

QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CRY1AB EM FOLHAS, CAULES E GRÃOS DE DOIS HÍBRIDOS DE MILHO BT E CONTROLE DAS PRAGAS *Spodoptera frugiperda* E *Helicoverpa zea*¹

GERALDO BALIEIRO NETO², TEREZINHA MONTEIRO DOS SANTOS CIVIDANES², ROBERTO BOTELHO BRANCO², MARIA DO ROSÁRIO FERNANDES FELIX³, FERNANDO MANUEL DE CAMPOS TRINDADE REI³, JOSÉ RAMOS NOGUEIRA²

¹Pesquisa financiada pela FAPESP. Recebido para publicação em 15/02/13. Aceito para publicação em 24/05/13.

²Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), Av. Bandeirantes, 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP, Brasil. E-mail: geraldobalheiro@apta.sp.gov.br

³Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Núcleo da Mitra, Ap. 94, 7002-554, Évora, Portugal.

RESUMO: Procedeu-se à avaliação do nível de infestação e respectivos danos associados à presença das lagartas *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*, em dois milhos híbridos geneticamente modificados (OGM), Dekalb DKB390 e Agrocere AG8088, que expressam a proteína Cry1Ab. Foi estabelecido em blocos casualizados, com dois fatores (híbrido e gene cry1Ab), sendo utilizadas como controles os mesmos híbridos sem a proteína Cry1Ab (NOGM). A concentração da proteína Cry1Ab foi determinada pela técnica ELISA em caules, folhas e grãos dos milhos OGM, previamente desidratados por liofilização. A contabilização do número de lagartas de *S. frugiperda* e danos associados foi realizada aos 15, 22, 29, 36 e 42 dias após a semeadura, segundo uma escala com 5 níveis (0-ausência praga; 5-planta morta). A contabilização do número de lagartas de *H. zea* e danos associados foi realizada aos 57, 71, 78 e 85 dias após a semeadura, segundo uma escala com 4 níveis (0-ausência praga; 4- o inseto penetrou até o sabugo, não se aprofundando mais que 3 cm). O número de larvas foi contabilizado segundo dois níveis, menores ou iguais a 15mm e maiores de 15mm. Nenhuma aplicação inseticida foi realizada nos talhões com milhos OGM enquanto os talhões com milhos NOGM foram pulverizados com uma aplicação de deltametrina (2,8%) 42 dias após a semeadura. O nível de infestação e danos associados a *S. frugiperda* foram significativamente menores ($p < 0,05$) nos milhos OGM em comparação com os milhos NOGM. Todavia, o número e danos associados a lagartas de *S. frugiperda* inferiores a 15 mm, foram superiores no milho OGM DKB390 quando comparado com o milho OGM AG8088. Não se verificaram diferenças no nível de infestação por lagartas-do-cartucho e danos associados entre milhos OGM e entre milhos NOGM. Em média, a concentração da proteína associada ao gene cry1Ab foi superior nas folhas e caules em comparação com a concentração presente nos grãos e, em média, superior no milho OGM AG8088 relativamente ao milho OGM DKB390. Não foram encontradas diferenças no nível de danos causados por lagartas de *H. zea* no milho AG8088 OGM e NOGM, após 71, 78 e 85 dias da semeadura. Conclui-se que embora os milhos OGM tenham sido eficientes na limitação das duas pragas, foram mais eficientes na limitação de *S. frugiperda* em comparação com *H. zea* resultado que estará associado à maior concentração da proteína nas folhas (8,062 ug/g de tecido fresco) e caules (5,626 ug/g de tecido fresco), em comparação com a existente no grão (0,372 ug/g de tecido fresco). Por sua vez, o teste ELISA foi eficiente na quantificação da proteína Cry1Ab em tecidos vegetais de milho.

Palavras-chave: Milhos transgênicos, proteína Cry1Ab, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*.

