos agrícolas 2010/2011 e 2011/2012 nas estações experimentais da Fundação ABC, no município de Castro – PR e Itaberá - SP.

Os experimentos em Castro-PR foram instalados em área localizada nas coordenadas de 24° 51' 44,84" de latitude Sul e 49° 56' 10,43" de longitude Leste com altitude de 1032 metros, conduzida sob sistema de plantio direto na palha após a cultura da aveia. O clima é classificado como Cfb (denominado de temperado úmido, com verões frescos, geadas severas demasiadamente frequentes e sem estação seca definida) (KÖPPEN, 1928). O solo é classificado como LBd1 (LATOSSOLO BRUNO Distrófico típico, textura argilosa, relevo suave ondulado entre 2-4%) (EMBRAPA, 2006).

A análise física do solo apresentou em g kg⁻¹ de argila – 563; silte -190; areia – 247.

Os experimentos em Itaberá-SP foram instalados em área localizada nas coordenadas de 24° 04' 9,08" de latitude Sul e 49° 09' 2,66" de longitude Leste com altitude de 730 metros, conduzida sob sistema de plantio direto na palha após a cultura da aveia. O clima é classificado como Cwa (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente) (KÖPPEN, 1928). O solo é classificado como LVd1(Latossolo Vermelho distrófico típico de textura argilosa, relevo suave ondulado) (EMBRAPA, 2006). A análise física do solo apresentou em g kg⁻¹ de argila – 479; silte -123; areia – 398.

Para ambos os locais a área experimental foi adubada com semeadora modelo SHM 15/17, utilizando-se facão como condutor de fertilizante, na dose de 16, 60, 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio CO(NH₂)₂, fósforo (P₂O₅) e potássio (K₂O), respectivamente. Na fase V3/V4 foi aplicado manualmente em cobertura para cada parcela o equivalente a 157,5 kg ha⁻¹ de nitrogênio CO(NH₂)₂ e 30 kg ha⁻¹ de potássio (K₂O).

Para os quatro experimentos, nos dois locais, em todas as épocas, o manejo da área foi realizado entre um e três dias antes da semeadura do milho aplicando-se glifosato na dose de 960 g i.a. ha⁻¹. A semente foi tratada com os fungicidas

carbendazim + thiram na dose de 9,0 e 21,0 g i.a. ha⁻¹, respectivamente, e com o inseticida tiametoxam na dose de 42,0 g i.a. ha⁻¹.

O controle de plantas daninhas foi realizado na fase V2 e V4 através da aplicação de atrazine mais tembotrione na dose de 1000 e 52,5 g i.a. ha⁻¹, respectivamente. O manejo de doenças foliares foi realizado com o milho na fase de V6 e repetido entre 10-15 dias após VT por meio da aplicação de azoxystrobina mais óleo mineral na dose de 75g e 600 mL i.a. ha⁻¹, respectivamente.

Nestes experimentos (época de semeadura) não foi semeado feijão na entrelinha do milho para atrair adultos, os danos avaliados na raiz são resultantes da população de larvas oriundas dos adultos naturalmente presentes na área experimental. Utilizou-se o genótipo P30F53H, isento de toxina para Coleoptera, no espaçamento de 0,80 m e aproximadamente 70.000 ha⁻¹, para todas as épocas, safras e locais.

Com o auxílio de cortadeira foram removidas cinco plantas com raiz juntamente com o solo que as envolviam nas dimensões de 20x20x20cm. Após lavagem individual com água sob pressão, as mesmas foram avaliadas utilizando-se a escala de notas entre um e seis, segundo Hills e Peters (1971), sendo: nota 1 - raiz sem dano ou apresentando pequenas áreas escoriadas decorrentes da alimentação da larva; nota 2 – escoriados evidentes, porém sem presença de raízes cortadas com menos de 3,8 cm de comprimento a partir da sua base; nota 3 - várias raízes cortadas com menos 3,8 cm de comprimento da base, porém a soma destas não equivale a uma coroa destruída; nota 4 - Uma coroa destruída com menos de 3,8 cm em relação à base; nota 5 - duas coroas destruídas com menos de 3,8 cm em relação à base; nota 6 - três coroas destruídas com menos de 3,8 cm em relação a base. Notas maiores que 3 na escala de 1 a 6 indicam perdas econômicas de acordo com os autores. Aplicou-se a escala de 1 a 6 por se tratar de experimentos iniciados no ano anterior e que será conduzido nos anos seguintes optando-se então por não alterar a metodologia.

As informações referentes aos locais, safras, datas de semeaduras, avaliações de dano na raiz e o estágio fenológico do milho constam na tabela 5.

TABELA 5 – Local, safra, data de semeadura, avaliação de raiz e estágio fenológico do milho em Itaberá - São Paulo e Castro - Paraná.

Local	Safra	Época	Data		Estágio fenológico	Dias após a emergência
			Semeadura	Avaliação de raiz		
Itaberá SP	2010/2011	1	14/10/2010	28/12/2010	V13	67
		2	3/11/2010	5/1/2011	VT	56
		3	25/11/2010	22/1/2011	VT	51
		4	20/12/2010	28/2/2011	R1	64
	2011/2012	1	21/9/2011	16/12/2011	VT	78
		2	18/10/2011	15/1/2012	R1	81
		3	21/11/2011	19/1/2012	V13	50
		4	28/12/2011	23/2/2012	VT	51
		5	30/1/2012	21/3/2012	V10	46
		6	20/2/2012	19/4/2012	VT	52
Castro PR	2010/2011	1	29/9/2010	20/12/2010	VT	74
		2	21/10/2010	30/12/2010	V13	63
		3	11/11/2010	13/1/2011	VT	57
	2011/2012	1	20/9/2011	22/12/2011	VT	85
		2	10/10/2011	4/1/2012	V15	78
		3	30/10/2011	7/1/2012	VT	62
		4	20/11/2011	2/2/2012	VT	68

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos aleatorizados com dois tratamentos (inseticida no sulco de semeadura e testemunha sem inseticida) com doze repetições totalizando vinte e quatro parcelas por época de semeadura. As parcelas experimentais foram constituídas de 20 m² (1linha de 25,0 metros).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 EFICÁCIA DE GENÓTIPOS DE MILHO EXPRESSANDO A TOXINA Cry3Bb1 NA REDUÇÃO DE DANO DE *D. speciosa*

9.1.1 Monitoramento de adultos de *D. speciosa*

Houve um aumento gradativo de adultos capturados desde o início do monitoramento na primavera até atingir a máxima densidade populacional no final de janeiro com 20,8 adultos, mantendo-se no mês de fevereiro níveis semelhantes aos de duas a três semanas anteriores (Figura 2). Entre 16/12/2011 e 11/1/2012 ocorreu uma redução na população, devido, possivelmente, à aplicação de herbicida e consequente morte das plantas de feijão.

Os indivíduos capturados logo após a máxima densidade populacional eram na sua maioria pequenos, as fêmeas não apresentavam abdômen proeminente devido ao pequeno desenvolvimento do ovário, e não haviam fixado as cores verde e amarela nos élitros. Estas características indicam que estes adultos são provenientes de postura realizada no milho logo após sua emergência, ou seja a primeira geração no milho. Após a máxima densidade (31/1/12), os adultos deixaram a área experimental em busca de alimento, já que não mais havia feijão presente nas entrelinhas e as plantas de milho adultas não são alvo de postura, fazendo com que a população dentro do experimento baixasse.

O comportamento populacional verificado parece característico para um inseto que não apresenta diapausa no inverno, sendo o crescimento da população dependente dos adultos sobreviventes desta estação do ano, do desenvolvimento de plantas hospedeiras que servem como fonte de alimento para estes adultos e do aumento gradual da temperatura que faz as gerações tornarem-se mais curtas no verão.

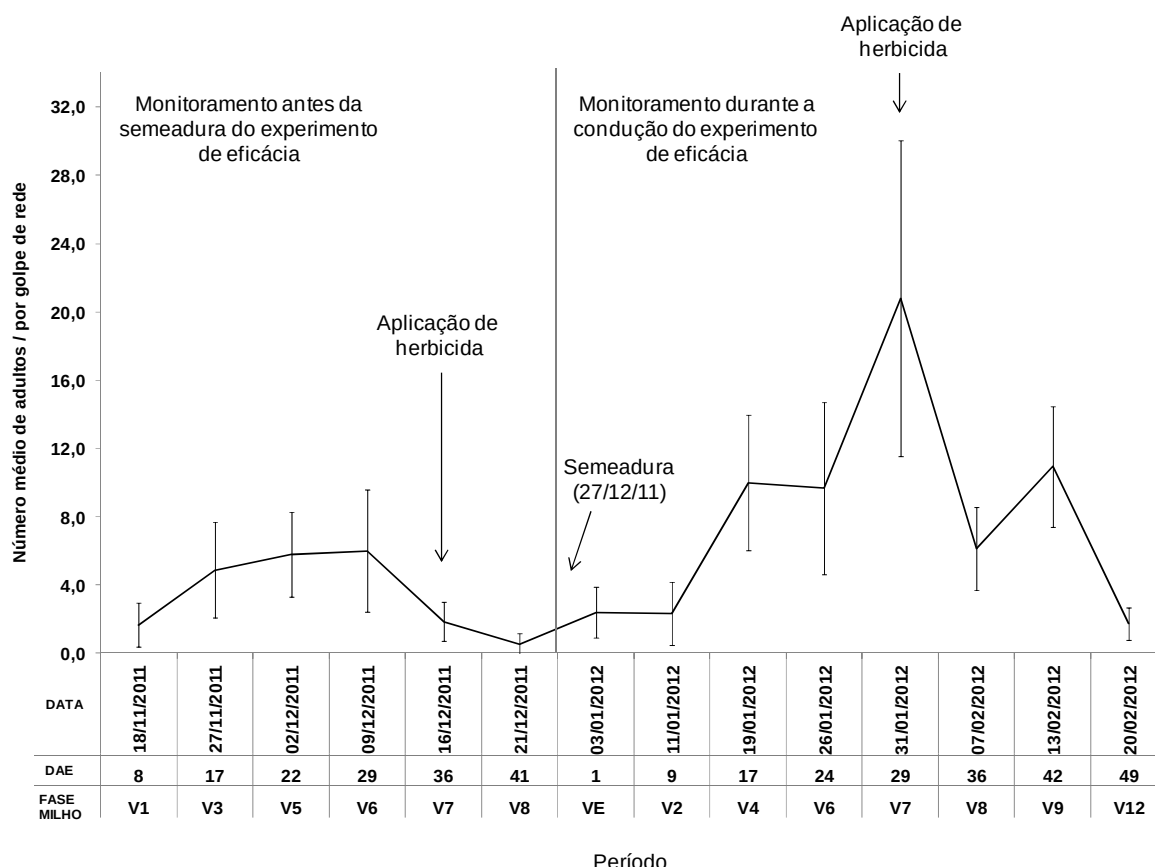


FIGURA 2 - Número médio de adultos de *D. speciosa* capturados com rede entomológica de 35 cm de diâmetro em 15 pontos com sete redadas sobre uma linha de feijão. Itaberá - SP, 2012. DAE= Dias Após a Emergência do milho. Barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados semelhantes foram obtidos durante três anos consecutivos por Hohmann e Carvalho (1989) em Londrina – PR, quando monitorou adultos com armadilha adesiva amarela instalada acima das plantas de feijão. Estudando diferentes atrativos naturais para *D. speciosa* utilizando armadilha construída com garrafa PET em horta orgânica, Stupp; Boff e Gonçalves (2006) em Rio do Sul, SC obtiveram o maior número de adultos capturados entre fevereiro e março.

