

ISBN 978-85-63633-09-5



Anais do
IV SIMPÓSIO:
PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS



Clóves Cabreira Jobim
Ulysses Cecato
Marcos Weber do Canto
Organizadores

Copyright © 2011 para os autores

Todos os direitos reservados. Proibida a reprodução, mesmo parcial, por qualquer processo mecânico, eletrônico, reprográfico etc., sem a autorização, por escrito, dos autores.

Todos os direitos reservados desta edição 2011 para Shampna Gráfica e Editora

O conteúdo dos capítulos, assim como as tabelas, figuras e fotos são de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

Revisão textual e gramatical: Responsabilidade dos respectivos autores.

Normalização textual e de referências: Responsabilidade dos respectivos autores.

Projeto gráfico/diagramação: Marcia Lang

Imagens/fotografias: fornecidas pelos autores

Capa - arte final: Marcia Lang

Fonte: Gaudy Old Style

Tiragem - versão impressa: 400 Exemplares

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR., Brasil)

Simposio : Produção e Utilização de Forragens
Conservadas (4. : 2011 : Maringá, PR)
S612 Anais do IV Simpósio Sobre Produção e Utilização
de Forragens Conservadas / organizadores Clóves
Cabrera Jobim, Ulysses Cecato, Marcos Weber do
Canto. -- Maringá, PR : UEM/CCA/DZO, 2011.
292 p.

ISBN 978-85-63633-09-5

1. Forragens conservadas - Produção e utilização.
 2. Silagem - Custo benefício.
 3. Sistema de produção - Carne e leite.
 4. Gramíneas e cereais - Silagem.
 5. Riscos ambientais e aspectos bioeconômicos - Conservação de forragem.
 6. Microbiologia - Silagem.
- I. Jobim, Clóves Cabrera. II. Cecato, Ulysses. III. Canto, Marcos Weber do. IV. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. V. Título.

CDD 21. ed. 636.086

PROMOÇÃO

Departamento de Zootecnia - UEM

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM - PPZ

CESF - Grupo de Estudos em Silagem e Feno (UEM 0102)

Apoio

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES - Coordenação de Pessoal de Nível Superior

FA - Fundação Araucária

STHHA
PPA

Gráfica e Editora

Av. São Domingos, 1269 - Maringá-Paraná - Fone/Fax: (44) 3302 4411 - E-mail: grafica@shampna.com.br

SUMÁRIO

PREFÁCIO	7
SILAGEM DE CAPIM EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE CARNE OU LEITE: RELAÇÕES CUSTO X BENEFÍCIO.	
Ricardo Andrade Reis, Rogério Marchiori Conn, Bruno Ramalho Vieira	9
PERSPECTIVAS PARA USO DE SILAGEM DE CEREAIS DE INVERNO NO BRASIL	
Valter Harry Bumbiers Junior, Marcos Roberto Oliveira, Clóves Cabrera Jobim, Marco Aurélio Alves de Freitas Barbosa, Letícia Maria de Castro, Rondineli Pavezzi Barbero	39
USO DE FORRAGENS CONSERVADAS EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE CARNE: ASPECTOS BIOECONÔMICOS.	
Odilon Gomes Pereira, André Soares de Oliveira, Karina Guimarães Ribeiro	73
APLICAÇÃO DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS NA ENSILAGEM DO MILHO VISANDO MAIOR DESEMPENHO ANIMAL	
Mikael Neumann, Marcos Rogério de Oliveira, Paula Maria Zanetti, Robson Kyoshi Ueno, Fabiano Marafon, Michel Pereira de Souza	95
RELAÇÃO CUSTO BENEFÍCIO NA PRODUÇÃO DE SILAGEM COM MILHO Bt	
Geraldo Balduino Neto, Roberto Borelho Ferraz Branco, Terezinha Monetto dos Santos Cividanes, José Ramos Nogueira, Marta do Rosário Fernandes Felix, Luiz Carlos Roma Junior, Mauro Sartori Bueno, Evaldo Ferrari Junior, Rossana Possenti, Fernando Manuel de Campos Trindade Rei	131
FLUXO DE NUTRIENTES EM ECOSISTEMAS DA PRODUÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS	
Thomas Newton Martin, Paulo Sérgio Pavanaro, Marcia Rodrigues da Silva, Sidney Ortiz, Patricia Bertonceli	173
FUNGOS E MICOTOXINAS EM SILAGENS.	
Rafael Camargo do Amaral, Luiz Gustavo Nussio	221

Relação custo benefício na produção de silagem com milho *Bt*¹

Geraldo Balieiro Neto², Roberto Botelho Ferraz Branco², Terezinha Monteiro dos Santos Cividanes², José Ramos Nogueira², Maria do Rosário Fernandes Felix³, Luiz Carlos Roma Junior², Mauro Sartori Bueno², Evaldo Ferrari Junior², Rosana Possenti², Fernando Manuel de Campos Trindade Rei³

¹Financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

²Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo - APTA/SAA. e-mail: geraldobalieiro@apta.sp.gov.br;

³Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal.

Introdução

Eficiência e escala de produção são imprescindíveis para obtenção de retornos financeiros compensatórios na atividade pecuária. O aumento da produtividade demanda maior produção de energia digestível por área, a fim de suprir plenamente as exigências nutricionais dos animais ao longo do ano de forma menos dispendiosa.

O custo com alimentação dos animais se eleva no período seco do ano devido à redução no crescimento das plantas forrageiras. Segundo Magalhães *et al.* (2004) as despesas com alimentação atingem 64,9% da receita obtida com a venda do leite e no período seco a silagem e os grãos de milho (*Zea mays*), compõem a maior parte da ração animal. O milho representa a principal cultura armazenada em forma de silagem para utilização ao longo do período de estiagem, devido à possibilidade de boas produções com alto valor nutritivo.

O armazenamento de forragem na forma de silagem para alimentação dos animais no período da seca é um processo de custo elevado, cujo benefício relaciona-se diretamente com o volume e qualidade da massa produzida. As silagens de milho no Brasil possuem média qualidade e rendimento abaixo do potencial da planta no que diz respeito à produção de energia digestível por área. O alto custo da produção de silagem, muitas vezes decorre da baixa produtividade das culturas. Fatores como adubação e correção da acidez do solo, controle de invasoras e pragas, escolha da época certa para o corte, tamanho adequado de partículas, tempo de fechamento do silo, densidade alcançada com a compactação e vedação, tipo de silo e lona utilizada na vedação, controle de contaminação e manejo após abertura quando não executados corretamente, podem acarretar sérias perdas econômicas na produção de bovinos.

A utilização de cultivares modernos, mais produtivos, adaptados às condições locais e resistentes a pragas pode representar ganhos efetivos em produtividade desde que não ocorram fatores limitantes a manifestação do potencial produtivo dessas culturas.

A lagarta-do-cartucho, uma das principais pragas do milho no Brasil, distribui-se em todas as regiões de cultivo e pode reduzir a produção em até 38,7% (Williams & Davis 1990). O controle é convencionalmente realizado por produtos químicos e biológicos e sua necessidade condiciona-se ao nível de infestação.

No ano de 2007 a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança liberou a comercialização de híbridos geneticamente modificados resistentes a pragas. A tecnologia desenvolvida em híbridos de milho contendo o gene da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que expressa a proteína Cry1Ab, tornou os híbridos resistentes ao ataque da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e broca do colmo (*Diatraea saccharalis*) (Avisar *et al.*, 2009), reduzindo o controle químico e os custos com a aplicação de defensivos.

Vários trabalhos comparando híbridos de milho transgênicos com suas contrapartes convencionais, demonstraram equivalência da composição química da silagem e produção e composição do leite (Faust & Miller, 1997; Folmer et al., 2002; Donkin et al., 2003; Calsamiglia et al., 2007; Faust et al., 2007). De acordo com Wiedemann et al. (2006) é improvável que uma proteína Cry1Ab inteira e funcional seja encontrada no rúmen após 8 horas de incubação. Segundo Singhal et al. (2006) não foi possível detectar a proteína codificada pelos genes *cry1Ac* e *cry2Ab* no sangue ou no leite dos animais alimentados. Dessa forma, os alimentos derivados de animais recebendo forrageiras modificadas geneticamente são considerados tão seguros quanto àqueles derivados de animais alimentados com forragem convencional, (Flachowsky et al., 2005; Phipps et al., 2006).

O foco deste trabalho foi avaliar os benefícios econômicos do cultivo de híbridos de milho transgênicos destinados à confecção de silagem para alimentação animal utilizando como parâmetros a produção e qualidade da forragem. Para tanto foram observadas a produção agrônômica, características morfológicas, perdas fermentativas, perdas aeróbias, composição química, digestibilidade *in vivo*, desempenho animal e os custos, das sementes e com aplicação de inseticidas.

A decisão de qual híbrido ensilar é de grande importância no planejamento da atividade pecuária bovina e demanda avaliação técnica e econômica. O texto que segue tem como base os resultados de uma série de ensaios comparando a utilização dos híbridos de milho DKB 390 da Dekalb e AG 8088 da Agrocereos contendo o gene *cry1Ab* com suas respectivas contrapartes convencionais sem o gene *Bt* (isogênicos próximos). As pesquisas foram conduzidas no Pólo Centro Leste da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo - APTA/SAA e tiveram auxílio financeiro da FAPESP e CNPq.

Infestação por pragas e concentração da proteína Cry1Ab

O resultado da comparação entre híbridos transgênicos e suas contrapartes convencionais ou isogênicos próximos, está diretamente relacionado ao nível de infestação por pragas e a resistência natural do híbrido convencional de origem. Neste trabalho a lavoura foi submetida a cinco avaliações de infestação pela lagarta-do-cartucho e quatro avaliações de infestação pela lagarta-da-espiga, ambas em intervalos de 15 dias e em 25 plantas por tratamento.

A cada avaliação foram observadas a quantidade e o tamanho das lagartas e utilizada uma escala com notas de 0 a 5 para avaliação de danos, de acordo com Carvalho (1970), para avaliação da lagarta-do-cartucho, 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. Para avaliação da lagarta-da-espiga foi utilizada a escala proposta por Widstrom (1967), com notas de 0 a 4, 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.

Em média as incidências das lagartas-do-cartucho e das lagartas-da-espiga foram de 56% nos híbridos convencionais com uma aplicação de deltametrina a 2,8%, aos 40 dias após o plantio, e as incidências das mesmas nos híbridos transgênicos, sem aplicação de inseticida, foram de 16,4% e 35%, respectivamente.

O efeito da introdução do gene *Bt* sobre a redução da infestação por pragas menores que 15 mm foi mais expressivo no controle da lagarta-do-cartucho ($p < 0,001$) quando comparado ao controle da lagarta-da-espiga ($p = 0,054$) e houve redução de danos nas plantas provocados por ambas as lagartas ($p < 0,001$) (Tabelas 1 e 2) (Balieiro et al. 2010d).

A intoxicação provocada pela proteína Cry1Ab produzida pelo gene *Bt* ocorre nas células epiteliais do sistema digestivo das pragas e, portanto, a infestação inicial é necessária para que as lagartas consumam tecidos da planta transgênica e venham a se intoxicar. O fato da lagarta da espiga ter maior sobrevivência após a ingestão de tecidos da planta é coerente com a menor concentração da toxina *Bt* no grão quando comparada com a concentração da toxina *Bt* na folha (10 ug/g versus 0,5 ug/g de proteína Cry1Ab) (Tabela 3).

A infestação de lagarta-do-cartucho menor que 15 mm no híbrido DKB 390 transgênico foi superior ao híbrido AG 8088 transgênico, aos 29 dias (0,36 vs 0,08) e aos 36 dias (0,28 vs 0,08) após o plantio, demonstrando que o híbrido AG 8088 foi mais responsivo à introdução do gene *Bt* que o DKB 390. Este resultado é coerente com a menor concentração de toxina *Bt* na folha do híbrido DKB 390 relativamente à concentração de toxina *Bt* na folha do híbrido AG 8088 (Tabela 3).