CRY1AB PROTEIN QUANTIFICATION IN LEAVES, STEMS AND GRAINS, AND EFFECTIVENESS TO CONTROL *Spodoptera frugiperda* AND *Helicoverpa zea* ON TWO HYBRIDS OF GENETICALLY MODIFIED CORN

ABSTRACT: A study was carried out to evaluate the infestation and associated damages to the presence of the *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* caterpillars, in two genetically modified (GM) corn, Dekalb DKB390 and Agrocere AG8088, expressing the cry1Ab protein. For this objective, an split-plot design with two factors (hybrid x gene) was carried out. Negative controls were made with the same corn hybrids without the gene cry1Ab (NoGM). The concentration of the protein Cry1Ab was determined by the ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) technique in previously dehydrated stems, leaves and grains of GM corns. Caterpillars sampling of *S. frugiperda* and associated damage survey were accomplished at 15, 22, 29, 36 and 42 days after the sowing, according to a damage scale with 5 levels (0- pest absence to 5- dead plant). Countings of *H. zea* caterpillars and associated damage were assessed at 57, 71, 78 and 85 days after the sowing, according to a damage scale with 4 levels (0-pest absence curse to 4-gallery in the corn cob minor than 3cm). Sampled caterpillars were divided in two groups, smaller or equal to 15mm and bigger than 15mm. No insecticide application was accomplished in the GM blocks while NoGM blocks were sprayed with deltametrina (2,8%), 42 days after the sowing. The infestation level and associated damage due to *S. frugiperda* presence was significantly smaller ($p < 0,05$) in the GM corns in comparison to NoGM corns. Nevertheless, the number and associated damage of *S. frugiperda* caterpillars, smaller than 15 mm, were superior in the GM DKB390 corn when compared to the GM AG8088 corn. Differences were not observed in the *S. frugiperda* infestation and associated damage between GM corns and between NoGM corns. On average, the concentration of Cry1Ab protein was significantly superior in leaves and stems in comparison to the grain and, usually, superior in the GM AG8088 corn comparatively to GM DKB390 corn. No differences were found on level damages caused by caterpillars of *H. zea* in GM and NoGM AG8088 corns, after 71, 78 and 85 days of sowing. In conclusion, GM corns were more efficient in the limitation of *S. frugiperda* in comparison with *H. zea*, a result that can be associated to the largest Cry1Ab protein concentration observed in leafs (8.062 ug/g fresh tissue) and stems (5.626 ug/g fresh tissue) in comparison to the existent in the grain (0.372 ug/g fresh tissue). Also, ELISA technique proved to be very efficient in Cry1Ab protein quantification on corn.

Key words: Cry1Ab protein, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, Transgenic corn.

INTRODUÇÃO

A tecnologia Bt expressa em híbridos de milho geneticamente modificados (OGM) com o gene da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que expressa a proteína Cry1Ab, tornou-os menos suscetíveis ao ataque de lepidópteros-pragas (AVISAR *et al.*, 2009), como a Lagarta-do-Cartucho (*Spodoptera frugiperda*), a Lagarta da Espiga (*Helicoverpa zea*) e a Broca do Colmo (*Diatraea saccharalis*), uma vez que a proteína Cry1Ab provoca uma intoxicação nas células epiteliais do intestino médio nos instares larvares dessas pragas.

A competitividade proporcionada pela engenharia genética ao agronegócio brasileiro fez com que as plantas transgênicas ocupassem uma significativa parte das áreas agrícolas num curto espaço de tempo. Tendo em vista o rápido avanço na utilização de híbridos de milho modificados após a sua liberação comercial, existe necessidade de monitoramento cons-

tante da presença de insetos nessa cultura e da efetiva produção da proteína tóxica pelas plantas. Dessa forma, o conhecimento da concentração da proteína Cry1Ab produzida pelas diferentes partes da planta verifica-se indispensável para monitorar a exposição ambiental e quantidade da toxina ingerida pelos insetos que consomem diferentes tecidos das plantas de milho.