9.1.2 Clima

A temperatura apresentou elevação a partir do mês de setembro, atingindo valores de máxima em fevereiro e março no final do verão (Figura 3). A sementeira do experimento de eficácia ocorreu quando a temperatura média atingiu 20°C no final de dezembro, permanecendo entre 20°C e 25°C durante os três meses seguintes, condição em que o adulto de *D. speciosa* apresenta maior fecundidade (ÁVILA; PARRA, 1999). Durante o primeiro decêndio dos meses de fevereiro e

março a temperatura máxima média alcançou os 30°C, porém não caracterizando estresse térmico por alta temperatura para a cultura do milho.

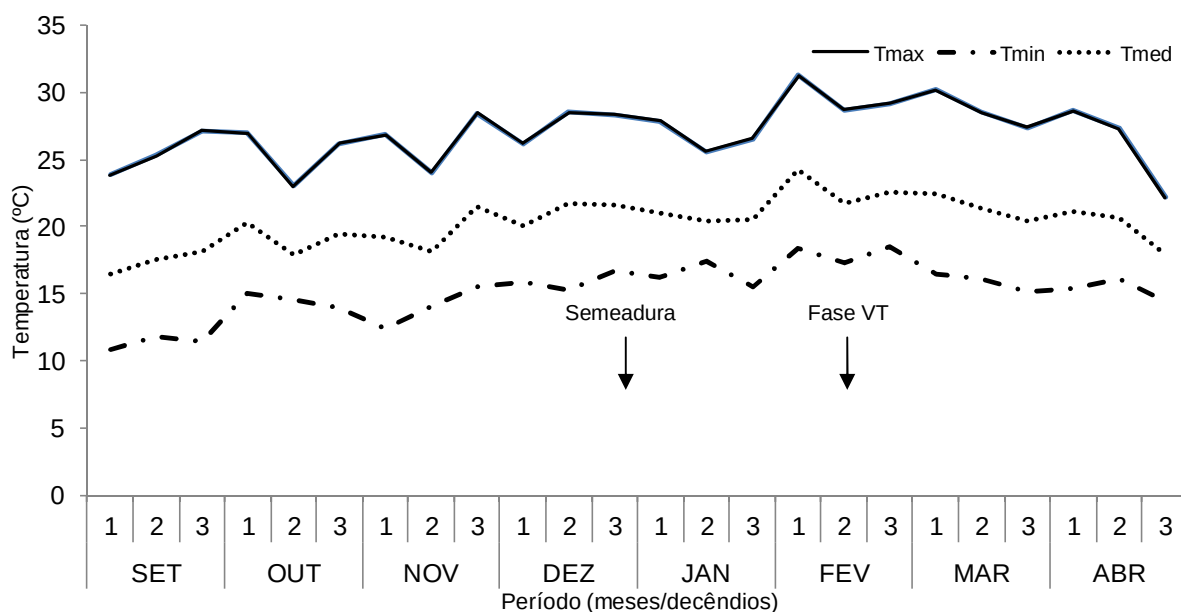


FIGURA 3 - Temperaturas máxima, mínima e média observadas em abrigo durante a condução do experimento. Itaberá - SP, 2012

VT= fase de emissão da inflorescência masculina.

A disponibilidade de água no solo durante a condução do experimento foi baixa devido à precipitação abaixo da média, totalizando 532 mm, com a irrigação de 40 mm no início do segundo decêndio de fevereiro. Esta única aplicação de água via irrigação foi realizada para facilitar o arranquio e avaliação das raízes. A restrição de água no solo continuou sendo observada no período reprodutivo que se iniciou em março, o que pode ser considerado uma condição de médio estresse hídrico (Figura 4), caracterizando ambiente apropriado para a condução deste trabalho por apresentar efeito negativo sobre a produtividade das plantas com raízes danificadas devido à redução na capacidade de absorção de água.

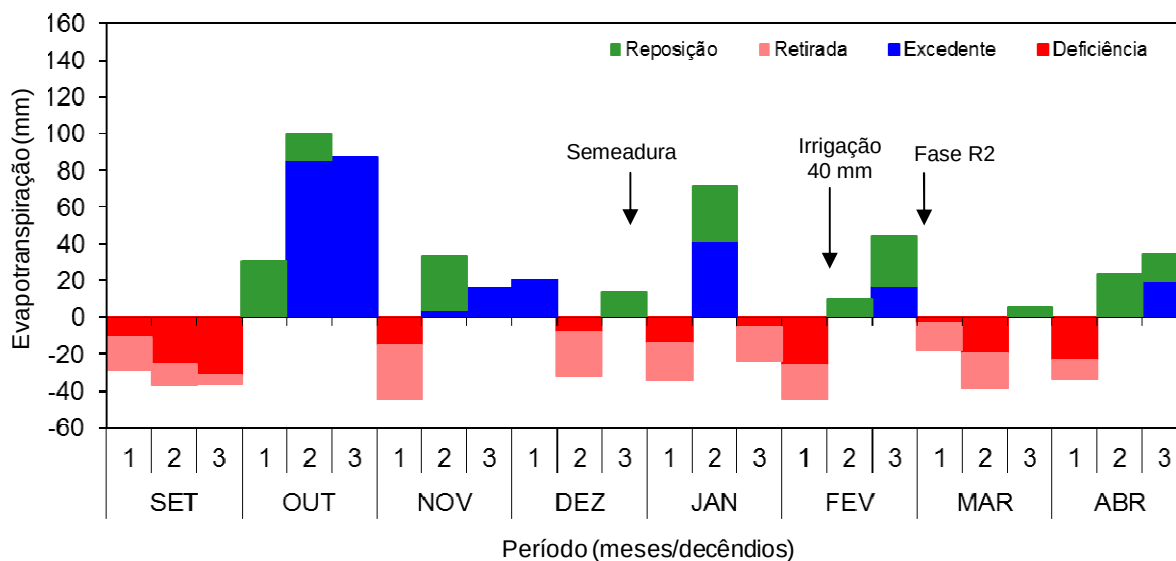


FIGURA 4 - Balanço hídrico sequencial utilizando a evapotranspiração potencial por Penman-Monteith durante a condução do experimento. Itaberá - SP, 2012.

R2= fase de grão leitoso.

Fonte: SMA Fundação ABC - 2012.

9.1.3 Comparação de estande inicial e final, massa de mil grãos e percentual de ardidos e número de espigas por planta nos tratamentos avaliados

Não foram observadas diferenças significativas para estande inicial e final de plantas. Resultado esperado, já que a larva deste inseto não se alimenta de semente, não havendo danos ocasionados pelos adultos em plântulas.

A massa de mil grãos avaliada nas plantas sem sintoma de acamamento demonstrou diferença significativa apenas para genótipo na análise de variância (ANOVA) ($F=43,43$; $p=0,0001$) sendo DKB330 maior que AG7000 independente da presença ou não da proteína e do inseticida. O percentual de grãos ardidos avaliados em espigas das plantas sem sintomas de acamamento não apresentou diferença significativa entre os tratamentos na análise de variância (ANOVA) ($F=0,95$; $p=0,5118$).

Por outro lado, as análises de massa de mil grãos e grãos ardidos provenientes das plantas com sintomas de acamamento ficaram prejudicadas devido os tratamentos com presença da toxina, e aqueles com toxina mais inseticida não apresentarem acamamento em todas as repetições e/ou apenas um número muito limitado de plantas por repetição, o que poderia interferir na precisão da análise.

Não foram observadas diferenças significativas para a avaliação do número de espigas por planta acamada (ANOVA) ($F=0,28$; $p=0,9833$), o mesmo ocorrendo para as plantas não acamadas ($F=1,05$; $p=0,4291$).

9.1.4 Avaliação do dano da larva de *D. speciosa* na raiz do milho

A avaliação do dano médio na raiz é importante para se reconhecer o potencial da praga. Neste caso foi superior a uma coroa e meia destruída nos dois genótipos não *Bt*, permitindo inferir com segurança o comportamento no campo de suas isolíneas que expressam a proteína Cry3Bb1 para a proteção contra o dano da larva de *D. speciosa* (Tabela 6).

TABELA 6 - Dano médio nas raízes (0,00-3,00) ocasionado pela alimentação da larva de *D. speciosa* nos diferentes tratamentos, avaliado aos 52 DAE (Dias Após a Emergência) na fase VT, Itaberá - SP, 2012. Os valores mostrados referem-se aos dados não transformados, porém na análise estatística foi utilizada a seguinte transformação ($\text{tdan} = \text{dan}^{-1,5}$).

Genótipos	Inseticida aplicado no sulco						
	Testemunha		Fipronil 80 g i.a. ha ⁻¹		CV (%)		Pr>F
AG7000	1,62	B b	0,24	B a	29,6		0,0001
AG7000RW	0,25	A b	0,12	A a	21,5		0,0007
DKB330	1,85	B b	0,53	C a	42,5		0,0001
DKB330RW	0,24	A b	0,05	A a	18,6		0,0001
CV (%)	30,7		21,4				
Pr>F	0,0001		0,0001				

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Os genótipos AG7000 (1,62) e DKB330 (1,85) não diferiram entre si e foram inferiores as suas isolíneas transformadas sem aplicação de inseticida. Quando comparado com a aplicação de inseticida, DKB330 (0,53) apresentou o dobro do dano de AG7000 (0,24), sendo inferior aos demais tratamentos.

O dano no genótipo DKB330 (0,53) tratado com inseticida ultrapassou o limite de dano econômico proposto por Oleson et al. (2005). Neste trabalho, os autores determinaram que plantas com raízes com notas iguais ou inferiores a 0,25 em condição de baixo estresse hídrico e térmico não apresentam redução de produtividade sendo então considerados aceitáveis.

DKB330RW sem inseticida recebeu nota de dano de 0,24 sendo significativamente inferior na comparação com ele mesmo com inseticida, com dano de 0,05. Resultado semelhante ocorreu com o genótipo AG7000RW (0,25) sem inseticida e (0,12) com inseticida. Embora a aplicação de inseticida no sulco tenha contribuído para a redução dos danos em ambos os genótipos RW, este ocorreu com nota igual ou abaixo do nível de dano econômico (0,25) o que demonstra o bom desempenho da proteína nos dois genótipos testados.

Na figura 5 encontra-se a caracterização dos sintomas dos danos da larva de *D. speciosa* na raiz do milho.