Tabela 1 Danos causados pela *Spodoptera frugiperda* em híbridos de milho contendo o gene *Bt* e em suas contrapartes sem o gene *Bt* com base na escala de danos de 0 a 5

Dias após o plantio	Híbridos convencionais				Híbridos transgênicos				
	Híbrido	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
15	DKB	1,76 ^a	±0,14			1,28 ^{b*}	±0,20		
	AG	2,08 ^a	±0,27			1,04 ^{b*}	±0,11		
	DKB x AG	1,76 ^a	±0,14	2,08 ^a	±0,27	1,28 ^a	±0,20	1,04 ^a	±0,11
22	DKB	2,52 ^a	±0,12			1,80 ^{b*}	±0,15		
	AG	2,28 ^a	±0,12			1,60 ^{b**}	±0,11		
	DKB x AG	2,52 ^a	±0,12	2,28 ^a	±0,12	1,80 ^a	±0,15	1,60 ^a	±0,11
29	DKB	2,44 ^a	±0,15			1,60 ^{b**}	±0,20		
	AG	2,68 ^a	±0,15			1,52 ^{b**}	±0,12		
	DKB x AG	2,44 ^a	±0,15	2,68 ^a	±0,15	1,60 ^a	±0,20	1,52 ^a	±0,12
36	DKB	2,68 ^a	±0,13			1,72 ^{b**}	±0,11		
	AG	2,84 ^a	±0,09			1,52 ^{b**}	±0,10		
	DKB x AG	2,68 ^a	±0,13	2,84 ^a	±0,09	1,72 ^a	±0,11	1,52 ^a	±0,10
42	DKB	2,92 ^a	±0,13			1,60 ^{b**}	±0,10		
	AG	2,80 ^a	±0,13			1,68 ^{b**}	±0,14		
	DKB x AG	2,92 ^a	±0,13	2,80 ^a	±0,13	1,60 ^a	±0,10	1,68 ^a	±0,14

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Mann-Whitman U; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Tabela 2 Danos causados pela *Helicoverpa zea* em híbridos de milho contendo o gene *Bt* e em suas contrapartes sem o gene *Bt* com base na escala de notas de 0 a 4.

Dias após o plantio	Híbridos convencionais				Híbridos transgênicos				
	Híbrido	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
57	DKB	2,32 ^a	±0,16			0,68 ^{b**}	±0,17		
	AG	1,84 ^a	±0,15			0,60 ^{b**}	±0,17		
	DKB x AG	2,32 ^a	±0,16	1,84 ^{b*}	±0,15	0,68 ^a	±0,17	0,60 ^a	±0,17
71	DKB	1,12 ^a	±0,13			0,56 ^{b*}	±0,10		
	AG	0,84 ^a	±0,14			0,72 ^a	±0,11		

	DKB x AG	1,12 ^a	±0,13	0,84 ^a	±0,14	0,56 ^a	±0,10	0,72 ^a	±0,11
78	DKB	1,40 ^a	±0,19			0,64 ^{b*}	±0,16		
	AG	0,96 ^a	±0,20			1,04 ^a	±0,17		
	DKB x AG	1,40 ^a	±0,19	0,96 ^a	±0,20	0,64 ^a	±0,16	1,04 ^a	±0,17
85	DKB	2,32 ^a	±0,17			1,00 ^{b***}	±0,19		
	AG	1,80 ^a	±0,16			1,40 ^a	±0,18		
	DKB x AG	2,32 ^a	±0,17	1,80 ^{b*}	±0,16	1,00 ^a	±0,19	1,40 ^a	±0,18

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Mann-Whitman U; *p<0,05;

***p<0,001

Amostras da planta inteira coletadas no momento da ensilagem foram separadas em folha, colmo e grãos e imediatamente congeladas. No dia seguinte cada uma das partes foi encaminhada ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP e submetidas ao processo de secagem por liofilização. As amostras liofilizadas foram moídas e analisadas quanto à concentração da proteína Cry1Ab no Laboratório de Virologia do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, Portugal. O método utilizado para detecção da proteína Cry1Ab em sementes e folhas foi o teste ELISA através do kit AP-003-CRBS da Enviroligix. A enzima conjugada ao anticorpo foi a peroxidase resultando em uma cor azul que se transforma em alaranjado, após adição da solução de paragem, lida a um comprimento de onda de 450 nm. Para o teste quantitativo, foi obtida uma curva de calibração diluindo-se a concentração de 50 g/kg de proteína Cry1Ab fornecido pela European Commission Joint Research Centre. Para transformar a porcentagem de OGM para ng/g de proteína Cry1Ab foi utilizada a equação obtida por Volpe et al. (2006) ($y = 2,06 x + 0,01$, $R^2 = 97$). Os valores de leitura em espectrofotômetro das folhas e colmos foram subtraídos dos valores de leitura das amostras não transgênicas de colmo e folhas de seus respectivos híbridos, utilizados como controles negativos. No caso do grão, como foi constatada a presença da proteína Cry1Ab nos híbridos convencionais descontou-se o valor de leitura do controle negativo.

Os valores das concentrações de proteína Cry1Ab nas folhas foram coerentes aos mencionados pela AGBIOS (2002) de 7,93 a 10,34 ug/g de tecido fresco e aos encontrados por Székács et al. (2010) de 4,82 a 10,05 ug/g de tecido fresco (Tabela 3). Os valores de concentração da proteína Cry1Ab nos grãos são condizentes aos valores encontrados por Sanders et al. (1998), entre 0,31 e 0,57 ug/g de tecido fresco. Os valores de concentração da proteína Cry1Ab no colmo estiveram acima do limite superior da amplitude encontrada por Nguyen & Jehle (2007) em colmos de 2,61 ug/g de tecido fresco (Tabela 3). Os híbridos de milho contendo o gene *cry1Ab* produzem as toxinas *Bt* em tecidos e em tempos de maneira específica (Abel & Adamczyk, 2004). De acordo com Nguyen & Jelh (2007) há ausência quase completa de informações da expressão da proteína Cry1Ab nos híbridos transgênicos contendo o gene *cry1Ab* em diferentes estádios de crescimento. O fenômeno de variação de produção da toxina *Bt* pelas plantas ainda não foi completamente esclarecido e o nível de exposição no campo permanece desconhecido.

Tabela 3 Concentração de proteína Cry1Ab em diferentes partes dos híbridos de milho AG 8088 e DKB 390 amostrados aos 85 dias após o plantio

		Folha (ug/g de tecido fresco)				
	Média	Std Desvio	Std Error	Mínimo	Máximo	Anova
AG 8088	8,764^a	0,254	0,084	8,34	9,16	

DKB 390	7,361 ^b	0,442	0,147	6,60	7,89	p<0,0001
Colmo (ug/g de tecido fresco)						
	Média	Std Desvio	Std Error	Mínimo	Máximo	Anova
AG 8088	5,695 ^a	0,438	0,146	5,06	6,27	
DKB 390	5,558 ^a	0,301	0,100	5,16	6,12	p=0,450
Grão (ug/g de tecido fresco)						
	Média	Std Desvio	Std Error	Mínimo	Máximo	Anova
AG 8088	0,326 ^b	0,068	0,022	0,23	0,42	
DKB 390	0,419 ^a	0,103	0,034	0,31	0,59	P=0,039

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocerec

Std Desvio = desvio padrão; Std Error = erro padrão da média

Características Morfológicas, Estruturais e Produção de Matéria Seca

O corte das lavouras foi realizado no momento em que os grãos encontravam-se no estágio de 1/3 a 2/3 da linha do leite. Os tratamentos foram colhidos com a mesma idade cronológica e após a colheita a planta foi separada em colmo, espiga, folha, material morto e pendão.

A variação das condições climáticas entre os anos de estudo associada às características dos híbridos como a velocidade de crescimento, ciclo vegetativo, exigência em nutrientes, resistência ao déficit hídrico e a pragas, promoveram diferentes produções agrônômicas entre o primeiro e segundo ano do trabalho.

No primeiro ano de pesquisa a produção de matéria seca dos híbridos transgênicos foi equivalente à suas respectivas contrapartes convencionais (Balieiro et al., 2010d) (Tabela 4). No segundo ano houve maior produção dos híbridos transgênicos (Tabelas 5). A altura da planta e da espiga no primeiro ano e altura da espiga no segundo ano foram superiores nos híbridos contendo o gene *cry1Ab* quando comparados com suas respectivas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* (Tabelas 4 e 5). Os híbridos contendo o gene *cry1Ab* tiveram maior quantidade e percentual de material morto quando comparados as suas respectivas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* (Tabelas 4 e 5). No segundo ano, as produções de colmo, folha, material morto e pendão dos híbridos contendo o gene *cry1Ab* foram superiores às suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*, sem efeito quanto à produção de espigas, verificando-se menor relação espiga:colmo comparativamente às contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* (Tabela 5).

O aumento na produção de matéria seca no segundo ano pode ser atribuído ao alongamento do colmo ou devido ao avanço na maturidade da planta. Como o ponto de colheita para ensilagem ocorre antes do momento de máxima produção de matéria seca, com a antecipação no enchimento dos grãos, os híbridos transgênicos podem ter acumulado mais matéria seca.

Tabela 4 Características morfológicas, estruturais e produtivas dos híbridos de milho DKB 390 e AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* versus suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*, primeiro ano.

	<u>Efeito Principal</u>		<u>Interações</u>				CV	<u>Probabilidade</u>	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	<u>DKB 390</u>		<u>AG 8088</u>			<i>Bt</i>	Interação
			não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>			
n de Plantas/ha	59443	60332	57332	59110	61554	61554	4,45	NS	NS
Planta (t ms/ha)	12,27	13,26	11,23	12,75	13,32	13,77	12,47	NS	NS
Colmo (t ms/ha)	3,577 ^b	3,979 ^a	3,330	3,838	3,825	4,120	12,79	--	NS
Espiga (t ms/ha)	6,032	6,576	5,357	6,535	6,706	6,618	17,69	NS	NS
Folha (t ms/ha)	2,277	2,227	2,254	2,081	2,300	2,374	22,22	NS	NS

Morto (t ms/ha)	0,141^b	0,244^a	0,076	0,131	0,207	0,356	48,30	*	NS
Pendão(t ms/ha)	0,202^b	0,239^a	0,121	0,170	0,283	0,307	17,38	--	NS
Colmo (%)	29,24	30,05	29,77	30,20	28,71	29,91	4,52	NS	NS
Espiga (%)	49,22	49,63	48,11	51,30	50,34	47,97	12,04	NS	NS
Folha (%)	18,60	16,87	19,95	16,36	17,26	17,37	22,87	NS	NS
M. morto (%)	1,14^b	1,79^a	0,73	1,07	1,56	2,51	40,99	*	NS
Pendão (%)	1,61	1,80	1,10	1,36	2,12	2,25	17,95	NS	NS
h Planta (m)	1,89^b	2,03^a	1,74	1,91	2,05	2,16	4,34	**	NS
H Espiga (m)	0,93^b	1,05^a	0,94	1,11	0,91	1,00	7,27	**	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Manejo da lavoura: Adubação de 250 kg de 24-28-20 para todos os tratamentos e uma aplicação de deltametrina aos 40 dias após o plantio somente na lavoura convencional.

Tabela 5 Características morfológicas, estruturais e produtivas dos híbridos de milho DKB 390 e AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* versus suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*, segundo ano.