Vários fatores podem influir na concentração da proteína Cry1Ab nos tecidos vegetais, alterando a produção da proteína Cry1Ab pela planta e consequentemente, a sua disponibilidade para os insetos e ambiente. Com efeito, o estágio fisiológico da planta, as condições climáticas, as estações do ano, as interações entre genótipo e ambiente (NGUYEN e JELH, 2007), a adubação nitrogenada (BRUNS e ABEL, 2003), a qualidade do solo e a aplicação de pesticidas (GRIFFITHS *et al.*, 2006) são fatores que podem alterar a produção da proteína Cry1Ab pela planta.

Os resultados relativos à concentração da toxina Bt são controversos, pois NGUYEN e JELH (2007), além de encontrarem alta variação nas concentrações de toxina Bt entre plantas e em diferentes regiões, apresentaram valores diferentes dos relatados por MENDELSONH *et al.* (2003). De acordo com NGUYEN e JELH (2007) há uma ausência quase completa de informações sobre a expressão da proteína Cry1Ab nos eventos MON 810®, em diferentes estádios de crescimento da planta. Contudo, as análises comumente realizadas informam somente se a proteína existe ou não nas plantas OGM da amostra, não havendo no momento um protocolo padrão para a determinação da concentração da proteína Cry1Ab.

Algumas técnicas de análise têm sido desenvolvidas e/ou ajustadas para quantificar e qualificar a detecção da proteína Cry1Ab tais como: imunoenensaio em microsfera (ERMOLLI *et al.*, 2006), sensor eletroquímico imunomagnético (VOLPE *et al.* 2006), Bradford, SDS-PAGE/densitometry (CRESPO *et al.*, 2008), PCR em tempo real e o teste ELISA. O método de PCR em tempo real é mais preciso que o teste ELISA, contudo, não pode ser utilizado para mensurar a concentração de proteína no ambiente uma vez que a análise quantifica o gene e não a proteína. Além disso, de acordo com ERMOLLI *et al.* (2006) embora a quantificação de OGM pela técnica PCR em tempo real possa ser utilizada, trata-se de uma técnica mais sofisticada e dispendiosa, que requer laboratórios equipados e operadores treinados.

Por outro lado, as metodologias utilizadas para realização do teste ELISA nos trabalhos de GROTHAUS *et al.* (2006), ERMOLLI *et al.* (2006), PALM *et al.* (1994), CHEN *et al.* (2009), OBRIST *et al.* (2006) e SZÉKÁS *et al.* (2010) não são exatamente idênticas, dificultando a replicação do método. No momento não há um protocolo padrão para análise de concentração da proteína Bt e em poucos trabalhos publicados, existe grande variação de resultados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a infestação natural e os danos provocados pelas lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) em híbridos de milho DKB390 e AG8088 contendo o gene cry1Ab e nos seus respectivos pares convencionais, bem como a determinação da concentração de proteína Cry1Ab pelo teste ELISA, no colmo, folhas e grãos de cada um dos híbridos em teste.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio experimental foi realizado no Polo Regional Centro Leste da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, localizado no município de Ribeirão Preto, SP, na coordenada geográfica de 21°12'26" S e 47°51'48" N e com a altitude média de 646 m. A precipitação média anual do local é de 1427 mm, com temperaturas média máxima de 25°C e média mínima de 19,3°C, sendo o verão predominantemente quente e úmido e o inverno frio e seco.

A instalação do ensaio foi realizada no dia 11 de novembro de 2009 em latossolo vermelho distroférrico por semeadora mecânica regulada para depositar sete sementes/m e com espaçamento de 0,90 m entre as fileiras. A adubação de semeadura foi realizada com 250 kg ha⁻¹ da fórmula NPK 8-28-16 e a de cobertura com 300 kg ha⁻¹ da formulação NPK 20-2-20. Foi realizada uma única aplicação de deltametrina a 2,8%, aos 40 dias após a semeadura, nos talhões de milho convencional (NOGM), enquanto que nenhuma aplicação de inseticida foi realizada nos talhões de milho geneticamente modificado (OGM).