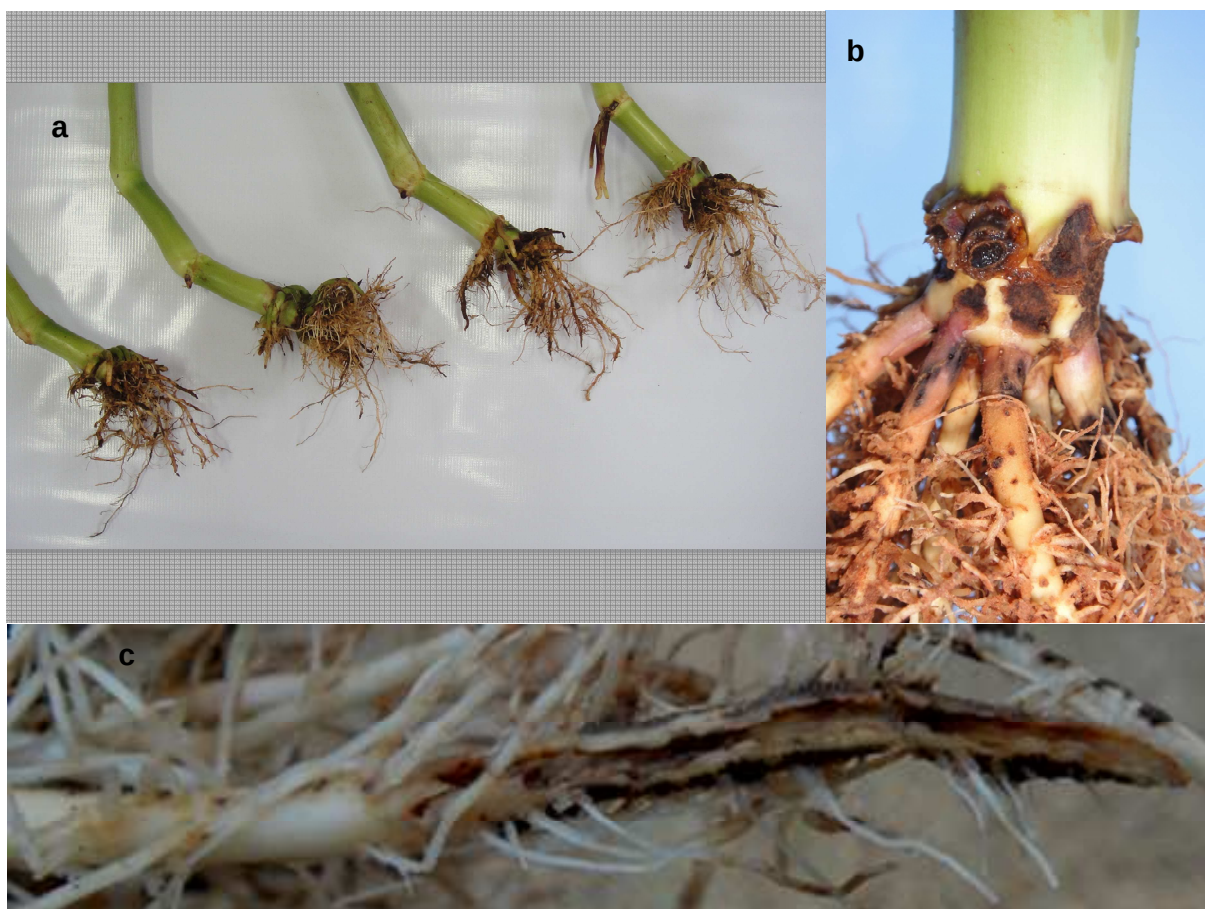


FIGURA 5 – Caracterização dos danos da larva de *D. speciosa* na raiz do milho. Sintoma de dano nas raízes e consequente curvatura do colmo (a), coroa da raiz adventícia totalmente destruída pela larva (b) e galeria deixada pela larva após a alimentação (c).

A pequena massa de raiz e a baixa solubilidade do inseticida fipronil utilizado em condições de pouca água disponível no solo podem ajudar a explicar os danos no DKB330 (0,53) com aplicação de inseticida. Dentre os primeiros quarenta dias após a semeadura, trinta deles estiveram sob deficiência hídrica (Figura 4), justamente o período que o inseticida deve oferecer a maior proteção as raízes. A baixa solubilidade de alguns inseticidas e a limitada quantidade de água livre no solo reduz a movimentação horizontal e vertical destes, influenciando diretamente sua eficácia sendo os resultados menos satisfatórios em condições de elevadas densidades de larva no solo (GRAY; STEFFEY, 1998a). Chuva abaixo da média e mal distribuída ocorre com frequência na segunda safra, momento que coincide com a maior população de adulto e, conseqüentemente, de larva representando maior risco de dano.

No genótipo AG7000 a maior massa de raiz influenciou positivamente na eficácia do inseticida (Tabela 6 e 8). De acordo com Riedel e Evenson (1993), após conduzir estudo para avaliar diferentes genótipos durante as décadas de 60, 70 e 80 concluíram que o maior sistema radicular e conseqüente redução do acamamento foram os principais fatores responsáveis pela tolerância dos genótipos ao dano da larva de *D. v. virgifera* na década de 80 nos EUA.

A renovação da raiz após o dano demonstra a tolerância dos genótipos, apresentando impacto positivo sobre a produtividade quando a disponibilidade de água no solo for baixa após o dano ter ocorrido, caso contrário pode atuar negativamente (GRAY; STEFFEY, 1998b).

A maior ou menor intensidade de dano em diferentes genótipos pode estar relacionada à qualidade nutricional da raiz para a larva e devido a isto, em algumas linhagens de milho, o pequeno consumo da raiz resultou em bom ganho de peso e em outras maiores consumo resultou em perda de peso (MOESER; HIBBARD, 2005).

Durante a fase inicial de desenvolvimento e no momento das avaliações das raízes foram observados danos severos na região da coroa, principalmente no genótipo DKB330. Segundo Robert et al. (2012), as raízes da coroa do milho cultivado apresentam as maiores concentrações de ácido hidroxâmico (DIMBOA) que atuam como tóxico para herbívoros generalistas, porém *D. v. virgifera* utilizou este composto para identificar a região mais nutritiva da raiz (coroa), apresentando maior ganho de peso ao se alimentar da coroa em relação às outras regiões.

Entretanto, este efeito não foi determinado para os genótipos e condições locais deste estudo.

Em razão da maior oferta de genótipos adaptados e do crescimento da área semeada na segunda safra, será útil quantificar a influência dos danos de *D. speciosa* sobre a produtividade na época com maiores probabilidades de ocorrer danos severos dentro de cada região. De acordo com Tollefson (2007), durante décadas foram utilizadas diversas técnicas, com enfoques quantitativos e qualitativos, para selecionar genótipos resistentes considerando aspectos como: acamamento, nota de dano na raiz, resistência da raiz ao arranquio do solo, volume e tamanho do sistema radicular, renovação da raiz após dano e produtividade.

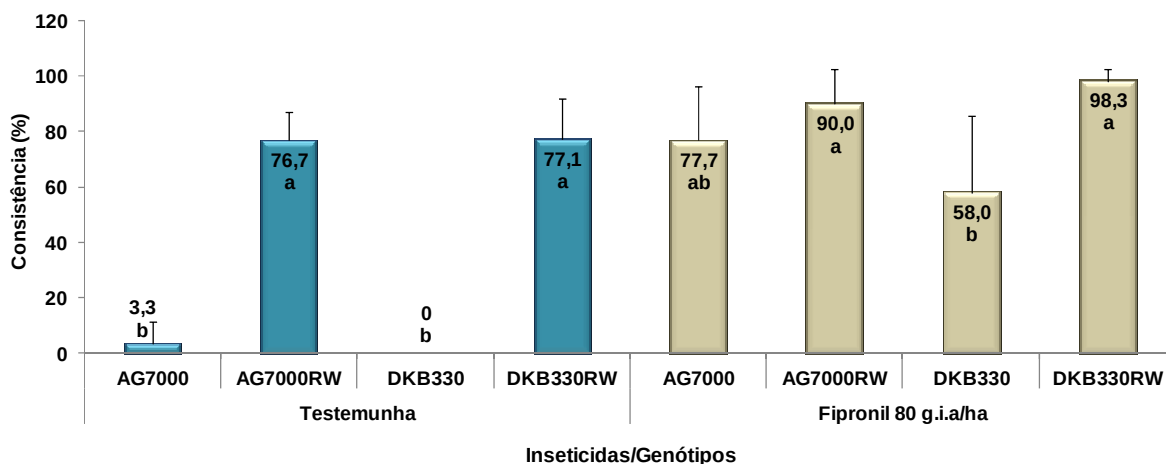
9.1.5 Avaliação da consistência das notas de dano na raiz

A consistência⁽⁴⁾ é um dos parâmetros importantes para se compreender o potencial de acamamento na lavoura que pode ocorrer durante todo o ciclo da cultura. Plantas que apresentam notas de dano maiores que 0,25 estão mais sujeitas à perda de produtividade e também são susceptíveis ao acamamento, principalmente quando os danos estiverem concentrados na coroa localizada logo acima do solo.

A planta torna-se mais susceptível ao acamamento próximo da emissão do pendão pelo fato de atingir sua altura máxima e não ter as raízes adventícias completamente formadas. Vento forte na presença de chuva intensa pode agravar o problema deitando as plantas sobre o solo prejudicando a polinização e a fotossíntese, podendo ainda ocorrer perda de espiga na colheita que darão origem a plantas voluntárias as quais servirão de alimento para outras pragas (UNIVERSITY OF MINNESOTA EXTENSION, 2007).

Os genótipos AG7000 (3,3%) e DKB330 (0,0%) apresentaram baixa consistência (0,25) na testemunha sem inseticida diferindo significativamente das isolíneas *Bt* com valores de 76,7 e 77,1% para os genótipos AG7000RW e DKB330RW, respectivamente (Figura 6).

⁴ Neste trabalho refere-se à frequência, medida em percentual, de plantas que receberam nota de dano igual ou menor que 0,25, 0,50 e 0,75.



CV 22,3% - Pr>F: 0,0001

CV 21,2% - Pr>F: 0,0504

FIGURA 6 – Avaliação da consistência (0,25) realizada aos 52 DAE na fase VT. Itaberá - SP, 2012.

Médias seguidas de letras iguais, quando tratado ou não tratado com inseticida, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão.

A presença do inseticida proporcionou uma elevação nos níveis de consistência em relação à testemunha, onde DKB330 (58,0%) foi semelhante a AG7000 (77,7%) e inferior aos dois genótipos *Bt* AG7000RW (90,0%) e DKB330RW (98,3%).

Ao abrir a interação por inseticida na variável consistência (0,25) observou-se diferença significativa para todos os tratamentos, mostrando que o mesmo contribuiu para a elevação dos níveis em todos os genótipos independentes se *Bt* ou não *Bt* (Tabela 7)

Em relação aos genótipos *Bt* na consistência (0,5) observou-se resposta apenas para AG7000RW (86,7%) não se repetindo para o genótipo DKB330RW (88,6%), e a partir da consistência (0,75) AG7000RW (95,0%) e DKB330RW (94,3%) não demonstraram resposta ficando esta restrita apenas os genótipos não *Bt* (Tabela 7).

TABELA 7 - Avaliação da consistência 0,25, 0,50 e 0,75 com a interação aberta por inseticida realizada aos 52 DAE na fase VT. Itaberá São Paulo, 2012.