	<u>Efeito Principal</u>		<u>Interações</u>				CV	<u>Probabilidade</u>	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	<u>DKB 390</u>		<u>AG 8088</u>			<i>Bt</i>	Interação
			não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>			
n de Plantas/ha	5,477^b	6,707^a	57332	70443	52221	63703	8,88	NS	NS
Planta (t ms/ha)	15,90^a	18,072^b	16,307	19,195	15,500	16,950	10,64	--	NS
Colmo (t ms/ha)	4,249^b	5,267^a	4,581	5,892	3,918	4,643	14,18	--	NS
Espiga (t ms/ha)	7,049	7,743	7,339	8,516	6,759	6,969	10,84	NS	NS
Folha (t ms/ha)	2,088^b	2,517^a	2,138	2,552	2,039	2,482	14,45	NS	NS
Morto (t ms/ha)	0,424^b	0,650^a	0,381	0,590	0,467	0,710	34,72	*	NS
Pendão(t ms/ha)	0,186^b	0,257^a	0,187	0,233	0,184	0,280	18,51	--	NS
Colmo (%)	30,57 ^a	29,90 ^a	31,33	33,10	29,81	26,71	11,14	NS	NS
Espiga (%)	50,49^a	39,41^a	50,03	47,64	50,94	31,19	22,83	NS	NS
Folha (%)	15,02 ^a	13,33 ^a	14,67	14,39	15,38	12,27	25,75	NS	NS
M. morto (%)	2,63 ^a	3,46 ^a	2,67	3,53	2,59	3,40	32,88	*	NS
Pendão (%)	1,27 ^b	1,66 ^a	1,30	1,32	1,25	2,00	13,86	NS	NS
h Planta (m)	1,98 ^a	1,91 ^a	1,99	2,08	1,97	1,73	12,55	**	NS
H Espiga (m)	1,12^b	1,53^a	1,18	1,30	1,05	1,76	21,46	**	NS
Espiga:colmo	1,67^a	1,46^b	1,60	1,43	1,74	1,48	7,59	**	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Manejo da lavoura: Adubação de 250 kg de 24-28-20 para todos os tratamentos e uma aplicação de deltametrina aos 40 dias após o plantio somente na lavoura convencional.

Em suma, comparando-se plantas com a mesma idade, os menores danos por pragas nos híbridos contendo o gene *cry1Ab*, colhidos para ensilagem com 30% de matéria seca, resultaram em alongamento do colmo, maior altura da planta e da espiga, maior quantidade de material morto e colmo e menor percentual de espigas na massa.

A colheita para ensilagem ocorre na fase reprodutiva da planta, momento em que o acúmulo de matéria seca deve-se ao crescimento da espiga, principalmente da fração de grãos, em detrimento da parte vegetativa. Um trabalho clássico de Giardini et al. (1976) demonstrou que no estágio “leitoso”, os grãos representaram de 15 a 16% do peso seco total, no estágio “farináceo” cerca de 40% e na maturação fisiológica próximo a 50%. Nesta fase a planta se encontra em transformação tanto em quantidade como em qualidade, os carboidratos solúveis do colmo são transportados para espiga ocorrendo o

enchimento dos grãos com acúmulo de matéria seca no peso seco total, promovendo rápida modificação dos componentes da planta.

Na ensilagem com híbridos contendo o gene *cry1Ab*, colhidos com 30% de matéria seca, com a mesma idade de seus isogênicos próximos, ocorrem dois efeitos aparentemente antagônicos quanto à qualidade nutritiva da planta e que podem resultar em maiores produções de matéria seca: a antecipação do enchimento dos grãos e maior participação do colmo na planta inteira devido ao seu alongamento durante a fase vegetativa. Com o avanço do estágio de maturação, o conteúdo celular da planta total aumenta devido à crescente participação de grãos ricos em amido, ocorrendo simultaneamente aumento dos carboidratos estruturais na fração vegetativa (colmo, folha e pendão) (Flachowsky et al., 1993). O crescimento ininterrupto e maior atividade metabólica dos híbridos contendo o gene *cry1Ab*, ao despendem menos energia para se defender das pragas, podem acelerar o transporte de carboidratos solúveis do colmo para os grãos, reduzindo a duração do intervalo entre grão leitoso e farináceo. Esta ocorrência encurta a janela de corte para ensilagem e faz com que o ponto de colheita influencie diretamente o efeito de redução dos danos por pragas nos híbridos contendo o gene *cry1Ab* sobre a qualidade da silagem, em função do tênue equilíbrio entre aumento do amido e perdas de digestibilidade da fração fibrosa.

Composição química

As alterações na composição química dos híbridos contendo o gene *cry1Ab* e suas respectivas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* não se repetiram nos dois anos do trabalho. No primeiro ano as condições ambientais e a infestação por pragas prejudicaram a produção das lavouras em ambas as modalidades, *Bt* e não *Bt*. Nesta situação, quando a infestação e os danos foram altos, as diferenças na composição química podem variar de acordo com o momento da colheita e nível de infestação (Tabela 6), mas quando a infestação por pragas provoca danos menores, as composições químicas foram equivalentes (Tabela 7). As interações demonstraram que quando a infestação por pragas prejudica o crescimento da planta as alterações na composição química são favoráveis aos híbridos transgênicos colhidos com menores teores de matéria seca (30%), mas podem ser desfavoráveis com maiores teores de matéria seca (33,5%), refletindo a dinâmica entre o enchimento dos grãos e teor de fibra no colmo (Tabelas 6). Os resultados do segundo estão de acordo com Calsamiglia et al. (2007), Faust et al. (2007), Faust (1999) e Faust e Spangler (2000) que encontraram composição química das modalidades de milho *Bt* e não *Bt*, equivalentes, (Tabela 7). Contudo, os trabalhos mencionados não referem o nível de infestação nem o manejo do controle de pragas adotado na lavoura convencional, os híbridos possuem características diferentes e a colheita foi realizada no momento em que as plantas possuíam entre 37 a 42% de matéria seca.

No primeiro ano os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), carboidratos não fibrosos (CNF), minerais e P dos híbridos contendo o gene *cry1Ab* foram superiores aos teores de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*. Efeitos de interação significativos mostraram menores teores de fibra em detergente neutro (FDN) e nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e maiores teores de CNF somente no DKB 390 contendo o gene *cry1Ab* e maiores teores de Ca e K somente no AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* (colhido com 33,45% de MS) quando comparados com suas respectivas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* (Tabela 6). Entretanto, no segundo ano, houve redução dos teores de CNF nos híbridos DKB 390 contendo o gene *cry1Ab* quando

comparados a sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab* (Tabela 7). No primeiro ano as piores condições climáticas fizeram o híbrido AG 8088 antecipar seu ciclo vegetativo e embora não tenham sido significativo, os teores de FDN, NIDN e CNF demonstraram perda de qualidade. No segundo ano, quando o AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* foi colhido com 31,6% de MS ocorreu redução no teor de PB e maior teor de CNF, quando comparado à sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab* (Tabela 7). A perda de folhas com o avanço do estágio de maturação responde em parte pelo decréscimo do teor de proteína.

Tabela 6 Composição química de híbridos de milhos contendo o gene *cry1Ab* e de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*, primeiro ano

(% da MS)	Efeito Principal		Interações				CV	Probabilidade	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	DKB 390		AG 8088			<i>Bt</i>	Interação
			não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>			
MS	30,86^b	31,62^a	29,18	29,80	32,55	33,45	1,17	***	NS
PB	6,46^b	7,40^a	6,66	7,52	6,26	7,27	2,64	***	NS
EE	2,08	2,19	2,20	2,21	1,97	2,16	6,09	NS	NS
FDN	55,11	48,59	55,11^a	40,15^b	55,10 ^a	57,02 ^a	5,36	***	***
NIDN	33,73	31,56	35,39^a	28,70^b	32,07 ^a	34,41 ^a	12,47	NS	*
FDA	27,92	28,50	27,94	28,26	27,90	28,75	3,23	NS	NS
NIDA	25,22	26,07	20,03	28,70	30,40	23,44	48,39	NS	NS
Lignina	3,67	3,72	3,47	3,69	3,88	3,75	9,33	NS	NS
Celulose	23,73	24,09	23,89	23,95	23,56	24,22	3,44	NS	NS
Hemicelulose	27,19	27,92	27,17	27,58	27,20	28,27	5,39	NS	NS
DIV	55,18^b	65,53^a	55,89	64,29	54,46	66,77	4,16	***	NS
CHO totais	88,16^a	86,79^b	87,67	86,58	88,64	86,99	0,40	***	NS
CNF	33,05^b	38,19^a	32,56^b	46,42^a	33,53 ^b	29,97 ^b	7,81	***	***
Minerais	3,28^b	3,61^a	3,45	3,67	3,11	3,56	4,34	***	NS
Ca	0,143^b	0,171^a	0,164 ^{ab}	0,164 ^{ab}	0,122^b	0,178^a	6,18	***	***
P	0,136^b	0,148^a	0,138	0,150	0,134	0,146	4,97	**	NS
K	0,879^b	0,923^a	1,004 ^a	1,002 ^a	0,754^c	0,844^b	3,85	*	*

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Tabela 7 Composição química de híbridos de milhos contendo o gene *cry1Ab* e de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*, segundo ano

(% da MS)	Efeito Principal		Interações				CV	Probabilidade	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	DKB 390		AG 8088			<i>Bt</i>	Interação
			não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>			
MS	30,36	30,42	30,13	29,26	30,59	31,59	5,23	NS	NS
PB	7,28^a	6,57^b	6,89 ^{ab}	6,82 ^{ab}	7,68^a	6,32^b	8,33	*	--
EE	2,49^a	2,27^b	2,50	2,30	2,48	2,23	9,44	--	NS
FDN	52,25	54,02	50,72	54,29	53,77	53,75	3,93	NS	NS
NIDN	12,34	13,03	12,20	12,04	12,48	14,02	14,67	NS	NS
FDA	27,82	28,70	27,93	29,07	27,72	28,33	5,35	NS	NS
NIDA	15,00	15,42	15,55	16,74	14,46	14,10	16,01	NS	NS
Lignina	4,11	4,31	3,75	4,20	4,46	4,42	9,63	NS	NS
Celulose	23,17	23,85	23,60	24,28	22,74	23,41	5,15	NS	NS
Hemicelulose	24,42	25,32	22,79	25,22	26,05	25,42	7,81	NS	NS
CHO totais	86,78^b	87,64^a	87,04	87,28	86,52	88,00	0,87	--	NS
CNF	34,52	33,61	36,31^a	32,97^b	32,74^b	34,24^a	6,69	NS	--
Minerais	3,44	3,51	3,57	3,59	3,32	3,44	7,95	NS	NS
Ca	0,146	0,158	0,150	0,165	0,142	0,152	14,58	NS	NS
P	0,175	0,168	0,175	0,175	0,175	0,165	5,15	NS	NS
K	0,876	0,842	0,885	0,875	0,867	0,810	8,99	NS	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%
não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)
Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)
Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM
DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Os teores de CNF, no primeiro do DKB 390 e no segundo ano do AG 8088 ambos contendo o gene *cry1Ab*, foram superiores à suas respectivas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*. Embora ambos os híbridos sejam classificados como precoces as interações podem ter ocorrido devido ao fato do híbrido DKB 390 ser mais tardio que o AG 8088 e conseqüentemente, ter sido colhido com menor teor de matéria seca. Além disso, o DKB 390 tem o grão semiduro, enquanto o AG 8088 tem o grão duro. Os teores de carboidratos estruturais do colmo e carboidratos não estruturais dos grãos entre os híbridos variam de acordo com as condições ambientais e características de resistência, ciclo vegetativo e produção de cada híbrido. De acordo com Eberhart et al. (1995) a interação genótipo x ambiente representa expressiva fonte de variação em experimentos comparando híbridos de milho.