Os talhões experimentais foram constituídas de oito fileiras de 12 m, eliminando-se um metro em cada extremidade da parcela. As parcelas foram separadas pela distância de 4 metros e as plantas convencionais puderam receber pólen das plantas transgênicas. Foi utilizado um delineamento experimental em blocos ao acaso com um arranjo fatorial 2 x 2, com cinco repetições. Os fatores em teste foram a cultivar (AG8088 e DKB390) e a presença/ausência da proteína Cry1Ab.

Os híbridos de milho híbrido em estudo podem ser classificados quanto ao ciclo vegetativo como precoces. O híbrido DKB390 possui grão do tipo semiduro, enquanto que o híbrido AG8088 possui grão do tipo duro. A empresa produtora do híbrido DKB390 é o Dekalb e o AG8088 é produzido pela Agrocerec.

Foram realizadas avaliações da infestação e dos danos associados à presença da lagarta-do-cartucho nos dias 26 de novembro, três, 10, 17 e 23 de dezembro de 2009, correspondendo a 15, 22, 29, 36 e 42 dias após a instalação do ensaio e aos estádios fenológicos entre V3 e V8. Em cada avaliação foram colhidas cinco plantas por parcela totalizando 25 plantas por tratamento e observada a quantidade e o tamanho das

lagartas. Para a avaliação dos danos foi utilizada uma escala com cinco níveis, de acordo com CARVALHO (1970), onde: 0 - plantas sem folhas danificadas; 1 - plantas com raspadura nas folhas; 2 - plantas apresentando furos nas folhas; 3 - plantas apresentando dano nas folhas e alguma lesão no cartucho; 4 - plantas apresentando cartucho destruído; 5 - plantas mortas.

As avaliações do nível de infestação e respectivos danos provocados pela lagarta-da-espiga foram realizadas nos dias sete, 21 e 28 de janeiro e quatro de fevereiro de 2010, correspondendo a 57, 71, 78 e 85 dias após a instalação do ensaio e abrangendo os estádios fenológicos entre V12 e R4. A cada avaliação foram colhidas igualmente cinco plantas por parcela totalizando 25 plantas por tratamento. Para avaliação de danos foi utilizada a escala proposta por WIDSTROM (1967), com quatro níveis, onde 0 - não existe inseto na espiga; 1 - o inseto penetrou na espiga comendo o estilo-estigma sem atingir a ponta do sabugo; 2 - o inseto penetrou até o sabugo, não se aprofundando mais que 1 cm; 3 - o inseto penetrou até o sabugo, não se aprofundando mais que 2 cm; 4 - o inseto penetrou até o sabugo, não se aprofundando mais que 3 cm.

Na última avaliação da infestação pela lagarta-da-espiga, ocorrida no estádio fenológico R4, procedeu-se à amostragem de folhas, colmos e grãos de plantas de milho OGM dos dois híbridos, que foram imediatamente congelados. No dia seguinte as amostras foram encaminhadas para o Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP onde foram submetidas ao processo de secagem por liofilização. As amostras liofilizadas, depois de moídas, foram analisadas quanto à concentração da proteína Cry1Ab no Laboratório de Virologia do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, Portugal. O método utili-

zado para detecção da proteína Cry1Ab em sementes e folhas foi o teste ELISA através do kit AP-003-CRBS da Envirologix®. A enzima conjugada ao anticorpo foi a peroxidase. A leitura foi realizada por espectrofotômetro a 450 nm. Para o teste quantitativo, foi realizada uma curva de calibração diluindo-se a concentração de 50 g/kg de proteína Cry1Ab fornecida pela European Commission Joint Research Centre. A transformação da porcentagem de OGM para ng/g de proteína Cry1Ab foi realizada utilizando-se a equação obtida por VOLPE *et al.* (2006) ($y = 2,06x + 0,01$, $R^2 = 97$). Os valores de leitura em espectrofotômetro das folhas e colmos de milhos OGM foram subtraídos dos valores de leitura das amostras NOGM de colmo e folhas dos mesmos híbridos, utilizadas como controles negativos. No caso do grão, tendo sido constatada a presença da proteína Cry1Ab nos milhos NOGM, subtraiu-se do valor das leituras das amostras OGM, o valor da leitura do controle negativo (NOGM).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo módulo PROC GLM do SAS (1985) e a interação entre transgenia e híbridos foi desdobrada comparando-se a transgenia dentro de cada híbrido. Médias do nível de infestação, danos e concentração da proteína Cry1Ab foram comparadas pelos testes Kruskal-Wallis, Mann-Whitman U e Tukey, respectivamente, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O milho Bt expressando a toxina Cry1Ab foi plenamente eficiente contra *S. frugiperda*. Não se verificou uma interação significativa entre milhos NOGM e entre OGM quanto ao número ou tamanho das lagartas encontradas nas plantas e danos associados (Tabela 1), ou entre os danos avaliados a cada período de observação (Figura 1).