Genótipos	Inseticida		% Consistência (0,25)	Pr>F	DESVPAD	CV (%)
	Dose g i.a. ha ⁻¹	Modo de aplicação				
AG 7000	Testemunha	---	3,3 b	0,0077	8,16	41,8
	Fipronil / 80	P.S ¹	77,7 a		19,66	
AG 7000RW	Testemunha	---	76,7 b	0,0103	10,32	6,8
	Fipronil / 80	P.S	90,0 a		12,64	
DKB 330	Testemunha	---	0,0 b	0,0095	0,00	71,7
	Fipronil / 80	P.S	58,0 a		27,74	
DKB 330RW	Testemunha	---	77,1 b	0,0097	14,96	10,5
	Fipronil / 80	P.S	98,3 a		4,08	
% Consistência (0,50)						
AG 7000	Testemunha	---	5,0 b	0,0003	12,24	33,6
	Fipronil / 80	P.S	87,7 a		12,11	
AG 7000RW	Testemunha	---	86,7 b	0,0422	5,16	5,8
	Fipronil / 80	P.S	95,0 a		8,36	
DKB 330	Testemunha	---	5,0 b	0,0067	5,47	56,3
	Fipronil / 80	P.S	66,0 a		10,29	
DKB 330RW	Testemunha	---	88,6 a	0,2266	14,63	11,1
	Fipronil / 80	P.S	98,3 a		4,08	
% Consistência (0,75)						
AG 7000	Testemunha	---	8,3 b	0,0001	16,02	25,7
	Fipronil / 80	P.S	96,7 a		5,16	
AG 7000RW	Testemunha	---	95,0 a	0,6109	5,47	5,5
	Fipronil / 80	P.S	96,7 a		5,16	
DKB 330	Testemunha	---	8,3 b	0,0044	7,52	47,9
	Fipronil / 80	P.S	78,0 a		10,67	
DKB 330RW	Testemunha	---	94,3 a	0,4238	11,33	10,0
	Fipronil / 80	P.S	100,0 a		0,00	

¹ P.S.= Pulverizado no sulco de semeadura. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A análise destes resultados demonstram a dificuldade de controle da fase larval deste inseto e que, embora, os melhores tratamentos, apresentando dano médio baixo, não estiveram livres de plantas com notas entre 0,25 e 0,75 quando submetidos a alta população de larva.

9.1.6 Avaliação do percentual de massa seca da raiz

O percentual de matéria seca da raiz foi maior no genótipo AG7000 em relação ao DKB330 característica inerente ao genótipo independente da versão *Bt* e do inseticida aplicado no sulco (Figura 7).

Estudando a bionomia de *D. v. virgifera*, Chiang (1973) propõe que a maioria das larvas que mantém relação com as plantas são encontradas em contato com as raízes, dentro delas ou em um volume de cinco litros de solo ao seu redor. Em condições de baixa umidade no solo, raízes com maior percentual de água podem oferecer um ambiente mais propício para o desenvolvimento da larva no interior do solo, reduzindo o efeito da desidratação, sendo então as do genótipo DKB330, possivelmente mais apropriadas por apresentar maior teor de água em relação a AG7000.

Do ponto de vista nutricional, segundo Moeser e Vidal (2004), a diferença na relação carbono/nitrogênio na raiz do milho, nas diversas fases de desenvolvimento da planta, pode afetar o desenvolvimento larval *D. v. virgifera*, já que larvas desta espécie, quando alimentadas com raízes contendo maior teor de nitrogênio, tiveram maior eficiência em transformar biomassa de raiz em biomassa de larva quando comparadas àquelas com menor teor.

Portanto, é necessário um estudo bromatológico que envolva além da quantificação e do percentual da massa seca o seu valor nutricional nos diferentes genótipos e fases de desenvolvimento da planta, para melhor compreender seus efeitos sobre o desenvolvimento da larva de *D. speciosa*.

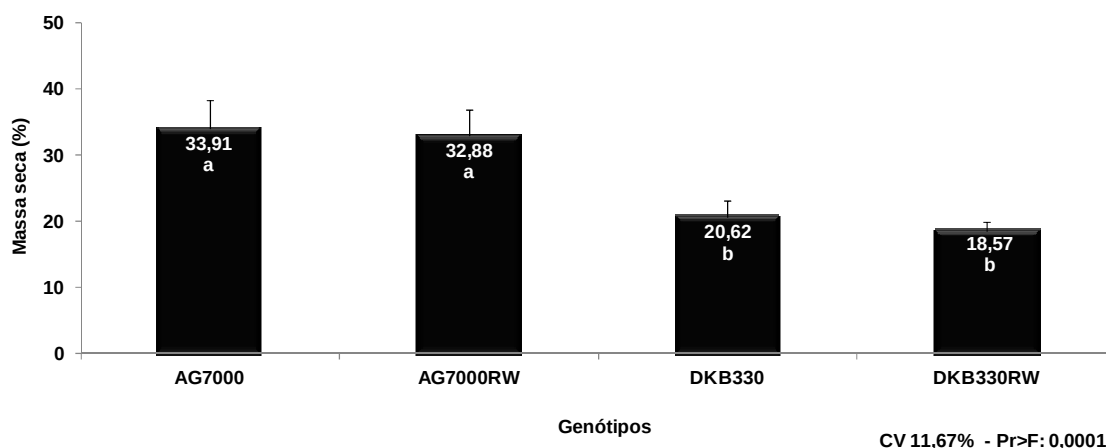


FIGURA 7 - Porcentagem de matéria seca na raiz avaliada aos 52 DAE na fase VT. Itaberá - SP, 2012.

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Barras de erro representam o desvio padrão.

9.1.7 Avaliação da massa seca da raiz

Os genótipos AG7000 e AG7000RW apresentaram maior massa de raiz em ambas as situações testadas, com e sem inseticida, em relação a DKB330 e DKB330RW (Tabela 8). Na comparação feita entre os genótipos notamos que AG7000 (580) e AG700RW (562) tiveram sua massa seca aumentada com maior intensidade na presença de inseticida, em relação à testemunha sem inseticida AG7000 (340) e AG7000RW (384), possivelmente favorecidos pela melhor distribuição do fertilizante no momento de abertura do sulco de semeadura para aplicação do inseticida. O mesmo efeito não foi observado para o DKB330 e DKB330RW devido sua característica de pequena massa de raiz.

Quando os genótipos foram comparados individualmente na presença e ausência de inseticida, apenas os genótipos AG7000 e AG7000RW foram superiores a eles mesmos na presença do inseticida.

A aplicação do inseticida no sulco foi realizada manualmente devido à limitada quantidade de semente impossibilitando a mecanização do plantio e consequente aplicação do inseticida via equipamento acoplado à semeadora. A abertura do sulco de semeadura para pulverização do inseticida resultou provavelmente em melhor homogeneidade do fertilizante no solo reduzindo um possível efeito salino e favorecendo o desenvolvimento das raízes. Os tratamentos sob estas condições tiveram um aumento da massa seca da raiz que pode ter contribuído indiretamente

para melhorar a eficácia do inseticida fipronil e da proteína Cry3Bb1 especialmente para AG7000 e AG7000RW.

TABELA 8 - Massa de matéria seca (g) de dez raízes avaliadas aos 52 DAE na fase VT. Itaberá - SP, 2012.

Híbridos	Inseticida aplicado no sulco						
	Testemunha		Fipronil 80 g i.a. ha ⁻¹		CV (%)		Pr>F
AG7000	340	A b	580	A a	21,5		0,008
AG7000RW	384	A b	562	A a	20,6		0,025
DKB330	123	B a	134	B a	10,5		0,264
DKB330RW	133	B a	142	B a	15,9		0,675
CV (%)	17,7		28,2				
Pr>F	0,0001		0,0001				

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

9.1.8 Avaliação do percentual de plantas acamadas

Com relação ao acamamento ocorreu resposta altamente positiva entre genótipos na ausência da aplicação de inseticida, demonstrando a eficácia dos genótipos RW em relação aos não *Bt*. O genótipo DKB330 (46,7), embora com valor numérico bastante superior ao AG7000 (12,0), permaneceu no mesmo grupo estatístico deste, devido à maior variabilidade dentro do tratamento com valores entre 22,1 a 79,4% de plantas acamadas (TABELA 9). O menor valor numérico apresentado pelo AG7000 possivelmente tenha ocorrido devido a sua maior massa seca de raiz. Os genótipos AG7000RW (1,2) e DKB330RW (3,5) foram semelhantes entre si e superiores as suas isolíneas não *Bt*, na ausência de inseticida. A avaliação dos genótipos com aplicação de inseticida demonstrou baixo percentual de plantas acamadas, não havendo diferença significativa entre os tratamentos, devido ao efeito do inseticida sobrepor-se ao da toxina.

Na comparação individual dos genótipos na presença e ausência do inseticida apenas o AG7000 e DKB330 apresentaram resposta significativa na redução do acamamento em relação a si mesmos na presença do inseticida.

Não houve registro da ocorrência de ventos fortes combinados com a presença de solo encharcado durante o período de máxima expressão de dano e antes da renovação da raiz; ainda assim, DKB330 mostrou-se altamente susceptível ao acamamento na ausência de inseticida quando comparado a AG7000.

TABELA 9 - Plantas com sintoma de acamamento (%) avaliado aos 121 DAE no momento da colheita Itaberá - SP, 2012. Os valores mostrados referem-se aos dados não transformados, porém na análise estatística foi utilizada a seguinte transformação ($\text{acam} = \text{acam}^{-0.5}$).

Genótipos	Inseticida aplicado no sulco						Pr>F
	Testemunha		Fipronil 80 g i.a. ha ⁻¹		CV (%)		
AG7000	12,0	B b	2,2	A a	43,7		0,015
AG7000RW	1,2	B a	0,5	A a	31,9		0,435
DKB330	46,7	A b	2,0	A a	47,9		0,011
DKB330RW	3,5	B a	0,2	A a	34,5		0,170
CV (%)	42,0		24,6				
Pr>F	0,0001		0,2410				

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

9.1.9 Avaliação da produtividade das plantas acamadas

Plantas acamadas podem estar presentes na lavoura independentemente da presença de danos da larva de *D. speciosa* na raiz. A presença de fungos fitopatogênicos na raiz e colmo, ventos fortes e nematoides podem dar origem a plantas acamadas, e devido a isto podemos encontrá-las em lavouras tratadas com inseticida ou mesmo aquelas onde o genótipo expressa proteína *Bt*. Identificar a causa do acamamento e a fase fenológica da cultura em que ele ocorreu é importante para entender suas consequências.

Neste experimento as plantas acamadas expressaram os sintomas na fase reprodutiva predominando plantas caídas sobre o solo (sem sintomas de curvatura da base do colmo) especialmente no genótipo DKB330, limitando a capacidade da planta em competir por água, luz e nutrientes, e consequente prejuízo nas funções fisiológicas. As plantas acamadas do genótipo AG7000 apresentavam desvio maior que 25° em relação ao próprio eixo vertical, porém seus colmos se mantiveram, na maioria, escorados nas plantas vizinhas, sem tocar o solo.