Faust et al. (2007) comparando híbridos contendo o gene *cry1F* não observaram diferenças na composição química da planta inteira, mas não foram relatados os níveis de infestação por insetos e as plantas transgênicas e convencionais foram colhidas com teor de matéria seca de 37,5% e 42,0%, respectivamente, o que pode ter nivelado as diferenças oriundas do maior enchimento dos grãos em estádios de menor maturidade. No trabalho de Faust et al. (2007) os teores de FDN e lignina do híbrido contendo o gene *cry1F* e de sua contraparte convencional sem o gene *cry1F* foram de 46,1 vs 38,0 e 5,35 vs 3,36, seguindo a mesma tendência de aumento da fração fibrosa observada na composição química do híbrido DKB 390 contendo o gene *cry1Ab*, no segundo ano (Tabela 7).

Uma das hipóteses de alteração no aproveitamento dos nutrientes de plantas transgênicas pelos animais estaria relacionada ao depósito de lignina na parede celular como mecanismo de defesa natural das plantas contra pragas (Ryals et al., 1994; Staskawicz et al., 1995), mas no momento de corte indicado para ensilagem, os resultados mostraram uma tendência inversa de aumento da fibra devido ao avanço na maturidade da planta transgênica, embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre os teores de fibra no segundo ano (Tabela 7).

Com relação à composição química das folhas, colmos e espigas, os teores de minerais nos híbridos transgênicos indicam maior enchimento dos grãos e em particular o teor de P, devido à sua alta mobilidade na planta, contribuindo para elucidar as ocorrências de enchimento dos grãos. O percentual de P do híbrido AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* foi inferior a sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab* na folha (1,58 vs 1,74) e no colmo (0,14 vs 0,26) e superior na espiga (1,76 vs 1,62), indicando a sua translocação para o enchimento dos grãos (Balieiro et al., 2010a). Embora o menor percentual de P no colmo dos híbridos contendo o gene *cry1Ab* (0,18 vs 0,24) e maior percentual na espiga dos mesmos (1,87 vs 1,64) indiquem translocação do nutriente do colmo para a espiga, a maior concentração na planta inteira no primeiro ano (tabela 6) não pode ser explicada pela translocação do nutriente do colmo para o grão. Não se sabe se a proteína Cry1Ab atua no ambiente radicular influenciando a absorção de nutrientes. De acordo com Batista Junior et al. (2002), as plantas transgênicas podem liberar a toxina *Bt* da raiz quando se decompõem e inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos. Essa eventual alteração na microbiota do solo pode alterar favoravelmente a absorção de nutrientes, mas não existem evidências científicas que comprovem essa ocorrência.

O híbrido DKB 390 contendo o gene *cry1Ab* teve menor percentual de PB (2,55 vs 3,12) e maior percentual de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) (35,81 vs 24,37) no colmo, entretanto houve maior percentual de CNF na espiga (66,19 vs 41,40) quando comparado a sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab*, em função do maior amadurecimento e enchimento dos grãos, compensando a perda de qualidade do colmo (Balieiro et al., 2010a). Estes efeitos não foram observados no híbrido AG 8088. Embora a digestibilidade *in vitro* da espiga do AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* tenha sido superior à da espiga de sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab* (78,01 vs 51,39), devido ao maior enchimento dos grãos, o estágio fisiológico mais avançado do híbrido AG 8088 anulou os ganhos em digestibilidade com o enchimento dos grãos (Balieiro et al., 2010a). Os percentuais de proteína (12,15 vs 13,04) e de lignina (4,00 vs 3,73) das folhas dos híbridos contendo o gene *cry1Ab* foram inferiores e superiores aos híbridos convencionais sem o gene *cry1Ab*, respectivamente (Balieiro et al., 2010a). Os teores de K (15,60 vs 13,68) e a digestibilidade *in vitro* (48,53 vs 53,97) do colmo do AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* foram superiores e inferiores a sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab*, respectivamente. Com o avanço no estágio de maturidade houve menor aproveitamento de constituintes fibrosos do colmo e maior produção de nutrientes altamente digestíveis na espiga. O balanço entre esses fatores e a proporção de cada uma dessas partes na planta definiram a qualidade dos nutrientes disponíveis para o armazenamento.

As composições químicas das silagens das lavouras do primeiro ano são apresentadas na Tabela 8. Os teores de MS, PB, EE, FDA, Ca e P da silagem dos híbridos contendo o gene *cry1Ab* foram superiores as suas respectivas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*, assim como ocorrido com a composição química das plantas no momento do corte. Os teores de CHO totais das silagens de híbridos contendo o gene *cry1Ab* foram inferiores às silagens dos híbridos sem o gene *cry1Ab* devido à maior participação de PB, EE e minerais na massa ensilada. Se por um lado, nutrientes como EE e minerais indicam maior participação de grãos, contribuindo para melhor qualidade da silagem, por outro, o maior teor de FDA reduz a qualidade por ser negativamente relacionado à digestibilidade (Van Soest, 1978). O enchimento de grãos aumentou os teores de EE, Ca e P nas silagens de híbridos DKB 390 transgênicos, melhorando a qualidade da silagem. O maior teor de nitrogênio insolúvel em detergente ácido na silagem de AG 8088 transgênico, embora não tenha diferido estatisticamente, prejudicou a digestibilidade da fibra.

Tabela 8 Composição química das silagens de milhos contendo o gene *cry1Ab* e das silagens de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*

(% da MS)	Efeito Principal		Interações				CV	Probabilidade	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	DKB 390		AG 8088			<i>Bt</i>	Interação
			não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>			
MS	27,64 ^b	28,25 ^a	28,37 ^a	28,37 ^a	26,91 ^b	28,12 ^a	1,61	*	*
CHO Totais	83,90 ^a	82,47 ^b	83,76	81,83	84,04	83,11	0,66	**	--
CNF	39,52	37,38	42,93	39,44	36,11	35,22	8,22	NS	NS
PB	8,42 ^b	9,25 ^a	8,67	9,70	8,17	8,81	3,54	***	NS
EE	3,49 ^b	3,99 ^a	3,53 ^b	4,27 ^a	3,46 ^b	3,70 ^a	7,65	**	--
FDN	44,38	45,09	40,83	42,39	47,93	47,79	7,54	NS	NS
FDA	20,00 ^b	21,34 ^a	18,78	19,74	21,23	22,95	7,88	--	NS
NIDA	1,67	1,77	1,45	1,39	1,89	2,14	15,51	NS	NS
Hemicelulose	24,37	25,29	22,05	22,65	26,70	27,93	16,17	NS	NS
Minerais	4,18 ^b	4,28 ^a	4,03	4,19	4,33	4,38	2,63	*	NS
Ca	0,171 ^b	0,192 ^a	0,168 ^b	0,198 ^a	0,174 ^{ab}	0,186 ^{ab}	2,61	***	**
P	0,181 ^b	0,199 ^a	0,180	0,202	0,182	0,196	8,96	*	NS
K	1,010	1,020	1,014	1,018	1,006	1,022	2,42	NS	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%
 não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)
 Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)
Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM.
 DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Embora as composições químicas dos híbridos de milhos contendo o gene *cry1Ab* e de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* sejam equivalentes em baixos níveis de infestação e danos por pragas, uma análise conjunta dos resultados de Calsamiglia et al. (2007), Donkin et al. (2003) e Faust et al. (2007) acrescidos aos resultados por hora relatados, permitem observar que quando os híbridos forem colhidos com menor teor de MS as alterações poderão favorecer a qualidade da silagem de milho contendo o gene *cry1Ab*, reduzindo os teores de fibra (FDN, FDA e lignina) (Faust et al., 2007). Por outro lado, quando os híbridos forem colhidos com teores de MS, semelhantes ou superiores aos de suas contrapartes convencionais, o teor de fibra dos híbridos geneticamente modificados pode aumentar (Calsamiglia et al. 2007; Donkin et al., 2003). Cabe considerar que Donkin et al. (2003) não usaram o isogênico mais próximo ao milho *Bt* (34F80BT vs 34E79 ambos da Pioneer), Calsamiglia et al. (2007) utilizaram híbridos isogênicos próximos e o milho *Bt* utilizado, além do gene *cry1Ab* continha também um gene introduzido no genoma da planta para lhe transferir resistência a herbicida (DK493 vs DK493RR/Bty) e no trabalho de Faust et al. (2007) foram testados milhos contendo o gene *cry1F* que promove resistência a insetos (*Ostrinia nubilalis*) (TC1507 vs sua contraparte convencional) (Tabela 9).

Tabela 9 Composição química das silagens de milhos geneticamente modificados

(% da MS)	Calsamiglia et al. (2007)		Donkin et al. (2003)		Faust et al. (2007)	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>
MS planta	39,5	40,1	± 40,0	± 40,0	42,0	37,5
MS silagem	36,6	38,5	41,0	43,0	45,0	42,2
FDN	38,1	41,8	41,5	43,2	45,2	43,9
FDA	18,5	20,7	25,2	25,2	29,4	27,7
Lignina	0,8	1,0	--	--	3,6	3,3
CNF	43,6	42,0	40,5	42,5	--	--
PB	8,9	8,2	7,9	7,8	8,6	8,8
EE	3,0	2,6	--	--	3,1	3,1
Ca	0,4	0,28	0,23	0,24	0,27	0,25
P	0,24	0,22	0,25	0,21	0,22	0,22
K	0,80	0,72	1,06	1,11	0,81	0,82

Adaptado de Calsamiglia et al. (2007), Donkin et al. (2003) e Faust et al. (2007).

Consumo e digestibilidade *in vivo*

O ensaio de digestibilidade *in vivo* foi realizado no Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, SP. As silagens foram confeccionadas em tambores de 200 l em boas condições de compactação e vedação, com densidade de 600 kg/m³. As silagens de híbridos de milho contendo o gene *cry1Ab* ou de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* foram fornecidas para 20 carneiros machos e o consumo de matéria seca, ao redor de 2% do peso vivo, não diferiu (Tabela 10) (Balieiro et al., 2010c). A ausência de efeito sobre o consumo de matéria seca também foi observado por Calsamiglia et al. (2007), Donkin et al. (2003) e Faust et al. (2007).

Tabela 10 Consumo de matéria seca de silagens de milhos contendo o gene *cry1Ab* e das silagens de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*

Efeito Principal (%)	Interações						Probabilidade		
	DKB 390		AG 8088		CV	Bt	Interação		
	não Bt	Bt	não Bt	Bt					
g/kg de PV	19,86	20,33	19,98	19,69	19,75	20,97	11,44	NS	NS
% do PV	1,98	2,03	1,99	1,96	1,97	2,09	11,50	NS	NS
% do PV ^(0,75)	9,39	9,57	9,44	9,34	9,35	9,79	8,66	NS	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não Bt = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = p>0,07; -- = p<0,07; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (Bt) e Interação = Híbrido x OGM.

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Os resultados obtidos indicaram uma interação significativa entre o efeito da introdução do gene *Bt* e híbridos (Dekalb e Agrocere) sobre a digestibilidade dos nutrientes (Tabela 11). Na idade com que foram colhidos e sob as condições ambientais em que os híbridos foram cultivados a introdução do gene *Bt* foi benéfica a qualidade da silagem do DKB 390, mas prejudicou a qualidade da silagem de AG 8088. Esta ocorrência esteve associada à maturidade da planta de forma que a planta mais tardia foi beneficiada e a mais precoce prejudicada pela introdução do gene *Bt*. As plantas transgênicas crescem mais rapidamente que as convencionais em função dos menores danos por pragas e as conseqüências desse efeito variam com o ponto de colheita. Além disso, o ciclo vegetativo parece ter sido antecipado no primeiro ano devido a condições de estresse hídrico.

Quando o milho mais tardio (DKB 390) foi colhido com 30% de matéria seca o maior enchimento dos grãos nos híbridos transgênicos prevaleceu a outras ocorrências contribuindo para melhor qualidade da silagem. O amido presente no grão é mais estável na silagem que os carboidratos solúveis do colmo e é altamente digestível. Por outro lado, quando o milho mais precoce (AG 8088) foi colhido com 33,5% de matéria seca, a perda de digestibilidade da fração fibrosa não foi compensada pela maior participação dos grãos, reduzindo a qualidade da silagem.