Tabela 1. Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* por planta e dano associado, em dois híbridos de milho, convencionais e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (cry1Ab) (Transgênico), contados aos dias 15, 22, 29, 36 e 42 após a semeadura

	Convencional				Transgênico				Convencional		Transgênico	
	DKB390		AG8088		DKB390		AG8088		Média	SE	Média	SE
Lag<15mm	0,67a	±0,08	0,60a	±0,07	0,23a	±0,05	0,11a	±0,03	0,64a	±0,05	0,17b	±0,03
Lag>15mm	0,18a	±0,04	0,19a	±0,04	0,02a	±0,01	0,04a	±0,02	0,18a	±0,03	0,03b	±0,01
Dano	2,46a	±0,07	2,53a	±0,08	1,60a	±0,07	1,47a	±0,06	2,50a	±0,05	1,54b	±0,04

Médias com letra diferente na linha são significativamente diferentes ($p < 0,005$; $*p < 0,0001$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis

SE = Erro padrão da média.

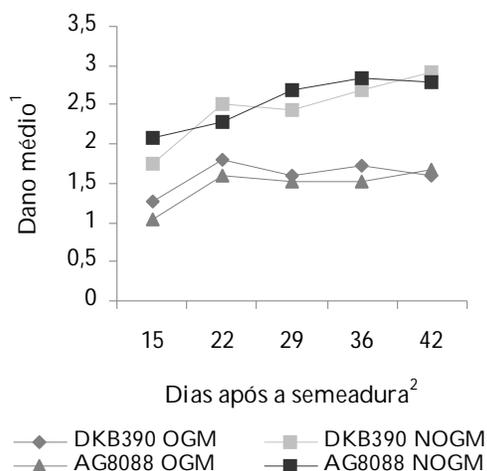


Figura 1. Danos associados a lagartas de *Spodoptera frugiperda* presentes em dois híbridos de milho (DKB390 e AG8088), convencionais (NOGM) e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) (OGM), aos dias 15, 22, 29, 36 e 42 após a semeadura.

Contudo, os híbridos OGM não foram plenamente eficientes na limitação de *H. zea*, tendo-se verificado uma interação significativa entre milhos OGM e entre NOGM. Efetivamente o híbrido AG8088 NOGM registrou menor número de lagartas menores que 15 mm que o híbrido DKB390 NOGM (Tabela 2). Não houve diferença significativa do número de lagartas menores que 15 mm entre milhos OGM e NOGM (Tabela 2). Todavia a proteína Cry1Ab foi eficaz na redução do número de lagartas maiores que 15 mm e dano associado na espiga dos milhos OGM (Tabela 2). Provavelmente, as lagartas menores que 15 mm sofrem apenas redução de biomassa e não no número de lagartas e, posteriormente, seriam intoxicadas de forma letal, ocasionado menor número de lagartas maiores que 15 mm. De acordo com MENDES *et al.* (2011), a proteína Cry1Ab causa baixa mortalidade nas lagartas, no entanto causa redução da biomassa das lagartas, o que pode ter contribuído com a ausência de diferenças significativas nos insetos menores que 15 mm.