A interferência do acamamento sobre a produtividade está relacionada a fatores como solo, genótipo, disponibilidade de água no solo, entre outros. Em estudo realizado por Carter e Hudelson (1988), simulando acamamento em plantas sem dano na raiz, encontraram uma maior redução de produtividade quando provocado na fase reprodutiva das plantas entre 13-31% (V17-R1) e menor quando ocorre na fase vegetativa entre 2-6% (V10-V12) e 5-15% (V13-V15) dependendo do genótipo avaliado.

Sob as condições deste experimento, na comparação entre genótipos na testemunha, DKB330 terminou o ciclo com 46,7% de plantas acamadas as quais contribuíram com apenas 36,91% (3.863 kg) para a produtividade total do tratamento (10.469 kg), enquanto as plantas sem sintomas (53,3%) foram responsáveis por 63,08% da produtividade total (6.606 kg) (Tabelas 10 e 11). Não houve diferença significativa para a produtividade das plantas acamadas entre os genótipos, quando comparados com aplicação de inseticida, isto se deve à redução do percentual de plantas acamadas proporcionado pela aplicação do inseticida no sulco.

Na comparação individual dos genótipos, com e sem a presença do inseticida, apenas os genótipos AG7000 e DKB330 apresentaram redução significativa da produção das plantas acamadas na presença do inseticida.

Outra consequência decorrente do acamamento é a dificuldade da colheita mecânica, especialmente das plantas caídas sobre o solo, a qual não permite o total recolhimento para o interior da plataforma da colhedoura mesmo quando se reduz a velocidade de avanço da colhedoura (Gallo, observação pessoal).

Reduzir a eficiência de colheita no milho interfere diretamente na dinâmica de operação com máquina na propriedade, pois com a adoção da semeadura de variedades de soja do grupo de maturação V e VI em outubro ocorre a sobreposição da colheita desta ao milho.

TABELA 10 - Avaliação de produtividade das plantas acamadas (kg ha^{-1}) realizada no momento da colheita aos 121 DAE. Itaberá - SP, 2012.

Genótipos	Inseticida aplicado no sulco			
	Testemunha	Fipronil 80 g i.a. ha^{-1}	CV (%)	Pr>F
AG7000	1186 B a	217 A b	81,8	0,051
AG7000RW	104 B a	51 A a	89,9	0,595
DKB330	3865 A a	178 A b	64,4	0,017
DKB330RW	289 B a	8 A a	106,8	0,108
CV (%)	75,8	98,9		
Pr>F	0,0001	0,3017		

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

9.1.10 Avaliação da produtividade total

A produtividade total foi influenciada pelos danos na raiz, pelo acamamento e pelo clima no início da fase reprodutiva e enchimento de grão que transcorreu num período de pouca água disponível no solo (Figura 4).

Não houve diferença significativa na comparação entre os genótipos que receberam a aplicação de inseticida, isto se deve à redução dos danos e ao baixo percentual de plantas acamadas (Tabela 11). O genótipo DKB330 na testemunha produziu 1.771 Kg ha^{-1} menos (14,46%) em relação a sua isolínea RW sendo inferior aos demais, resultado influenciado pelo dano e o alto percentual de plantas acamadas neste genótipo (46,7%). Este comportamento também se deve à menor massa seca de raiz deste genótipo, maior acamamento e possivelmente à pequena habilidade de renovação da raiz após o dano.

A produtividade total, na testemunha, dos genótipos AG7000 e AG7000RW não diferenciou significativamente, devido ao baixo percentual de plantas acamadas.

TABELA 11 - Produtividade total (kg ha⁻¹) - soma da produtividade das plantas com e sem sintomas de acamamento em colheita realizada aos 121 DAE. Itaberá - SP, 2012.

Híbridos	Inseticida aplicado no sulco					
	Testemunha		Fipronil 80 g i.a. ha ⁻¹		CV (%)	Pr>F
AG7000	12154	A a	12388	A a	3,5	0,381
AG7000RW	12113	A a	12273	A a	3,7	0,565
DKB330	10469	B b	12171	A a	8,8	0,036
DKB330RW	12240	A a	12640	A a	4,0	0,183
CV (%)	6,3		3,5			
Pr>F	0,001		0,405			

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Na comparação individual dos genótipos, com e sem a aplicação de inseticida, apenas o DKB330 obteve produtividade superior significativa, demonstrando resposta à proteção do dano na raiz. O genótipo AG7000 não demonstrou diferença significativa, podendo indicar uma tolerância ao dano em condições de campo. Os genótipos AG7000RW E DKB330RW não tiveram sua produtividade aumentada significativamente quando comparados individualmente na presença ou ausência de inseticida.

A produtividade total do experimento mostrou correlação negativa fraca com acamamento e dano, -0,3540 (p=0,0136) e -0,4035 (p=0,0044), respectivamente, e isso se deve ao comportamento apresentado pelo genótipo AG7000. Por outro lado, o dano mostrou correlação positiva moderada com acamamento 0,6048 (p=0,0001) determinada pela resposta do genótipo DKB330.

AG7000 e DKB330 apresentaram danos semelhantes, porém apenas o primeiro não demonstrou redução de produtividade em relação a sua isolínea RW na testemunha, em função do menor percentual de acamamento, da forma como ele

ocorreu, sendo possivelmente influenciado pela maior massa seca de raiz e pela maior capacidade de renovação desta após dano.

Na figura 13 estão representados os dados de acamamento e produtividade total nas quarenta e oito parcelas avaliadas no experimento independente do tratamento. O acamamento mantém-se inferior a 10% até a nota de dano médio da parcela igual ou menor que 1,25. Parcelas com notas de dano médio superiores a 1,5 ocorrem um aumento do acamamento e atingem níveis próximos a 80% naquelas com dano de 2,25 (Figura 8a).

Comportamento semelhante ocorreu com a produtividade. No intervalo entre as notas 0 a 1,5 ela parece pouco afetada, e com valores maiores ocorre uma rápida redução na produtividade das parcelas avaliadas (Figura 8b). Porém, estes dados contemplam genótipos com comportamento muito diferente no campo em relação ao percentual de acamamento e a forma como ele ocorre.

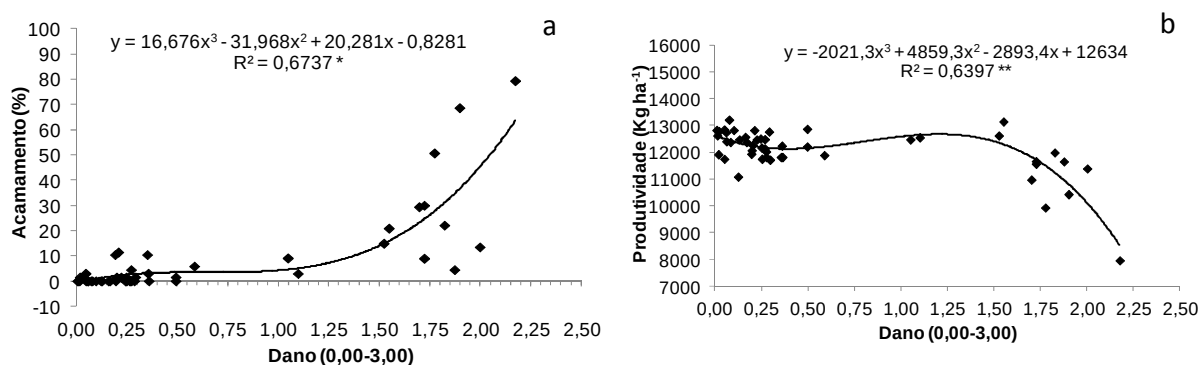


FIGURA 8 - Dados envolvendo todas as parcelas do experimento demonstrando a relação entre dano, acamamento e produtividade total. Itaberá SP – 2012.

Quando os dados foram agrupados e analisados por genótipos observa-se a diferença no comportamento dos dois genótipos estudados, ficando clara a necessidade de se caracterizar a resposta de cada genótipo ao dano e o consequente percentual de plantas que apresentam sintomas de acamamento e posterior nível de interferência destes fatores sobre a produtividade (Figura 9).

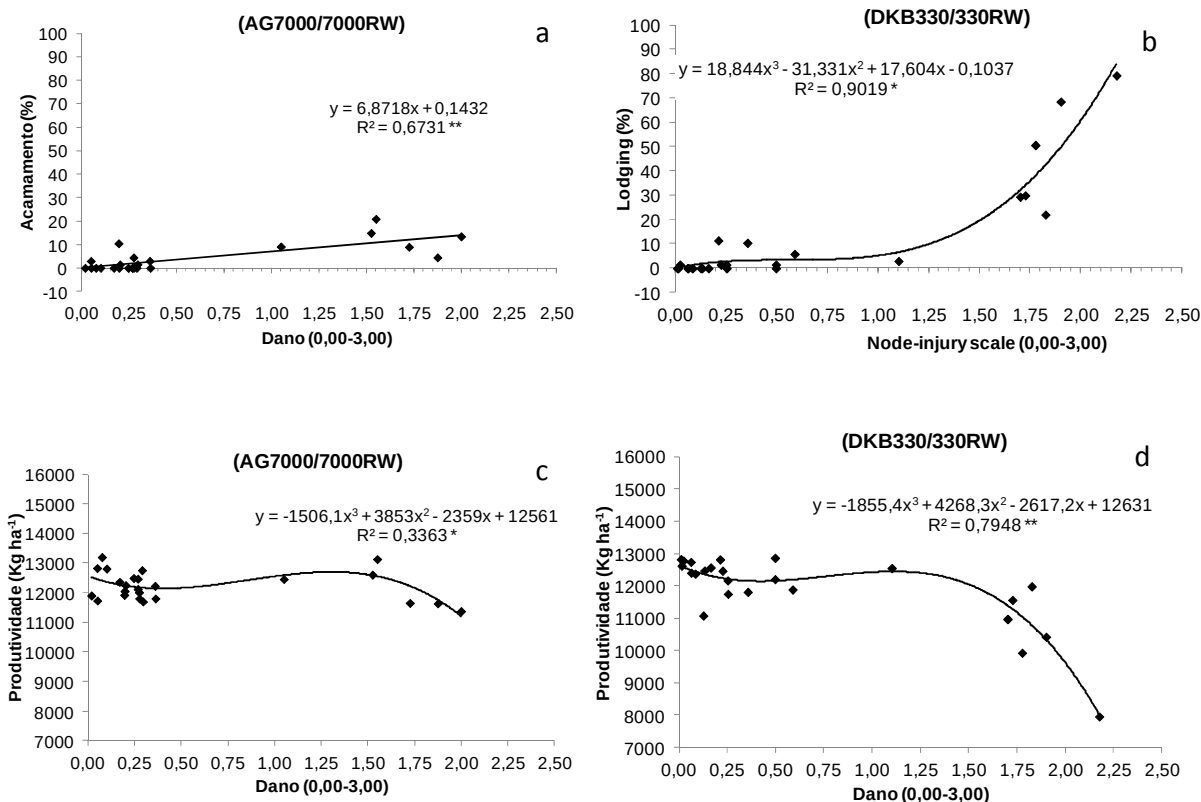


FIGURA 9 - Comparativo da relação de dano, acamamento e produtividade total entre os genótipos AG7000/7000RW e DKB330/330RW. Itaberá SP- 2012.