As digestibilidades *in vivo* da MS, PB, EE, FDA e FDN do híbrido DKB 390 contendo o gene *cry1Ab* foram superiores as de sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab*. As digestibilidades *in vivo* da FDN, matéria orgânica e CHOs totais do híbrido AG 8088 contendo o gene *cry1Ab* foram inferiores as de sua contraparte convencional sem o gene *cry1Ab* (Tabela 11) (Balieiro et al., 2010a). O cálculo dos nutrientes digestíveis totais (NDT) foi realizado utilizando a seguinte equação: NDT = PB digestível + EE digestível (2,25) + FDN digestível + CNF digestível (NRC, 2001). A produção de NDT por hectare foi de 7,29 t/ha e 8,61 t/ha nos híbridos DKB 390, convencional e transgênico, e de 8,11 t/ha e 8,08 t/ha nos híbridos AG 8088, convencional e transgênico, respectivamente. Embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa na produção de MS no primeiro ano do experimento, a maior produção de MS do AG 8088 contendo o gene *cry1Ab*, não proporcionou maior produção de energia digestível por área.

Tabela 11 Digestibilidade dos nutrientes e nutrientes digestíveis totais das silagens de milhos contendo o gene *cry1Ab* e das silagens de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*

Efeito Principal (%)	Interações						Probabilidade		
	DKB 390		AG 8088		CV	Bt	Interação		
	não Bt	Bt	não Bt	Bt					
Matéria seca	59,65	59,21	61,74^b	64,01^a	56,68 ^c	55,30 ^c	8,50	NS	*
Mat. orgânica	68,47 ^a	66,95 ^b	69,99 ^a	70,19 ^a	66,94^b	63,71^c	6,50	*	**
PB	46,64 ^b	49,11 ^a	48,81^b	53,96^a	44,47 ^c	44,26 ^c	15,24	*	*

EE	82,70 ^b	84,11 ^a	81,47^c	85,46^a	83,92 ^b	82,76 ^{bc}	3,10	***	***
CNF	88,83 ^a	86,33 ^b	91,06^a	87,40^b	86,60 ^{bc}	85,26 ^c	3,80	***	*
CHO totais	63,15	61,91	64,84 ^a	66,20 ^a	61,45^b	57,61^c	8,05	NS	**
FDA	29,33 ^b	35,38 ^a	27,16^b	40,32^a	31,51 ^b	30,44 ^b	30,03	***	***
FDN	39,60	41,66	36,66^b	46,24^a	42,54^a	37,09^b	19,14	--	***
Hemicelulose	48,29	48,77	44,35 ^b	49,48 ^{ab}	52,23 ^a	48,07 ^{ab}	22,98	NS	**
K	67,61 ^b	75,23 ^a	70,68^b	76,38^a	64,54^b	74,08^a	8,18	***	*
NDT	62,96	63,15	64,96^b	67,59^a	60,95 ^b	58,71 ^b	7,09	NS	***

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Protozoários no rúmen

Durante o ensaio de digestibilidade com carneiros foram realizadas duas coletas de líquido ruminal, após 14 e 22 dias de adaptação a dieta, através de sonda esofágica nasal, 40 minutos antes da primeira refeição. Houve efeito de interação significativo entre os híbridos (DKB 390 e AG 8088) e modalidades dos híbridos (contendo o gene *cry1Ab* ou sem o gene *cry1Ab*) sobre a população de protozoários no rúmen (Tabela 12). Ocorreu redução significativa na população de protozoários ruminais no rúmen de animais alimentados com silagem do híbrido de milho DKB 390 contendo o gene *cry1Ab* quando comparado com a população de protozoários nos animais alimentados com silagem do híbrido DKB 390 convencional sem o gene *cry1Ab*, não ocorrendo efeito nas silagens produzidas com os híbridos AG 8088. De acordo com Ikwuegbu e Sutton (1982) há um efeito de toxicidade da gordura dietética para protozoários e bactérias gram-positivas e, portanto, este efeito foi atribuído ao maior teor de EE observado na silagem do híbrido DKB 390 contendo o gene *cry1Ab* quando comparado à silagem de DKB 390 convencional sem o gene *cry1Ab* (4,27 vs 3,53).

Os protozoários podem utilizar a maioria dos carboidratos para crescimento e esse processo dá origem a hidrogênio. O hidrogênio produzido pelos protozoários ciliados é utilizado por *Archae* metanogênicas que vivem em simbiose com os protozoários e são responsáveis pela formação de metano. Dessa forma, os protozoários podem ser responsáveis por até 37% da metanogênese (Williams & Coleman, 1997) e sua eliminação resulta em redução da produção de metano no rúmen. Balieiro et al. (2009) observaram que a população de protozoários ciliados no rúmen foi positivamente correlacionada com a produção de metano ruminal e Demeyer (1995) mencionam que a gordura dietética pode otimizar a utilização de energia digestível devido à redução de perdas pela produção de gás metano. De fato, Balieiro et al. (2007) observaram que a redução na população de protozoários devido ao aumento de gordura na dieta foi acompanhada por mudança no padrão de fermentação com aumento na proporção de ácido propiônico, podendo aumentar a retenção de energia para ganho de peso de bovinos.

A concentração da proteína Cry1Ab na planta total foi maior no híbrido AG 8088 *Bt* quando comparada à concentração do híbrido DKB 390 *Bt* e, portanto, concluiu-se que não houve efeito de toxidez da proteína Cry1Ab aos protozoários ruminais, pois caso houvesse, tal efeito deveria ser constatado também nos animais alimentados com a silagem do híbrido AG 8088 contendo o gene *cry1Ab*, o que não ocorreu.

Tabela 12 População de protozoários ciliados no rúmen de carneiros alimentados com silagens milhos contendo o gene *cry1Ab* e das silagens de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*

	<u>Efeito Principal</u>		<u>Interações</u>				CV	<u>Probabilidade</u>	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	<u>DKB 390</u>		<u>AG 8088</u>			<i>Bt</i>	Interação
			não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>			
Coleta após 14 de adaptação dos animais a dieta (10 ⁴ /ml)									
Entodinium	24,97	23,42	25,72^a	22,02^b	24,21 ^a	24,83 ^a	4,64	**	***
Diplodinium	1,64	1,49	1,91^a	1,46^b	1,37^b	1,51^b	9,23	*	***
Epidinium	1,50	1,29	1,52^a	1,15^b	1,48 ^a	1,43 ^{ab}	11,20	*	*
Isotricha	1,36^a	1,24^b	1,27	1,03	1,46	1,44	9,80	*	NS
Dasytricha	1,49	1,24	1,35^b	0,85^c	1,63 ^a	1,62 ^a	7,64	***	***
Ostracodinium	0,62	0,58	0,62	0,55	0,63	0,61	10,86	NS	NS
Total	31,60	29,27	32,41^a	27,08^b	30,80 ^a	31,46 ^a	3,97	**	***
Coleta após ensaio de digestibilidade aparente 22 dias de adaptação (10 ⁴ /ml)									
Entodinium	24,94	23,35	26,13^a	21,62^b	23,75 ^{ab}	25,08 ^a	5,33	*	***
Diplodinium	1,67	1,62	2,05^a	1,60^b	1,29^c	1,64^b	7,81	NS	***
Epidinium	1,47	1,24	1,50^a	1,08^b	1,44 ^a	1,41 ^{ab}	12,75	*	*
Isotricha	1,34	1,24	1,17	0,95	1,52	1,54	10,19	NS	--
Dasytricha	1,47	1,32	1,34^b	0,92^c	1,60 ^a	1,73 ^a	9,81	*	***
Ostracodinium	0,58	0,59	0,59^{ab}	0,53^b	0,57 ^{ab}	0,65 ^a	8,36	NS	**
Total	31,50	29,38	32,80^a	26,71^b	30,20 ^a	32,06 ^a	5,14	*	***

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)
 Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = p>0,07; -- = p<0,07; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

População de fungos e leveduras

O tipo de silo influenciou sobremaneira o efeito da introdução do gene *Bt* na qualidade da silagem uma vez que a contagem de leveduras excedeu o ponto crítico de 100.000 ufc/g nos híbridos convencionais. Enquanto no ensaio de digestibilidade *in vivo* foram utilizados tambores de 200 l como silo, com boa compactação e vedação, atingindo-se a densidade de 600 kg/m³, para avaliar o ganho de peso de 24 novilhas foi necessário ensilar a forragem próxima ao confinamento em grandes quantidades, utilizando-se silos tipo bag.

A compactação no final do processo de fermentação tem influencia do tamanho de partícula, teor de umidade no momento de corte e formação de efluentes que drenam nutrientes e reduzem a densidade do silo. Os híbridos foram colhidos com 30% de matéria seca e a proporção de partículas da silagem com tamanho entre 0,1 a 1,9 cm foi de 97,5%, avaliado com o Penn State de acordo com a metodologia proposta por Heinrichs (1996) e em consonância com os procedimentos sugeridos pela American Dairy Science Association (1970). A densidade final foi ligeiramente maior para silagens de milho *Bt* e todas foram baixas, entre 450 e 510 kg/m³, quando comparadas com as densidades alcançadas em silos tipo trincheira (650 kg/m³).

O milho possui as características necessárias para fermentação adequada e boa preservação dos nutrientes, mas a anaerobiose é uma condição indispensável. As condições de baixa densidade e maior presença de ar no silo tipo bag resultaram em desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras envolvendo perda de nutrientes. Nestas condições os híbridos transgênicos incrementaram a preservação de nutrientes devido à menor população de leveduras e fungos filamentosos na silagem (Tabela 13).

Embora alguns trabalhos corroborem com este resultado, a ação antifúngica da proteína Cry1Ab é controversa. Calsamiglia et al. (2007) ao abrir silos do tipo bag com silagem de milho contendo o gene *cry1Ab* ou com seu isogênico mais próximo sem o gene *cry1Ab* observaram que o teste para aflatoxina B1, B2, G1 e G2 foram todos negativos. Como as aflatoxinas são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus*

flavus e *Aspergillus parasiticus*, talvez os mesmos não sejam sensíveis à toxina *Bt*. Balieiro et al. (2010b), utilizando baldes de plástico de 7 litros como silos experimentais, não observaram diferença entre a população de fungos em silagens de híbridos contendo o gene *cry1Ab* e suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab* após cinco dias de exposição aeróbia.

Por outro lado, Bakan et al. (2002) observaram que a biomassa de fungos em grãos de milho *Bt* foi de 4 a 18 vezes menores que os isogênicos próximos não *Bt*. No trabalho de Bakan et al. (2002) a concentração da fumonisina B1 nos grãos de milho *Bt* foi de 0,05 a 0,3 ppm e no isogênico próximo não *Bt* foi de 0,4 a 9 ppm. Os autores concluíram que o uso do milho *Bt* é uma forma de reduzir a contaminação do milho por espécies de *Fusarium*. Batista Junior et al. (2002) observaram que a proteína Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* reduziu o crescimento de três fungos: *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines* e *Colletotrichum* sp., mas não teve efeito no crescimento de *Fusarium oxysporum*.

A ação antifúngica da toxina Cry1Ab parece ser específica para determinados fungos e a entrada de ar no silo é um fator necessário para que esses efeitos se evidenciem. A influência da toxina *Bt* sobre os fungos na ensilagem pode se iniciar na lavoura. Na superfície das folhas da planta, predominam bactérias e fungos aeróbios que são conduzidos para o interior do silo. Quando a planta é cortada, picada e compactada, há uma mudança da atmosfera aeróbia para anaeróbia e somente as bactérias e leveduras capazes de se multiplicar neste ambiente sem oxigênio sobreviverão (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*) e outras permanecerão em estado de latência aguardando o contato com o ar para voltar a se proliferar.