Tabela 2. Número de lagartas de *Helicoverpa zea* por planta e dano associado, em dois híbridos de milho, convencionais e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) (Transgênico), contados nos dias 57, 71, 78 e 85 após a semeadura

	Convencional				Transgênico				Convencional		Transgênico	
	DKB390		AG8088		DKB390		AG8088		Média	SE	Média	SE
Lag<15mm	0,76a	±0,11	0,56b	0,56b	0,56b	±0,12	0,45a	±0,08	0,66a	±0,08	0,47a	±0,07
Lag>15mm	0,44a	±0,07	0,30a	0,30a	0,30a	±0,04	0,16a	±0,04	0,37a	±0,04	0,15b	±0,03
Dano	1,79a	±0,09	1,36b	1,36b	1,36b	±0,08	0,94a	±0,08	1,58a*	±0,07	0,83b*	±0,06

Médias com letras diferentes na linha são significativamente diferentes ($p < 0,005$; $*p < 0,0001$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis
SE = Erro padrão da média.

Para a *H. Zea*, a maior resistência natural existente nos milhos NOGM e menor controle da versão transgênica do híbrido AG8088 terão contribuído para reduzir a diferença entre as versões transgênica e convencional, enquanto a menor resistência natural do híbrido DKB390 NOGM resultou em diferenças significativas em todas as avaliações de danos entre os milhos OGM e NOGM deste híbrido (Tabela 2). Nas avaliações após 57 dias da semeadura os milhos OGM dos dois híbridos tiveram menores danos causados pela Lagarta-da-espiga, no entanto, nas avaliações aos 71, 78 e 85 dias de idade somente o híbrido

do DKB390 teve diferença significativa entre milhos OGM e NOGM (Figura 2). Relativamente o híbrido AG8088, com a percentagem de incidência da Lagarta-da-espiga de 56% em milhos NOGM e de 35% nos milhos OGM, a vantagem associada ao milho geneticamente modificada não é muito evidente quanto aos danos provocados pela Lagarta-da-espiga. Isso pode ter ocorrido em função da menor expressão da proteína Cry1Ab no grão. Além disso, em polinização aberta, a presença de pólen estranho no processo de fecundação dos milhos NOGM pode alterar as características genéticas do seu grão, proporcionando

mudanças qualitativas e quantitativas, de forma que, apesar da segregação dos alelos do gene *cry* fazer com que o grão não produza a proteína nas mesmas concentrações que a planta mãe, eventualmente, essa fecundação poderia implicar em menores diferenças entre OGM e NOGM. Contudo, se a polinização dos milhos NOGM pelo pólen dos híbridos OGM ocasionasse a ausência de diferenças significativas, essa ausência de efeito deveria ocorrer nos dois híbridos, o que não foi observado.

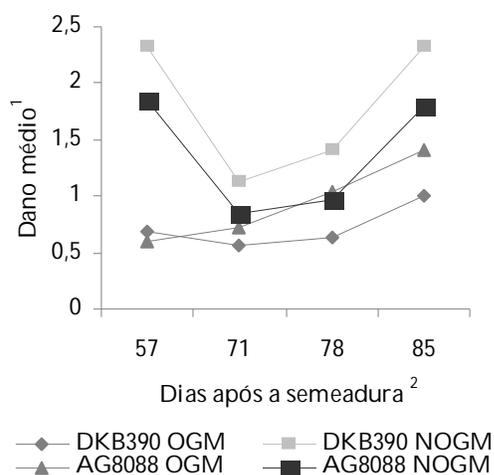


Figura 2. Danos associados a lagartas de *Helicoverpa zea* presentes em dois híbridos de milho (DKB390 e AG8088), convencionais (NOGM) e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) (OGM), aos dias 57, 71, 78 e 85 após a semeadura.