O dano médio na raiz demonstrou influência mais acentuada sobre o acamamento nos genótipos DKB330/330RW quando comparados aos genótipos AG7000/7000RW (Figura 9 a b). A produtividade obtida pelos genótipos AG7000/7000RW está entre a faixa de 10.000 a 13.000 kg sendo menos afetada pelos danos na raiz. Por outro lado, os genótipos DKB330/330RW apresentaram valores de produtividade entre 8.000 e 13.000 kg sendo influenciada de maneira direta pelo dano, principalmente quando este foi superior a 1,5 e pelo acamamento (Figura 9 c d).

10. EFEITO DA ÉPOCA DE SEMEADURA SOBRE O DANO DE *D. speciosa* EM RAIZ DE MILHO

10.1 AVALIAÇÃO DE DANO NA RAIZ DO MILHO EM ITABERÁ - SP

Nos experimentos de épocas de semeadura verificou-se que os danos nas raízes atingem o nível econômico (nota >3) a partir da semeadura de outubro, período que coincide com o aumento populacional dos adultos. As plantas cuja semeadura foi realizada a partir de novembro até fevereiro apresentaram danos maiores ou próximos de 4,0, ou seja, pelo menos uma coroa destruída demonstrando que a semeadura de segunda safra é mais sujeita ao dano de *D. speciosa* (Figura 10).

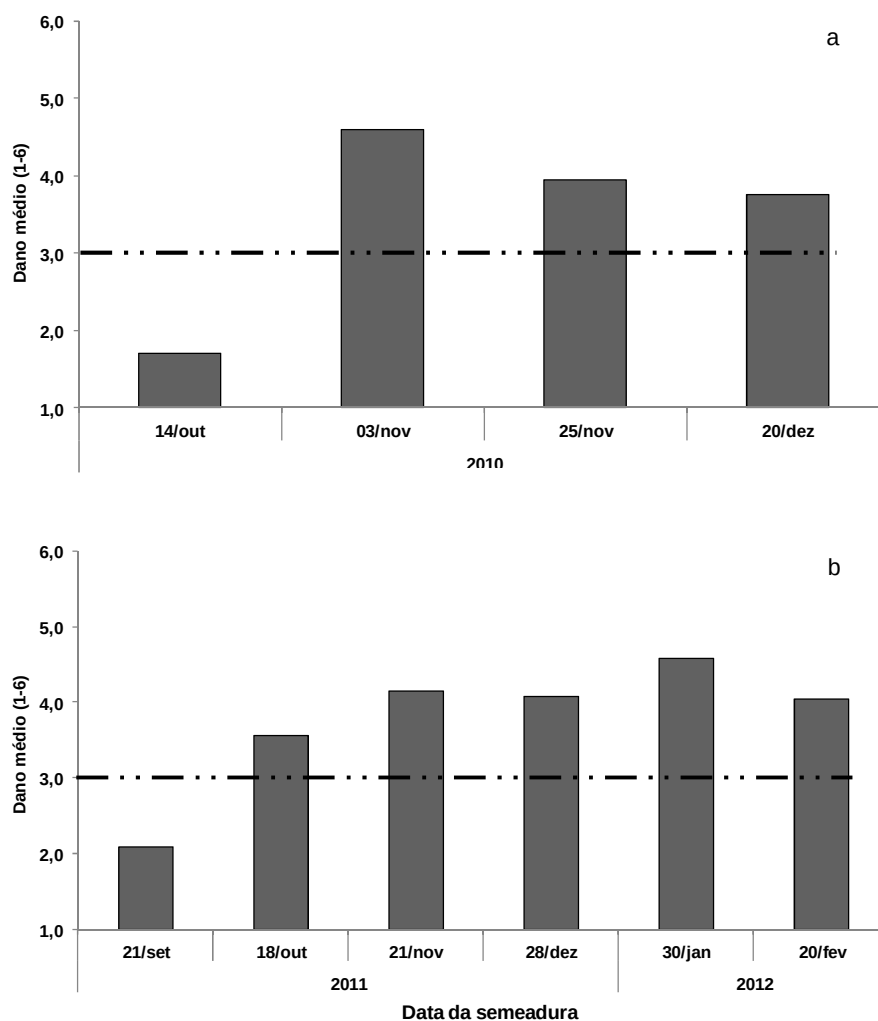


FIGURA 10 - Dano médio na raiz do milho na testemunha, de acordo com a época de semeadura no genótipo P30F53H em Itaberá – SP, safras 2010/2011 (a) e 2011/2012 (b). A linha tracejada no gráfico indica o nível de dano econômico segundo Hills e Peters (1971).

O milho semeado na segunda safra (novembro a fevereiro) permanece no campo até a chegada do inverno. A aveia preta (*Avena sp.*) utilizada como cobertura no outono/inverno e juntamente com o trigo (*Triticum aestivum* L.) contribuem para alimentar as larvas com suas raízes nesta época do ano (VENTURA; GOMES, 2004). A dinâmica da época de semeadura das culturas de feijão, milho e soja na região sul de São Paulo (altitude entre 600-700 metros) juntamente com a temperatura são fatores que influenciam na oferta de alimento e regulam o ciclo reprodutivo de *D. speciosa*.

As primeiras semeaduras de lavouras de feijão têm ocorrido em julho e agosto em áreas irrigadas atuando como fonte de alimento para os adultos das primeiras gerações *D. speciosa*. A maior densidade populacional poderá ocorrer após a colheita do feijão, quando as plantas voluntárias emergem no interior das lavouras do milho de segunda safra semeadas entre novembro e fevereiro (pós-feijão) garantindo alimento de boa qualidade para adultos oriundos das primeiras gerações que farão postura na base das plantas de milho sem custo de deslocamento à procura de plantas hospedeiras para as larvas. Na figura 11 consta um levantamento da área média semeada com feijão, soja e milho nas safras 2009/10, 2010/11 e 2011/12, na região de condução do experimento de eficácia da proteína.

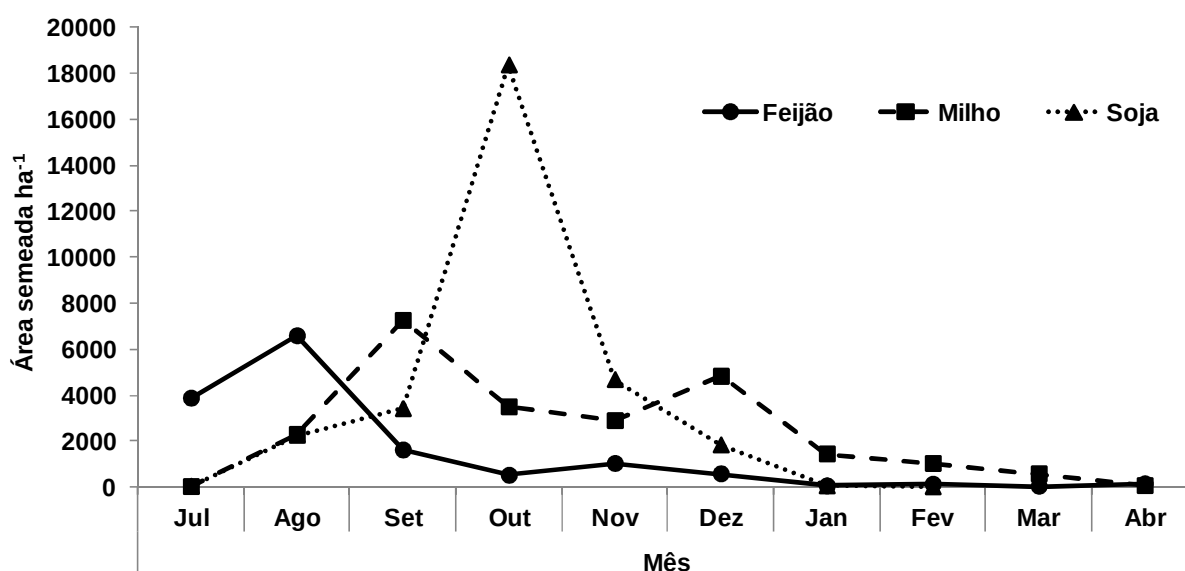


FIGURA 11 – Época e área média semeada com a cultura do feijão, soja e milho nas safras 2009/10, 2010/11 e 2011/12 na região de condução do experimento de eficácia. Amostra composta por 13 municípios para a cultura do feijão totalizando uma área de 14.480 hectares, 19 municípios para o milho com 23.830 hectares e 17 municípios para a cultura da soja com 23.830 hectares. Itaberá – SP, 2012.

Fonte: Agrobanco Fundação ABC – 2012.

10.2 AVALIAÇÃO DE DANO NA RAIZ DO MILHO EM CASTRO - PR

Em Castro - PR, nas duas safras estudadas, apenas na semeadura de vinte de novembro de 2011, o dano atingiu o nível econômico (Figura 12). Em todas as demais épocas de semeadura registraram-se notas de danos menores que três.

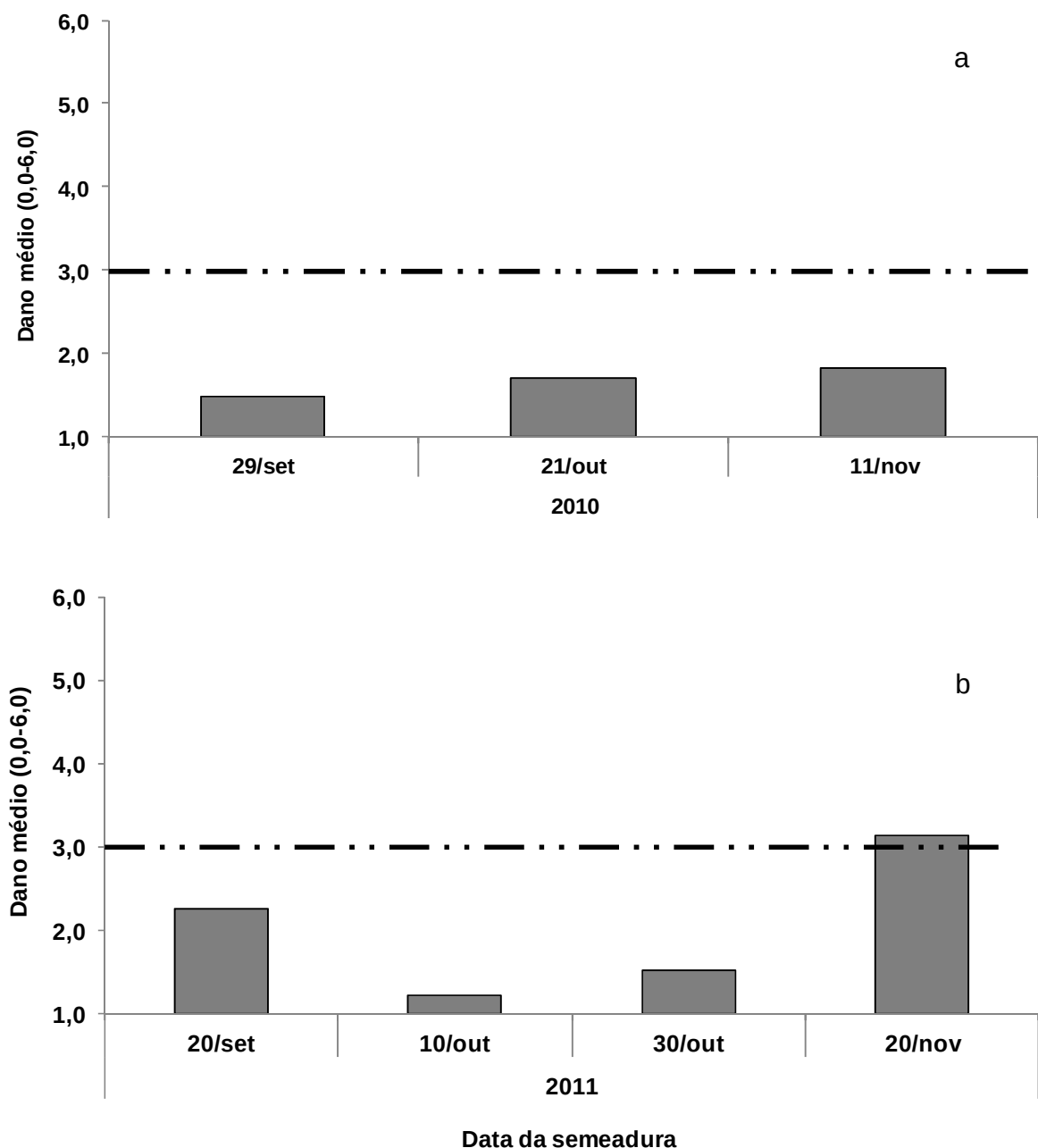


FIGURA 12 - Dano médio na raiz do milho na testemunha, de acordo com a época de semeadura no genótipo P30F53H em Castro – PR, safras 2010/2011(a) e 2011/2012 (b). A linha tracejada no gráfico indica o nível de dano econômico segundo Hills e Peters (1971).