Enquanto um silo em condições de anaerobiose reduz a população de leveduras capazes de utilizar o lactado para 15% e os outros 85% são espécies do gênero *Saccharomyces*, também capazes de fermentar, mas não de consumir o lactato, a presença de ar num silo que não tenha sido bem vedado, ou compactado, permite o crescimento de leveduras dos gêneros *Cândida* (*Cândida krusei*, *C. Lambica*) e *Hansenula* (nomeadamente *Hansenula anomala*) que utilizam o lactato (Lacaz & Munari, 1992). Nessas circunstâncias, dependendo das condições de umidade, pH e disponibilidade de nutrientes, as leveduras crescem como bactérias e fermentam carboidratos solúveis e ácidos orgânicos, transformando nutrientes em água, gás e calor. O ácido lático transformado em álcool aumenta a perda de energia que poderia ser convertida em desempenho animal e a água produzida pela atividade microbiana aumenta os efluentes, carreando ácidos orgânicos, nutrientes e reduzindo o teor de matéria seca das silagens (Tabela 13). O maior teor de ácido acético e redução da produção de álcool ocorrem devido à redução na população de leveduras.

Tendo em vista que mesmo em situações de ensilagem com adequado teor de matéria seca, tamanho de partícula, compactação, vedação e rapidez para o fechamento do silo pode ocorrer contato da silagem com oxigênio, antes do fechamento e na abertura do silo, o efeito antifúngico do milho *Bt* pode ser benéfico, contribuindo para a melhor qualidade da silagem.

O maior teor de ácido acético, sem alterar o teor de ácido lático, e menores teores de álcool em silagens de milho *Bt*, foram reflexos e contribuíram para uma menor população de fungos e leveduras. Esses efeitos aumentaram a estabilidade aeróbia, uma vez que o ácido acético tem propriedades antifúngicas, resultando em menores perdas e maior fornecimento de energia aos animais.

Além da grande influência que os fungos exercem sobre a qualidade da silagem, também desempenham importante papel na digestão e no ecossistema do trato digestório de ruminantes (Kamra, 2005). A principal espécie encontrada em bovinos é

Neocallimastix variabilis (Grenet et al., 1989) sendo também isolada no trato digestivo dos animais a espécie *Anaeromyces elegans* (Ho et al., 1993). A população de fungos no rúmen chega a representar 8% da biomassa microbiana ruminal em animais alimentados com dietas ricas em fibras e estão envolvidos na degradação da parede celular lignificada (Akin, 1987). Recentes experimentos têm mostrado que ao remover os fungos do conteúdo ruminal, ocorre significativa redução na produção de gás e degradação da fibra em dietas fibrosas e, portanto, influenciam a eficiência de utilização de energia pelos animais. Se por um lado, são marcantes os benefícios da ação de fungos no rúmen, por outro, não são menores os prejuízos de sua ação deletéria na silagem.

Apesar dos *Bacillus thuringiensis* serem exaustivamente estudados e utilizados como agentes de controle biológico de pragas há mais de 30 anos (Valadares-Inglis et al., 1998) e inúmeras espécies do gênero *Bacillus* terem demonstrado atividade antifúngica (Kim et al. 1997; Podile & Laxmi, 1998), não havia sido relatado até o momento, que plantas contendo o gene *Bt* seriam eficientes contra espécies de leveduras e fungos filamentosos que consomem ácidos orgânicos e carboidratos solúveis das silagens. A comparação da frequência das diferentes espécies de fungos no solo, silagem e ecossistema ruminal em função da presença da toxina *Bt* não tem sido respaldada pela literatura científica.

Tabela 13 Composição química de silagens de milho *Bt* versus isogênicos próximos sem o gene *cry1Ab* produzidas em silo tipo bag

	DKB 390		AG 8088	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>
Composição bromatológica (%)				
Matéria seca	23,12	23,89	26,90	26,03
Proteína bruta	8,34	8,95	8,26	8,23
Extrato etéreo	2,23	2,49	2,23	2,50
CNF	21,87	27,58	26,49	29,03
CHO totais	84,05	84,31	85,53	85,34
FDA	38,89	35,07	35,77	33,42
NIDA	8,29	5,79	7,43	6,58
FDN	62,18	56,74	59,05	56,32
NIDN	9,95	8,78	11,47	9,25
Hemicelulose	23,29	21,67	23,28	22,90
População de fungos (UFC/g)				
Fungo Filamentoso	533.333	6.666	150.000	17.000
Levedura	1.066.666	8.666	1.113.333	17.000
Ácidos orgânicos (% da MS)				
Acetato	4,43	5,73	2,68	3,26
Lactato	6,34	4,05	3,83	5,80
Álcool	3,70	1,75	3,63	1,32
Butirato	0,00	0,00	0,01	0,00
Propionato	0,23	0,37	0,27	0,14

CNF = carboidratos não fibrosos

UFC/g = unidade formadora de colônia por grama de silagem

Perdas fermentativas

Os teores dos ácidos orgânicos totais, acético e propiônico foram superiores nas silagens de milhos contendo o gene *cry1Ab* (Tabela 14). Este efeito promove maior estabilidade da silagem, menor perda e maior fornecimento de energia aos animais, uma vez que, além de preservar nutrientes da silagem, os ácidos orgânicos integram o conjunto de nutrientes fornecidos aos animais através da silagem.

A perda total de matéria seca e a recuperação de matéria seca após cinco dias de exposição ao ar foram obtidas de acordo com Bernardes et al. (2007). As perdas durante o processo fermentativo estiveram acima da normalidade esperada para silagens de milho (em torno de 3 a 8 %) e não houve diferenças significativas.

Foram constatadas menores perdas por efluentes e produção de gás nos híbridos geneticamente modificados. A antecipação do amadurecimento, teor de MS e maior formação de amido nos grãos, carboidrato mais estável que os solúveis no silo, podem contribuir para redução de perdas por efluentes. Além disso, substâncias que inibam ou promovam o crescimento microbiano podem influenciar a produção de gás e efluentes na silagem, e dessa forma o efeito supressor da toxina *Bt* sobre fungos resultaram em menor produção de gás (Tabela 14). Embora no trabalho de Faust et al. (2007) as perdas não tenham sido observadas, o aumento no teor de FDN na silagem do híbrido convencional em relação à forragem fresca indica maiores perdas de carboidratos solúveis durante o armazenamento (46,1 vs 43,9 com milho *Bt* e 38,0 vs 45,2 com milho convencional).

Os teores de ácidos orgânicos das silagens foram nivelados após 5 dias em exposição aeróbia de forma que as silagens que continham maiores teores perderam mais ácidos orgânicos (Tabela 14). De acordo com Jobim et al. (2007) a atividade dos microrganismos que decompõem a silagem será mais intensa, quanto melhor a qualidade da silagem, em função dos maiores teores de carboidratos solúveis e de ácido lático residuais.

Tabela 14 Perdas fermentativas nas silagens de milhos contendo o gene *cry1Ab* e das silagens de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*

	Efeito Principal		Interações				CV	Probabilidade	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	DKB 390		AG 8088			<i>Bt</i>	Interação
			não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>			
Perdas fermentativas									
Efluente (kg/t)	7,03^a	5,02^b	6,76	4,08	7,31	5,96	24,06	*	NS
Gás (% MS)	7,06^a	6,13^b	7,28	5,96	6,85	6,31	14,28	--	NS
Perda MS (%)	10,08	9,43	9,72	8,97	10,43	9,88	11,93	NS	NS
Ácidos orgânicos na abertura (mMol/ml)									
Acetato	41,65^b	54,41^a	47,72	55,75	35,58	53,08	15,41	*	NS
Propionato	31,54^b	45,11^a	37,02 ^{ab}	41,19 ^{ab}	26,05^b	49,03^a	15,70	**	*
Butirato	5,99	7,32	6,23	7,88	5,76	6,75	26,70	NS	NS
Ácidos Totais	74,8^b	106,8^a	90,97 ^a	104,8 ^a	58,73^b	108,8^a	10,40	***	*
Ácidos orgânicos e perdas após 5 dias (mMol/ml)									
Perda MS (%)	12,31	13,90	13,60	16,03	11,01	11,78	33,45	NS	NS
Acetato	46,99	41,88	46,38	38,55	47,60	45,20	15,88	NS	NS
Propionato	38,13	35,98	37,81	37,63	38,45	34,33	10,41	NS	NS
Butirato	3,57	3,48	3,41	3,47	3,74	3,49	46,91	NS	NS
Ácidos Totais	69,02	75,62	73,87	79,66	64,16	71,59	19,02	NS	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

Estabilidade aeróbia

A avaliação da estabilidade aeróbia foi realizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, em câmara climática a 25 ± 1°C, sendo as temperaturas verificadas a cada 5 minutos durante 5 dias, por

termômetros inseridos no centro da massa de forragem. Os parâmetros de avaliação da estabilidade aeróbia foram calculados conforme proposto por O'Kiely et al. (1999) e apresentados em número de dias para elevação da temperatura da silagem em 2°C em relação a temperatura ambiente, número de dias para atingir a temperatura máxima, temperatura máxima e soma das médias diárias de temperatura nas silagens expostas ao ar de 0 a 5 dias (Tabela 15). O pH das silagens, do dia da abertura ao quinto dia de exposição aeróbia, foi determinado segundo Kung Jr. et al. (1984) (Tabela 16).

Embora após 5 dias de exposição os ácidos orgânicos tenham sido nivelados, as silagens transgênicas tiveram maior estabilidade aeróbia até 48 horas (Balieiro et al., 2010b). Isto ocorreu provavelmente devido ao maior teor de acetato que tem efeito antifúngico e ao efeito antifúngico da toxina *Bt* retardando o consumo de ácidos orgânicos como o lático, que mantém o pH baixo. Entre 32 e 48 horas após abertura do silo as silagens de milho *Bt* mantiveram menores valores de pH por mais tempo, devido a maior quantidade de ácidos orgânicos naquele momento que, por sua vez, é resultado do menor consumo dos mesmos por fungos (Tabela 16). Silagens transgênicas demoraram mais para atingir 2°C acima da temperatura ambiente após abertura do silo, demonstrando menor geração de calor por atividades microbianas indesejáveis e maior estabilidade aeróbia (Tabela 15).

Tabela 15 Variáveis de temperatura associadas à estabilidade aeróbia de silagens de milhos contendo o gene *cry1Ab* e das silagens de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*

	<u>Efeito Principal</u>		<u>Interações</u>				<u>CV</u>	<u>Probabilidade</u>	
	<u>não <i>Bt</i></u>	<u><i>Bt</i></u>	<u>DKB 390</u>		<u>AG 8088</u>			<u><i>Bt</i></u>	<u>Interação</u>
			<u>não <i>Bt</i></u>	<u><i>Bt</i></u>	<u>não <i>Bt</i></u>	<u><i>Bt</i></u>			
T máx (°C)	43,42	41,05	43,85	41,63	42,99	40,47	6,50	NS	NS
h T máxima	28,25	32,18	27,29 ^{bc}	26,80 ^c	29,20^b	37,57^a	15,89	NS	--
h T>2°C	18,97^b	27,16^a	17,33	22,93	20,62	31,39	14,18	**	NS
ADITE-3	14,96	15,07	15,08	16,96	14,85	13,18	23,31	NS	NS
ADITE-5	27,09	33,65	27,32	38,21	26,87	29,09	24,57	NS	NS
TX	1,54^a	1,34^b	1,61	1,58	1,47	1,11	13,58	--	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = p>0,07; -- = p<0,07; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocerec

T máxima = temperatura máxima atingida pela silagem após exposição ao ar;

h T máxima = tempo em horas para a silagem atingir a temperatura máxima;

h T>2°C = tempo em h para elevação da temperatura da silagem em 2°C em relação à temperatura ambiente.