A eficiência da introdução do gene *cry1Ab* para reduzir a infestação e danos associados foi maior na

Lagarta-do-cartucho quando em comparação com os resultados obtidos para a Lagarta-da-espiga. A intoxicação provocada pela proteína *Cry1Ab* produzida pelo gene *cry1Ab* ocorre nas células epiteliais do intestino médio dos instares larvares das pragas e, portanto, a infestação inicial é necessária para que as lagartas consumam tecidos da planta transgênica para que venham a intoxicar-se posteriormente. O menor efeito da proteína *Cry1Ab* no controle da Lagarta-da-espiga quando comparado com o controle verificado da Lagarta-do-cartucho, foi coerente com a menor concentração da toxina *Cry1Ab* no grão em comparação com a sua concentração na folha (Tabela 3). Além disso, a ausência de efeito entre os híbridos OGM e NOGM do híbrido AG8088, foi coerente com a menor concentração da toxina *Cry1Ab* no grão dos milhos OGM AG8088 quando comparado os milhos OGM DKB390 (Tabela 3). Como a expressão do gene *cry1Ab* pode ser influenciada por vários fatores tais como o estágio fisiológico da planta e interações entre ambiente e genótipo, são espectáveis diferenças nas concentrações de toxina em diferentes híbridos.

Os valores das concentrações de proteína *Cry1Ab* nas folhas, no estágio fenológico R4, foram coerentes aos mencionados pela AGBIOS (2002) de 7,93 a 10,34 $\mu\text{g/g}$ de tecido fresco e aos encontrados por Székács *et al.* (2010), entre 4,82 e 10,05 $\mu\text{g/g}$ de tecido fresco (Tabela 3). Os valores de concentração da proteína *Cry1Ab* nos grãos são condizentes com os valores encontrados por SANDERS *et al.* (1998), nomeadamente entre 0,31 e 0,57 $\mu\text{g/g}$ de tecido fresco. Todavia, os valores de concentração da proteína *Cry1Ab* no colmo estiveram acima do limite superior de 2,61 $\mu\text{g/g}$ de tecido fresco em colmos encontrado por NGUYEN e JEHLE (2007) (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração de proteína *Cry1Ab* em folhas, colmos e grãos de milhos híbridos AG8088 e DKB390, no estágio fenológico R4

Folha ($\mu\text{g/g}$ de tecido fresco)					
	Média	SE	Mínimo	Máximo	Anova
AG8088	8,764a	0,254	8,34	9,16	p<0,0001
DKB390	7,361b	0,442	6,60	7,89	
Colmo ($\mu\text{g/g}$ de tecido fresco)					
	Média	SE	Mínimo	Máximo	Anova
AG8088	5,695	0,438	5,06	6,27	p=0,450
DKB390	5,558	0,301	5,16	6,12	
Grão ($\mu\text{g/g}$ de tecido fresco)					
	Média	SE	Mínimo	Máximo	Anova
AG8088	0,326b	0,068	0,23	0,42	p=0,039
DKB390	0,419a	0,103	0,31	0,59	

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey

SE = Erro padrão da média.

Considerando que atualmente não existe um protocolo padrão para análise da concentração da proteína Bt e que esse fato dificulta a replicação e comparação de resultados, a coerência dos resultados e eficiência do método ELISA, utilizado para quantificar a toxina Cry1Ab neste trabalho, demonstram inequivocamente que o mesmo protocolo pode ser adotado em outras pesquisas.