Na região de atuação da Fundação ABC localizada ao Sul do Paraná com altitude entre 800-1100 metros (compreende os municípios de Castro, Ponta Grossa, Carambeí, Palmeira, Imbituva, Ipiranga, Pirai do Sul, Jaquaríva, Sengés e Tibagi) a maior área de semeadura com a cultura do milho ocorre até o mês de setembro atingindo 86,69%, alcançando um valor acumulado de 96,37% em outubro na média das três últimas safras (AGROBANCO FUNDAÇÃO ABC, 2012).

A semeadura do feijão está distribuída de setembro a fevereiro com uma área maior em setembro e outubro e outra menor em janeiro após milho colhido para silagem, não havendo segunda safra de milho devido à limitação da baixa temperatura no inverno. Nos meses de setembro e outubro, embora existindo alimento de boa qualidade para o adulto, a baixa temperatura torna de *D. speciosa* mais longo fazendo com que a população cresça lentamente neste período, atingindo a máxima densidade em fevereiro quando a temperatura é maior, coincidindo com o desenvolvimento inicial do feijão semeado pós-milho colhido para silagem, sendo então a fase adulta deste inseto importante praga desfolhadora na cultura do feijão. A interação entre a época de semeadura das culturas e a temperatura torna o milho menos exposto aos danos em relação à segunda safra da região sul de São Paulo (Figuras 10 e 12).

Com isso as lavouras de milho atravessam o período preferencial de postura de *D. speciosa* que compreende desde a emergência das plantas até seis folhas desenvolvidas com presença de reduzido número de adultos, principalmente em anos sob o efeito da La Niña quando a temperatura média se apresenta ainda mais baixa (Gallo, observação pessoal). A continuidade dos levantamentos da densidade populacional de adultos e da intensidade de danos na raiz é necessária para a manutenção e atualização destes dados ao longo dos anos.

11. CONCLUSÕES

Os genótipos AG7000RW e DKB330RW foram eficazes na redução do dano na raiz do milho ocasionado pela larva de *D. speciosa*.

O inseticida fipronil reduziu significativamente os danos provocados pela larva de *D. speciosa* e o acamamento de plantas, quando comparado à testemunha sem controle, podendo ser utilizado na proteção da raiz do milho.

O inseticida fipronil aplicado no sulco não proporcionou resposta para os parâmetros produtividade e acamamento na presença da proteína, independente do genótipo testado.

Notas de danos semelhantes podem apresentar diferentes níveis de influência sobre a produtividade, de acordo com o genótipo avaliado, devido seu efeito sobre o acamamento; portanto não é possível medir a perda de produtividade estimando apenas este parâmetro de forma isolada.

As plantas de milho provenientes das semeaduras realizadas nos meses de agosto e setembro estão menos expostas ao dano de *D. speciosa* quando comparadas às aquelas semeadas após este período.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genótipos geneticamente modificados que expressam a toxina *Bt* na raiz representarão um avanço no manejo de *D. speciosa*, especialmente na segunda safra, onde esta praga tem sido responsável por parte das plantas acamadas devido ao dano ocasionado pelas larvas e à pequena adoção da proteção da raiz através da aplicação de inseticida no sulco de semeadura nesta cultura em nosso país.

Desde 1981 estudos têm sido realizados sobre a biologia de *D. speciosa* em condição de laboratório, porém é necessário conhecer melhor a bioecologia deste inseto nas condições das regiões produtoras de milho no Brasil. Os estudos realizados com *D. v. virgifera* nos EUA nem sempre podem ser transferidos para nossas condições por se tratar de espécies diferentes vivendo em ambientes com características climáticas próprias e que apresentam coevolução com plantas hospedeiras distintas, o que aparentemente pode resultar em mais diferenças que semelhanças. Também há necessidade de determinar se os genótipos expressam doses altas o suficiente para retardar a seleção de fenótipos resistentes, se a herança genética é recessiva, qual a frequência do alelo nas populações, qual o custo adaptativo e como será a regulamentação da área de refúgio.

Conhecer o clima de cada região, a dinâmica dos cultivos, o nível tecnológico adotado pelo agricultor, as características de cada genótipo em relação à reação ao dano na raiz e o acamamento, bem como a bioecologia deste inseto nos nossos cenários agrícolas, poderão contribuir para melhor aproveitamento e preservação desta tecnologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROBANCO FUNDAÇÃO ABC – Banco de dados - Fundação ABC – Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário. Intranet área restrita. Acesso em: 20 jul. 2012.

ARRUDA-GATTI, I. C.; VENTURA, M. U. Iscas contendo cucurbitacinas para o manejo de *Diabrotica* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, n.2, p.331-336, 2003.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes hospedeiros. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.739-743, 2002.

ÁVILA, C. J.; GOMEZ, S. A. Controle químico de larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) na cultura do milho. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, p.254-257, 2001.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Influência da temperatura sobre a fecundidade e longevidade de adultos de *Diabrotica speciosa* (GERMAR, 1824) (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE). **Anais e ata. VII Reunião Sul Sobre Pragas de Solo**, Piracicaba São Paulo, 19-20/out.1999.

BITENCOURT, D. R. **Biologia, capacidade reprodutiva e consumo foliar de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1892) (Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes hospedeiros.** Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) - Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Dourados, Mato Grosso, 2007.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v.26, n.2, p.211-252, 1964.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v.26, n.10, p.573-579, 2008.

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

CABRERA WALSH, G. **Diabroticina (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) de la Argentina y el Cono Sur: una Visión Biogeográfica y Evolutiva de su Biología y la de sus Enemigos Naturales, en Relación con la Factibilidad del Control Biológico de las especies Plagas.** Tese apresentada a Universidade de Buenos Aires para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas, 2005.

CABRERA WALSH, G. Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. **Environmental Entomology**, v.32 n.2, p.276-285, 2003.

Cal/EPA. California Environmental Protection Agency. Environmental Fate of Fipronil. Environmental Monitoring Branch Department of Pesticide Regulation 1001 I Street California Environmental Protection Agency Sacramento, 2007. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/fipronilre v.pdf>> acesso em 22 set. 2012.

CARTER, P. R; HUDELSON, K. D. Influence of simulated wind lodging on corn growth and grain yield. **Journal of Production Agriculture**, v.1, p.295-299. 1988.

CARVALHO, S. M.; HOHMANN, C. L. Biologia e consumo foliar de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., 1753), em condições de laboratório. In Reunião nacional de pesquisa de feijão, 1., Goiânia, 1982. **Resumos...** Goiânia, EMBRAPA/CNPAP, 1982.

CHANDLER, L. D. Corn rootworm areawide management program. United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service. **Pest Management Science**, v.59, p.605-608, 2003.

CHIANG, H. C. Bionomics of the northern and western corn rootworms. **Annual Review of Entomology**. v.18, p.47-72, 1973.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/12 – Oitavo Levantamento – Maio/2012. Brasília, 2012. Disponível em. <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_06_11_11_19_12_boletim_junho_2012.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2012.

CLARK, P. L.; VAUGHN, T. T.; MEINKE, L. J.; MOLINA-OCHOA, J.; FOSTER, J. E. *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) larval feeding behavior on transgenic maize (MON 863) and its isolate. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n.3, p.722-727, 2006.

CRICKMORE, N.; ZEINGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERUCLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A. “**Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**”, 2011. Disponível em <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/> Acesso em 09 out. 2012.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE J.; LERECLUS, D.; BAUM,J.; DEAN D. H. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Miology reviews**, n.3, v.62, p.807–813, 1998.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS. Circular técnica N° 21, novembro, 1995.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2ed. Rio de Janeiro, 306p. 2006.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ocorrência e controle de pragas na safrinha de milho nas regiões Norte e Oeste do Paraná. Circular técnica N° 45, Sete Lagoas, Minas Gerais, dezembro, 2004.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Biopesticides Registration Action Document, 2011. Smartstax® MON89034 x TC1507 x DAS-59122-7 *Bt* seed corn blend. Disponível em:<<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/smartstax-seedblend.pdf>> Acesso em: 19 fev. 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Biopesticides registration action document, 2010a: *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 Protein and the Genetic Material Necessary for Its Production (Vector PV-ZMIR13L) in MON 863 Corn and *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 Protein and the Genetic Material Necessary for Its Production (VectorPV-ZMIR39) in MON 88017 Corn. Disponível em:<<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/cry3bb1-brad.pdf>> Acesso em: 22 set. 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Biopesticides Registration Action Document, 2010b. Optimum® AcreMax™ *B.t.* Corn Seed Blends. Disponível em:<<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/bt-seed-blends.pdf>> Acesso em: 19 fev. 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. Pesticide Fact Sheet, 2009. Disponível em:<<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/smartstax-factsheet.pdf>> Acesso em: 19 fev. 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. *Bt* Cry3Bb1 Corn Biopesticide Registration Action, 2007. Insect Resistance Management. Disponível em:<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/tech_docs/cry3bb1/2_d_cry3bb1_irm.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2012.

FABRICK, J.; OPPERT, C.; LORENZEN, M. D.; MORRIS, K.; OPPERT, B.; JURAT-FUENTES, J. L. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.27, p.18401-18410, 2009.

FANCELLI, A. L. Fisiologia, nutrição e adubação do milho para alto rendimento. In: SIMPÓSIO ROTAÇÃO SOJA/MILHO NO PLANTIO DIRETO, 1., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, SP: Potafós, 2000.

GALITSKY, G.; CODY, V.; WOJTCZAK, A.; GHOSH, D.; LUFT, J. R.; PANGBORN, W.; ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallography**. Section D57, p.1101-1109, 2001.