ADITE-3 e ADITE-5 = somatório das diferenças de temperatura das silagens e do ambiente;

TX = taxa de aquecimento (T max / h T max, em °C/h).

Tabela 16 Valores de pH de silagens de milhos contendo o gene *cry1Ab* e das silagens de suas contrapartes convencionais sem o gene *cry1Ab*

<u>Horas após abertura</u>	<u>Efeito Principal</u>		<u>Interações</u>				<u>CV</u>	<u>Probabilidade</u>	
	<u>não <i>Bt</i></u>	<u><i>Bt</i></u>	<u>DKB 390</u>		<u>AG 8088</u>			<u><i>Bt</i></u>	<u>Interação</u>
			<u>não <i>Bt</i></u>	<u><i>Bt</i></u>	<u>não <i>Bt</i></u>	<u><i>Bt</i></u>			
8,5	3,72	3,75	3,76	3,76	3,69	3,74	1,60	NS	NS
24,0	3,72	3,74	3,76	3,76	3,68	3,73	1,84	NS	NS
32,5	3,90^b	3,73^b	4,06	3,75	3,73	3,71	6,84	NS	NS
48,0	5,49^a	4,82^b	5,62	5,22	5,36	4,42	15,15	--	NS
56,5	5,54	5,27	5,67	5,81	5,41	4,72	12,91	NS	NS
72,0	5,94	6,05	6,05	6,47	5,84	5,62	9,59	NS	NS
80,5	6,06	6,31	6,08	6,67	6,04	5,96	10,10	NS	NS
96,0	6,46	6,75	6,49	7,01	6,44	6,49	8,88	NS	NS
104,5	6,53	6,82	6,59	6,93	6,48	6,71	8,92	NS	NS

120,0	6,62	6,84	6,68	6,80	6,56	6,88	7,61	NS	NS
-------	------	------	------	------	------	------	------	----	----

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%
 não *Bt* = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)
 Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = $p > 0,07$; -- = $p < 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)
Bt = *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) e Interação = Híbrido x OGM
 DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocerec

Consumo e desempenho animal

As composições químicas das silagens produzidas em silos tipo bag fornecidas aos animais foram apresentadas na Tabela 13. Para avaliação do desempenho animal a silagem de milho foi o único volumoso fornecido, sendo todas as silagens acrescidas de 35 g de sal mineral e 700 g de farelo de soja, a fim de atender às exigências minerais e protéicas de novilhas Jersey em crescimento de acordo com o NRC (1989). Num período de alimentação de 90 dias após 14 dias de adaptação à dieta, não houve efeito dos tipos de silagens sobre a ingestão de matéria seca, mas a conversão alimentar foi melhor com a utilização de híbridos transgênicos (Tabela 17).

O resultado de melhor desempenho em ganho de peso é contraditório às avaliações de desempenho em produção de leite observado por vários autores (Faust & Miller, 1997; Folmer et al., 2002; Donkin et al., 2003; Calsamiglia et al., 2007, Faust et al., 2007). Ao compararmos resultados de desempenho animal, devemos considerar que as dietas avaliadas por Calsamiglia et al. (2007) continham 45% de silagem, por Donkin et al. (2003) continham de 42 a 60% e por Faust et al. (2007) continham 30% de silagem de milho. Dessa forma as proporções de feno de alfafa e ingredientes concentrados na dieta podem diluir eventuais efeitos da silagem de milho. Cabe lembrar que mesmo que sejam utilizados grãos de milho *Bt* na ração concentrada, a concentração de toxina *Bt* no grão é muito menor que na forragem inteira. Outro fator que pode influenciar a resposta é o teor de matéria seca do milho para ensilagem. No trabalho de Faust et al. (2007) os teores de matéria seca no momento da colheita do híbrido transgênico e convencional foram de 37 e 42%, respectivamente, no trabalho de Calsamiglia et al. (2007) foram de 39,5 e 40,1 e de Donkin et al. (2003) em torno de 40%. Além disso, fatores como o tipo de silo, características dos híbridos utilizados, produção de toxina *Bt* pela planta, condições ambientais, controle de pragas e potencial produtivo dos animais também influenciam os resultados.

Contudo, Calsamiglia et al. (2007), alimentando bovinos com silagens de milho contendo a proteína Cry1Ab, observaram aumento nos teores de proteína, lactose e sólidos não gordurosos no leite, quando comparados com a silagem controle, atribuindo o efeito a uma relação inversa entre a produção e a composição do leite. De acordo com Vercesi et al. (2009) alguns autores observaram ligeira melhoria na taxa de conversão alimentar para animais alimentados com milho resistente a insetos, sendo que MacKenzie & McLean (2002) atribuíram tal efeito a uma redução de micotoxinas anti-nutritivas resultantes do ataque de insetos. A redução de micotoxinas indica redução na população de fungos uma vez que são os mesmos quem as produzem.

Neste trabalho a melhor conversão alimentar apresentada na Tabela 17 pode ser atribuída a uma conjunção de fatores, tais como: maiores teores de carboidratos não fibrosos e EE, maior enchimento dos grãos, redução das porções fibrosas FDA, FDN, NIDA e NIDN (Tabela 13) e menores perdas de nutrientes durante a ensilagem com menor produção de álcool (Tabela 13), efluentes e gás (Tabela 14) e após abertura do silo pela maior estabilidade aeróbia (Tabelas 15 e 16).

Tabela 17 Consumo e ganho de peso de novilhas Jersey alimentadas com silagens de milhos *Bt* ou com silagens de seus isogênicos próximos sem o gene *cry1Ab*

	<u>Efeito Principal</u>		<u>Interações</u>				<u>CV</u>	<u>Probabilidade</u>	
	<u>não Bt</u>	<u>Bt</u>	<u>DKB 390</u>		<u>AG 8088</u>			<u>Bt</u>	<u>Interação</u>
			<u>não Bt</u>	<u>Bt</u>	<u>não Bt</u>	<u>Bt</u>			
CMS kg/dia	3,36	3,31	3,42	3,17	3,29	3,46	12,47	NS	NS
CMS % PV	2,458	2,366	2,47	2,26	2,44	2,46	6,64	NS	NS
g/kg de PV	24,58	23,66	24,76	22,63	24,40	24,68	6,63	NS	NS
g/kg PV ^{0,75}	84,01	81,31	84,85	77,72	83,16	84,90	7,647	NS	NS
Ganho g/dia	0,533	0,700	0,544	0,723	0,521	0,678	30,58	NS	NS
Ganho total	14,930	19,625	15,25	20,25	14,61	19,00	30,55	NS	NS
Conversão	6,376^a	4,804^b	6,547	4,340	6,205	5,269	27,22	--	NS

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%

não Bt = isogênicos próximos de DKB 390 ou AG 8088 que não contem o gene *cry1Ab* (contraparte convencional)

Probabilidade = resultado da análise de variância (NS = p>0,07; -- = p<0,07; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

Bt = *Bacillus thuringiensis* (Bt) e Interação = Híbrido x OGM

DKB 390 = híbrido de milho da Dekalb; AG 8088 = híbrido de milho da Agrocere

CMS = consumo de matéria seca; ganho = ganho de peso; conversão = conversão alimentar

Análise econômica

A análise econômica teve como objetivo comparar as silagens e, portanto, não houve necessidade de contabilizar custos em comum para todas elas. Os cálculos foram realizados para um hectare de lavoura de milho considerando-se os valores das sementes transgênicas ou convencionais, acrescidos dos custos com inseticida, mão-de-obra e hora trator/ha. O gasto com a mão-de-obra para aplicação do inseticida foi de R\$ 18,00 a diária, como a pulverização de um hectare foi feita em 0,8 h, o custo ficou em R\$ 1,80/ha. O custo da hora trator foi de R\$ 35,00 por hora, com o tempo de pulverização de 0,8 h/ha, o custo foi de R\$ 28,00/ha.

Em seguida, descontou-se da produção de massa da lavoura a perda durante o processo fermentativo sendo obtida a quantidade de silagem disponível para alimentação dos animais (Tabela 18). Com a quantidade total de silagem dividida por 150 dias, período seco em que há necessidade de suplementação volumosa, e posteriormente dividida pelo consumo das novilhas para cada silagem, foi obtido o número de novilhas que seriam alimentadas no período de 150 dias pela produção de um ha de milho (animais/ha 150 dias). O ganho de peso vivo em g/dia foi multiplicado pelo número de animais e por 150 dias para obtenção do ganho de peso total em kg/ha (GPV Total kg/ha). O custo da semente transgênica ou convencional acrescido dos custos com a aplicação do inseticida, mão-de-obra e hora trator/ha foi dividido pelo ganho de peso vivo total obtendo-se o custo por kg de peso vivo ganho (R\$/kg de PV). Considerando todos os demais custos semelhantes, observou-se menor custo por kg de peso vivo ganho utilizando-se silagem com milho Bt (Tabela 18).

Os benefícios obtidos com o maior ganho de peso ocorrem no sistema de produção como um todo, a curto e longo prazo, de acordo com a finalidade da exploração. Para as novilhas leiteiras a antecipação da idade ao primeiro parto e da vida produtiva do animal causaria impacto econômico em termos de produção de leite e bezerras para reposição. Uma análise da relação entre custo e benefício da utilização das silagens com milho Bt a curto prazo, utilizando como exemplo a venda dos animais no final do período seco pelo preço da arroba do boi, é apresentada na Tabela 18. Para tanto, a diferença entre o ganho de peso total por hectare entre os híbridos convencionais e transgênicos foi dividida por 30 transformando o incremento em kg de peso vivo para arroba, considerando-se um rendimento de carcaça de 50%, e posteriormente, multiplicou-se por R\$ 86,00, que era o preço da arroba na época. O valor encontrado representa a vantagem econômica da silagem com milho Bt em relação à silagem convencional nas circunstâncias em que o trabalho foi conduzido (Tabela 18).

Tabela 18 Custo benefício na produção de silagem com milho *Bt*

	DKB 390		AG 8088	
	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>	não <i>Bt</i>	<i>Bt</i>
R\$ semente/ha	247,43	333,44	234,00	316,76
Deltametrina/ha	25,20	-	25,20	-
Mão-de-obra	1,80	-	1,80	-
Hora-trator/ha	28,00	-	28,00	-
Total	302,43	333,44	289,00	316,76
Produção lavoura (t/ha)	11,23	12,75	13,32	13,77
Recuperação de MS (%)	90,27	91,02	89,56	90,11
Produção silagem (t/ha)	10,13	11,60	11,92	12,40
Consumo (kg/dia)	3,42	3,17	3,29	3,46
Animais/ha 150 dias	19,74	24,39	24,15	23,89
GPV g/dia	544	723	521	678
GPV Total kg/ha	1.611	2.645	1.887	2.429
R\$ kg/GPV	0,187	0,126	0,153	0,130
Diferença R\$/ha (@=R\$86,00)		+R\$ 2.964,13		+R\$ 1.553,73

Considerações adicionais

O efeito antifúngico da toxina *Bt* na silagem abre novas perspectivas para a solução de problemas na exploração agropecuária e traz novas abordagens de estudos quanto a possíveis problemas de natureza ecológica. Seria interessante que os resíduos vegetais das plantas, após o planto direto, pudessem ter também ação contra fungos fitopatogênicos no solo, uma vez que o cristal protéico se liga rapidamente aos minerais de argila do solo e fica protegido da degradação microbiana (Tapp e Stotzky, 1995), permanecendo ativo por até 234 dias (Saxena et al., 1999). Segundo Batista Junior et al. (2002) quando as plantas transgênicas se decompõem podem liberar a toxina *Bt* da raiz, do pólen e das partes vegetativas. Por outro lado, há necessidade de avaliar o efeito da toxina *Bt* sobre microrganismos integrantes de grupos funcionais do solo, tais como fungos filamentosos saprófitos e simbióticos. Uma atividade antifúngica sobre os micorrízicos e contra as bactérias do gênero *Rhizobium*, por exemplo, causaria grande impacto na ciclagem de nutrientes no solo e na nutrição das plantas.