CONCLUSÃO

Os híbridos de milho Bt expressando a proteína Cry1Ab foram eficientes na limitação da praga *S. frugiperda*. No entanto, relativamente a *H. zea*, a eficiência é reduzida em função da menor expressão do gene *cry1Ab* nos grãos dos milhos geneticamente modificados testados. As concentrações da proteína Cry1Ab na folha e grão foram coerentes com os danos provocados pelas duas pragas em avaliação indicando a eficiência do método utilizado para quantificar a proteína Cry1Ab em milhos geneticamente modificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBIOS (2002) MON 810 Safety assessment of YieldGard insect-protected event MON810. Published by agbios.com as Product Safety Description <http://agbios.com/docroot/decdocs/02-269-010.pdf>
- BRUNS H.A.; ABEL, C.A. Nitrogen fertility effects on Bt delta-endotoxin and nitrogen concentrations of maize during early growth. **Agronomy Journal**, v. 95, p.207-211, 2003.
- CARVALHO, R. P. L. (1970). **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) e suscetibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo**. Tese de Doutorado, ESALQ/USP Piracicaba, SP.
- CHEN, M.; YE, G.; LIU, Z.; FANG, Q.; HU, C.; PENG, Y.; SHELTON, A.M. Analysis of Cry1Ab toxin bioaccumulation in a food chain of Bt rice, an herbivore and a predator. **Ecotoxicology** v.18, p.230-238, 2009.
- CRESPO, A. L. B.; SPENCER, T. A.; NEKL, E.; PUSZTAI-CAREY, M.; MOAR, W. J.; BLAIR, D. S. Comparison and Validation of Methods To Quantify Cry1Ab Toxin. *Bacillus thuringiensis* for Standardization of Insect Bioassays: **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.130-135, 2008.
- ERMOLLI, M.; FANTOZZI, A.; MARINI, M.; SCOTTI, D.; BALLA, B.; HOFFMANN, S.; QUERCI, M.; PAOLETTI, C.; VAN DEN EEDE, G. Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins. **Accreditation and Quality Assurance**, v.11, p.55-57, 2006.
- GRIFFITHS, B. S., CAUL, S., THOMPSON, J., BIRCH, A. N., SCRIMGEOUR, C., CORTET, J., FOGGO, A., HACKET, C. A., KROGH, P. H. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. **Journal of Environmental Quality**, v.35, p.734-741, 2006.
- GROTHAUS, G.D.; BANDLA, M.; CURRIER, T.; GIROUX, R.; JENKINS, G.R.; LIPP, M.; SHAN, G.; STAVE, J.W.; PANTELLA, V. Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.89, p.913-928, 2006.
- MENDELSON, M.; KOUGH, J.; VAITUZIS, Z.; MATTEWS, K. Are Bt crops safe? **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 1003-1009, 2003.
- MENDES, S.M.; BOREGAS, K.G.B.; LOPES, M.; WAQUIL, M.S.; WAQUIL, J.M. Respostas da lagarta-do-cartucho ao milho geneticamente modificado, expressando a toxina Cry1Ab(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p.239-244, 2011.
- NGUYEN, T.H.; JEHLE, J.A. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON 810. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.114, p.82-87, 2007.
- OBRIST, L. B.; DUTTON, A.; ALBAJES, R.; BIGLER, F. Exposure of arthropod predators to Cry1Ab toxin in Bt maize fields. **Ecological Entomology**, v.31, p.143-154, 2006.
- PALM, C.J.; DONEGAN, K.; HARRIS, D.; SEIDLER, R.J. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. **Molecular Ecology**, v.3, p.145-151, 1994.
- SANDERS, P. R.; LEE, T.C.; GROTH, M.E.; ASTWOOD, J.D.; FUCHS, R.L. Safety assessment of insect-protected corn. In: THOMAS, J. A. **Biotechnology and Safety Assessment**. 2 ed. Taylor and Francis, 1998. p. 241-256.
- SAS Institute Inc. **SAS User's guide: statistics**. Ver. 5 ed., SAS Inst., Cary, NC, 1985.
- SZÉKÁCS, A.; LAUBER, E.; TAKACS, E.; DARVAS, B. Detection of Cry1Ab toxin in the lives of MON 810

transgenic maize. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, v.396, p.2203-2211, 2010.

VOLPE, G.; AMMID, N.H.; MOSCONE, D.; OCCHIGROSSI, L.; PALLESCHI, G. Development of an immunomagnetic electrochemical sensor for detection

of BT-CRY1AB/CRY1AC proteins in genetically modified corn samples. **Analytical Letters**, v.39, p.1599-1609, 2006.

WIDSTROM, N. W. An evaluation of methods for measuring corn earworm injury. **Journal of Economic Entomology**, v.60, p.791-794, 1967.