GASSEN, D. N. **Pragas desfolhadoras em plântulas de soja**. Cooplantio - Cooperativa dos Agricultores do Plantio Direto, 3p. (Informativo nº. 55) 2002.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo, Rio Grande do Sul: Aldeia Norte, 132p. 1996.

GASSEN, D. N. **Pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo, Rio Grande do Sul: Aldeia Norte, 92p. 1994.

GASSEN, D. N. **Insetos Subterrâneos Prejudiciais às Culturas no Sul do Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA - CNPT, 72p. 1989.

GASSEN, D. N. **Insetos associados à cultura do trigo no sul do Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA/CNPT, 39p. 1984.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. **PLoS ONE**, v.6, n.7, 2011.

GRAY, M. E.; STEFFEY, K. L. Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Larval Injury and Root Compensation of 12 Maize Hybrids: an Assessment of the Economic Injury Index. **Entomological Society of America**, v91, n3, 1998b.

GRAY, M. E.; STEFFEY, K. L. Soil insecticides and root protection: a sure thing, or a roll of the dice each season. Proc. Illinois Agricultural Pesticides Conference. 6-8 Jan. 1998a.

HAJI, N. F. P. **Biologia, dano e controle do adulto de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) na cultura da batatinha (*Solanum tuberosum* L.)**. 53p, 1981. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba SP, 1981.

HILLS, T. M.; PETERS, D. C. A method of evaluating postplanting insecticide treatments for control of western corn rootworm larvae. **Journal of Economic Entomology**, v.64, p.764-765, 1971.

HOHMANN, C. L.; CARVALHO, S. M. Pragas e seu controle In: O feijão no Paraná. **IAPAR**- Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina. Circular técnica nº 63. p.217-246, 1989.

KHALER, L. A.; OLNES, A. E.; SUTTER, G. R.; DUBING, C. D.; DEVINE, O. J. Root damage by corn rootworm and nutrient content in maize. **Agronomic Journal**, v.77, p.769-774, 1985.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. Wall-map 150 cm x 200 cm, 1928.

LAUMANN, R. A.; RIBEIRO, P. H.; RAMOS, N.; PIRES, C. S. S.; SCHMIDT, F. G. V.; BORGES, M.; MORAIS, M. C.B.; SUJII, E. R. **Ritmos diários de atividades comportamentais de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) relacionados à temperatura**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília- DF, comunicado técnico número 90, 2003.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.34, n.11, p.1983-1986, 1999.

MARTINEZ, S. S. Controle da vaquinha do feijoeiro com o inseto triturado. **Revista Agroecologia Hoje**, n.4, p.22, 2003.

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Biologia e exigências térmicas de *Diabrotica speciosa* em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.1, p.23-29, 2000 a.

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Preferência de *Diabrotica speciosa* para oviposição em diferentes tipos e umidade de solos. Londrina, Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.1, p.155-158, 2000 b.

MILANEZ, J. M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. Piracicaba, 1995. 102p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1995.

MEISSLE, M.; PILZ, C.; ROMEIS, J. Susceptibility of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* when feeding on *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 - expressing maize. **Applied and environmental microbiology**, v.75, n.12, p.3937-3943, 2009.

MITCHELL, P. D. Yield benefit of corn event Mon 863. Faculty paper series 02-04. Dept. Agric. Econ., Texas A&M Univ., College Station. 2002. Disponível em: <http://agecon.tamu.edu/pdf_files/publications/facultyPapers/2002/fp02-04.pdf> Acesso em: 18 nov. 2012.

MOESER, J.; HIBBARD, B. E. A synopsis on the nutritional ecology of larvae and adults of *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) in the new and old world-nouvelle cuisine for the invasive maize pest *Diabrotica virgifera virgifera* in Europe?. In: Vidal, S.; Kuhlmann, U.; Edwards, R. editors. **Western Corn Rootworm: Ecology and Management**. Wallingford, United Kingdom: CABI publishers. p.41-65, 2005.

MOESER, J.; VIDAL, S. Larvae of invasive maize pest *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) to carbon/nitrogen ratio and phytosterol content of European maize varieties. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n.4, p.1335-1341, 2004.

MURDOCK, L. L.; BROOKHART, G.; DUNN, P. E.; FOARD, D. E.; KELLEY, S.; KITCHI, L.; SHADE, R. E.; SHUKLE, R. H.; WOLFSON, J. L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Physiology and Biochemistry**, v.87B, n.4, p.783-787, 1987.

NARDI, C. **Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa***. Piracicaba SP. 106p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2010.

NAVA, D. E.; ÁVILA, J. V.; PARRA, J. R. P. **Atividade diurna de adultos de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho e de *Cerotoma arcuatus* na cultura da soja**. Dourados - Mato Grosso do Sul: Embrapa agropecuária oeste, 22 p. (Documentos 64 / Embrapa Agropecuária Oeste), 2004.

NGUYEN, H. T.; JEHLE, J. A. Expression of Cry3Bb1 in transgenic corn MON88017. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57,n.21, p.9990–9996, 2009.

OLESON, J. D.; PARK, Y. L.; NOWATZKI, T. M.; TOLLEFSON, J. J. Node-injury scale to evaluate root injury by corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**. v.90, n.1, p.1-8, 2005.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, p.1-20, 30 April 2012.

RICE, M. E. **Transgenic rootworm corn: Assessing potential agronomic, economic, and environmental benefits**. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2004-0301-01-RV. 2004. Disponível em <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2004/rootworm>> acesso em: 12 nov. 2011.

RIEDEL, D. R.; EVENSON, P. D. Rootworm feeding tolerance in single-cross maize hybrids from different eras. **Crop Science**, v.33, n.5, p.951-955, 1993.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. Como a planta de milho se desenvolve. **POTAFÓS - Associação brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato**. Arquivo do agrônomo n^o 15. Informações agronômicas n.103, set. 2003.

ROBERT, C. A. M.; VEYRAT, N.; GLAUSER, G.; MARTI, G.; DOYEN, G. R.; VILLARD, N.; GAILLARD, M. D. P.; KOLLNER, T. G.; GIRON, D.; BODY, M.; BABST, B. A.; FERRIERI, R.; TURLINGS, T. C. J.; ERB, M. A specialist root herbivore exploits defensive metabolites to locate nutritious tissues. **Ecology Letters**, 15: p.55–64, 2012.

SAYED, A.; NEKL, E. R.; SIQUEIRA, H. A.; WANG, H. C.; FFRENCH-CONSTANT, R. H.; BAGLEY, M.; SIEGFRIED, B. D. A novel cadherin-like gene from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), larval midgut tissue. **Insect Molecular Biology**, v.16, n.5, p.591–600, 2007.

SEAB. Secretaria da agricultura e do abastecimento departamento de economia rural. Análise da conjuntura agropecuária - safra - Milho 2011/12. Curitiba Paraná/ Outubro 2011. Disponível em: < http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/milho_2011_12.pdf. > Acesso em: 14 jun. 2012.

SILVA, A. L. da; VELOSO, V. da R. S.; CRISPIM, C. M. P.; BRAZ, V. C.; SANTOS, L. P. dos; CARVALHO, M. P. de. Avaliação do efeito de desfolha na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.33, n.2, p.83-87, 2003.

SMA – abc – Sistema de Monitoramento Agrometeorológico- Fundação ABC – Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário. Intranet área restrita. Disponível em: <<http://sma.fundacaoabc.org.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, 66, p.1337-1349, 2009.

STEFFEY, K. L.; GRAY, M. E.; SCHROEDER, J. B.; ESTES, R. E. **Will rootworm *Bt* corn solve all of our rootworm control problems?** Proceedings of the 2006 Indiana conference, Indianapolis. Disponível em: <http://www.agry.purdue.edu/CCA/2006/PDF/Steffey.pdf> Acesso em: 12 fev. 2011.

STÜPP, J. J.; BOFF, M. I. C.; GONÇALVES, P. A. S. Manejo de *Diabrotica speciosa* com atrativos naturais em horta orgânica. **Horticultura Brasileira**, v.24, p.442-445, 2006.

TABASHNIK, B; GOULD, F. Delaying rootworm resistance to *Bt* crop. **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.3, p.767-776, 2012.

TOLLEFSON, J. J. Evaluating maize for resistance to *Diabrotica virgifera* virgifera leconte (coleoptera: chrysomelidae). **Maydica**, v.52, p.311-318, 2007.

TURPIN, F. T. Western corn rootworm. Cooperative Extension Service, Department of Entomology. **Purdue University, Publication E-201**, 5p.1972.

TURPIN, F. T.; PETERS, D. C. Survival of Southern and Western Corn Rootworm larvae in relation to soil texture. **Journal of Economic Entomology**, v.64, p.1448-1451, 1971.

UNIVERSITY OF MINNESOTA EXTENSION NEWSLETTERS, 2007. SW Minnesota IPM STUFF 2007-7 07/05/2007. Disponível em: <http://swroc.cfans.umn.edu/prod/groups/cfans/@pub/@cfans/@swroc/documents/aset/cfans_asset_247275.pdf> Acesso em 05 ago. 2012.

VENTURA, M. U.; GOMES, M. R. Estudo Populacional de *Diabrotica speciosa* (Ger.) (Coleoptera: Chrysomelidae) no Outono / Inverno. **Ciência Rural** v.34, n.6, 2004.

VIANA, P. A. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 141).

VIANA, P. A.; MAROCHI, A. I. Controle químico da larva de *Diabrotica* spp. na cultura do milho em Sistema de Plantio Direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.2, p1-11, 2002.

VIANA, P. A. Manejo de larva de *Diabrotica speciosa* em sistemas agrícolas: in V reunião Sul-Brasileira de insetos de solo. **Atas e resumos**. Dourados, Mato Grosso do Sul, 1995.

WEDBERG, J. L. **Corn Rootworms**. University of Wisconsin-System Board of Regents and University of Wisconsin-Extension, Cooperative extension A3328, 1996. Disponível em:< <http://www.virtual.chapingo.mx/dona/paginaCBasicos/rootworms.pdf>> Acesso em 28 jul. 2012.

APÊNDICE

Protocolo de campo.

Apêndice A - Protocolo utilizado para a condução do experimento no campo.

Tratamento	Pulverização de sulco	Genótipos
1	Testemunha	AG7000
2		AG7000RW
3		DKB330
4		DKB330RW
5	Fipronil 80 g i.a. ha ⁻¹	AG7000
6		AG7000RW
7		DKB330
8		DKB330RW

ANEXO

Estádios fenológicos da planta de milho.

Anexo A - Descrição detalhada dos estádios de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da planta de milho.

I. Fase Vegetativa	
VE	Emergência
V1	Primeira folha
V2	Segunda folha
V3	Terceira folha
V6	Sexta folha
V8	Oitava folha
V9	Nona folha
V12	Décima segunda folha
V15	Décima quinta folha
V18	Décima oitava folha
VT	Emissão da inflorescência masculina
II. Fase Reprodutiva	
R1	Florescimento
R2	Grão leitoso
R3	Grão pastoso
R4	Grão farináceo
R5	Grão farináceo-duro
R6	Maturidade fisiológica

Fonte: RITCHIE, HANWAY; BENSON, 2003.