Considerações finais

A maioria dos efeitos da introdução do gene *cry1Ab* foi atribuída à redução nos danos provocados pelas lagartas e, assim, variam de acordo com o nível de infestação e controle de lagartas, resistência natural do híbrido, duração de ciclo, exigências da cultura etc. Por outro lado, a redução na produção de gás e efluentes, alteração dos teores de ácidos orgânicos e principalmente redução na população de leveduras não parecem associadas aos danos por pragas. Dessa forma, os efeitos da introdução do gene *cry1Ab* sobre o crescimento da planta, produção e participação de grãos na massa podem ser nivelados com a colheita mais tardia dos híbridos convencionais ou com maior número de pulverizações com inseticidas na lavoura, enquanto os efeitos da introdução do gene *cry1Ab* sobre os ácidos orgânicos e leveduras podem ocorrer mesmo com menores danos por pragas nas plantas convencionais. Essas ocorrências, embora possam variar com o tipo de silo, independem do nível de infestação por pragas e representam uma importante ferramenta para reduzir perdas de matéria seca, melhorar a qualidade da silagem e obter maior retorno econômico com a atividade pecuária.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios financeiros. À Prof. Dra. Maria Ivone Esteves da Clara responsável pelo Laboratório de Virologia do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, Portugal, ao Prof. Dr. Augusto Antônio Vieira Peixe responsável pelo Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal e ao Prof. Dr. Alfredo Manuel Franco Pereira (DZOO/EU) pela acolhida, orientação e apoio técnico. Aos alunos de pós-graduação Érika Breda Canova, Heverton Luiz Moreira e Ricardo Galbiatti Sandoval Nogueira pela contribuição na condução dos experimentos.

Referências Bibliográficas

ABEL C.A. & ADAMCZYK J.J. Jr. Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. **Journal of Economic Entomology**, v.97, p.1737-1744, 2004.

AGBIOS (2002) MON 810 Safety assessment of YieldGard insect-protected event MON810. Published by agbios.com as Product Savety Description <http://agbios.com/docroot/decdocs/02-269-010.pdf>

AKIN, D.E. Association of rumen fungi with various forage grasses. **Animal Feed Science and Technology**, v.16, p. 273-285, 1987.

AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION. A report: committee on classification of particle size in feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.53, n.5, p.689-690, 1970.

AVISAR, D. et al. The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. **Plant Science**, v.176, p.315-324, 2009.

AZÉKÁCS, A. et al. Detection of Cry1Ab toxin in the lives of MON 810 transgenic maize. **Analytical and Bionalytical Chemistry**. v.396, p.2203-2211, 2010.

BAKAN, B. et al. Fungal growth and *fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 728-731, 2002.

BALIEIRO, G.N. et al. Monensin and protein supplements on methane production and rúmen protozoa in bovine fed low quality forage. **South African Journal of Animal Science**, v.39, p. 280-283, 2009.

BALIEIRO, G.N. & MELLOTI, L. Produção de ácidos graxos voláteis e contagem de protozoários ruminais em bovinos suplementados com gordura. **Braz. Journal Vet. Res Anim. Sci.**, v.44, n.2, p.115-121, 2007.

BALIEIRO, G.N. et al. Composição da espiga e folha e nutrientes digestíveis totais de híbridos de milho contendo o gene *cry1Ab* versus seus isogênicos sem o gene *cry1Ab*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47, 2010, Salvador - BA. **Anais...** Salvador, 2010a. (CD ROM).

BALIEIRO, G.N. et al. Estabilidade aeróbia de silagens de híbridos de milho contendo o gene *cry1Ab* versus seus isogênicos sem o gene *cry1Ab*. In: REUNIÃO

ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47, 2010, Salvador - BA. **Anais...** Salvador, 2010b. (CD ROM).

BALIEIRO, G.N. et al. Voluntary intake and apparent digestibility of lambs fed silage from maize hybrids with the *cry1Ab* trait versus its nonbiotech counterpart. In: INTERNATIONAL CONFERENCE 'ADAPTING ANIMAL PRODUCTION TO CHANGES FOR A GROWING HUMAN POPULATION', 2010, Lleida, Spain. **Proceedings...**Lleida: Universitat de Lleida e Iowa State University, 2010c, p.3. <http://www.aap2010.udl.cat/>.

BALIEIRO, G.N. et al. Infestation, production and morphologic characteristic of corn hybrid containing the gene *cry1Ab*. In: International Conference 'Adapting Animal Production to Changes for a Growing Human Population', 2010, Lleida. **Proceedings...**Lleida, Spain: Universitat de Lleida e Iowa State University, 2010d, p.11. <http://www.aap2010.udl.cat/>.

BALIEIRO, G.N. et al. Composition of the whole plant and silage from maize hybrids with the *cry1Ab* trait versus its nonbiotech counterpart. In: ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION, 61, 2010, Greece. **Proceedings...** Heraklion, Crete Island, Greece: Wageningen Academic Publishers, 2010e, p.363.

BALIEIRO, G.N. et al. Effects of *cry1ab* gene on rumen protozoa in lambs. In: ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION, 61, 2010, Greece. **Proceedings...** Heraklion, Crete Island, Greece: Wageningen Academic Publishers, 2010f, p.75.

BATISTA JUNIOR, C.B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.8, p.1189-1194, 2002.

BERNARDES, T.F. et al. Estabilidade aeróbia da ração total e das silagens de capim- Marandu submetidas a inclusão de aditivos bacterianos e químico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, 2007.

CALSAMIGLIA, S. et al. Effects of corn silage derived from genetically modified variety containing two transgenes on feed intake, milk production, and composition, and the absence of detectable transgenic deoxyribonucleic acid in milk in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4718-4723, 2007.

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.

DEMEYER, D. I.; VAN NEVEL, C. J. Transformations and effects of lipids in the rumen: Three decades of research at gent university. **Archive Animal Nutrition**, v.48, p. 119-134, 1995.

DONKIN, S.S. et al. Effects of feeding silage and grain from glyphosate-tolerant or insectprotected corn hybrids on feed intake, ruminal digestion, and milk production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.5, p.1780-1788, 2003.

EBERHART, H. F. An empirical law describing heterogeneity in the yields of agricultural crops. **Journal Agricultural Science**, Camberra, n.28, p.1-23, 1995.

FAUST, M. & L. MILLER. 1997. **Study finds no *Bt* in milk.** Iowa State University Integrated Crop Manage. Newsl./ IC-478, Special Livestock Edition, Ames, IA, pp 6-7.

FAUST, M. A. & S. M. SPANGLER. Nutritive value of silages from MON810 Bt and non-Bt near-isogenic corn hybrids. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1184. (Abstr.), 2000.

FAUST, M. A. 1999. **Research update on *Bt* corn silage.** In: Four State Applied Nutr. Manage. Conf. Midwest Plan Service, Ames, IA, p157-164.

FAUST, M. et al. Performance of lactating dairy cows fed silage and grain from a maize hybrid with the cry1F trait versus its nonbiotech counterpart. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.12, p.5706-5713, 2007.

FLACHOWSKY, G. et al. Fibre analysis and in sacco degradability of plant fractions of two corn varieties harvest and various times. **Animal Feed Science and Technology**, v.43, p.41-50, 1993.

FLACHOWSKY, G.; CHESSON, A.; AULRICH, K. Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. **Archives of Animal Nutrition**, v.59, p.1-40, 2005.

FOLMER, J.D. et al. Utilization of Bt corn residues by grazing beef steers and Bt corn silage and grain by growing beef cattle and lactating dairy cows. **Journal Animal Science**, v.80, p.1352-1361, 2002.

GIARDINI, A. et al. Effect of maize silage harvest stage on yield, plant composition and fermentation losses. **Animal Feed Science and Technology**. v.1, p.313-326, 1976.

GRENET, E. et al. Kinetics study of the degradation of wheat straw and maize stem by pure cultures of anaerobic fungi observed by scanning electron microscopy. **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v.2, p.456-457, 1989.

HEINRICHS, J. **Evaluating particle size of forages and TMRs using the Penn State Particle size separator.** Penn State: College of Agricultural Sciences at Penn State University, 1996.

HO, Y.W. et al. *Anaeromyces*, an earlier name for *Ruminomyces*. **Mycotaxon**, v. 47, p.283-293, 1993.

IKWUEGBU, O. A.; SUTTON, J. D. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. **Br. J. Nutr.** 48: 365, 1982.

JOBIM, C.C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.101-119, 2007.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, p.125-135, 2005.

KIM, D.; COOK, R. J.; WELLER, D. M. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.87, p.551-558, 1997.

KUNG Jr. L. et al. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfafa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.299-306, 1984.

LACAZ, R.L. & MUNARI, D.P. 1992. Microbiologia da Silagem. In: **Microbiologia Zootécnica**, Roca, 314p.

MACKENZIE, D.; MCLEAN, M. Who's afraid of GM feed? **Feed Mix**, v.10, n.3, p.16-19, 2002.

MAGALHÃES, A.L.R. et al. Cana-de-açúcar em substituição a silagem de milho em dietas para vacas em lactação: desempenho e viabilidade econômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, p.1292-1302, 2004.

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.

NRC, 1989. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. National Academy of Science, ed. National Academy Press, Washington, DC.

NRC, 2001. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. National Academy of Science, 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.

O'KIELY, P. et al. Maximizing output of beef within cost efficient, environmentally compatible forage conservation systems. Dunsany: Grange Research Centre. 1999, 64p. (**Beef Productions Series, 10**).

PHIPPS, R. H.; EINSPANIER, R.; FAUST, M.A. Safety of meat, milk and eggs from animals fed crops derived from modern biotechnology. **Council for Agricultural Science and Technology (CAST)**, Issue paper 34, CAST, Ames, IA, 2006.

PODILE, A. R. & LAXMI, V. D. V. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia-lyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, p. 255-259, 1998.

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v.104, p.1109-1112, 1994.

SANDERS, P. R. et al. Safety assessment of insect-protected corn. In: THOMAS, J. A. **Biotechnology and Safety Assessment**. 2 ed. Taylor and Francis, 1998. p. 241-256

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. **Nature**, London, v.402, p.480, 1999.

SINGHAL, K. K. et al. Effect of feeding cottonseed produced from Bollard II cotton on feed intake, milk production, and milk composition in lactating crossbred cows. **Proceedings... ASIAN-AUSTRALASIAN JOURNAL ANIMAL SCIENCE CONGRESS**, X11, Pusan, Korea: Korean Soc. Anim. Prod., Seoul, Korea, 2006, p.757.

STASKAWICZ, B. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v.268, p.661-667, 1995.

TAPP, H. & STOTZKY, G. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1786-1790, 1995.

VALADARES-INGLIS, M. C.; SOUZA, M. T. de; SHILER, W. **Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico**. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v.1, p.208-217.

Van SOEST. Preharvest factors influencing quality of conserved forage. **Journal of Animal Science**, v.47, n.3, 1978.

VERCESI, A.E.; RAVAGNANI, F.G.; DI CIERI, L. Uso de ingredientes provenientes de OGM em rações e seu impacto na produção de alimentos de origem animal para humanos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n especial, 2009.

VOLPE, G. et al. 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.

WIEDEMANN, S. et al. In situ studies on the time-dependent degradation of recombinant corn DNA and protein in the bovine rumen. **Journal Animal Science**, v.84, p.135-144, 2006.

WILLIAMS, A. G. & COLEMAN, G. S., 1997. The rumen protozoa. In: Hobson, P. N.; Stewart, C. S. (Eds.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic, v.2, p.73-139.

WILLIAMS, W. P. & DAVIS, F. M. Response of corn to artificial infestation with fall armyworm and southwestern corn borer larvae. **Southwest. Entomol.** v.15, p.163-166, 1990.