

QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CRY1AB EM FOLHAS, CAULES E GRÃOS DE DOIS HÍBRIDOS DE MILHO *BTE* E CONTROLE DAS PRAGAS *SPODOPTERA FRUGIPERDA* E *HELICOVERPA ZEA* ⁽¹⁾

Geraldo Balieiro Neto⁽²⁾, Terezinha Monteiro dos Santos Cividanes⁽²⁾, Roberto Botelho Branco⁽²⁾, Maria do Rosário Fernandes Felix⁽³⁾, Fernando Manuel de Campos Trindade Rei⁽³⁾, José Ramos Nogueira⁽²⁾

RESUMO

Procedeu-se à avaliação do nível de infestação e respectivos danos associados à presença das lagartas *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*, nos híbridos Dekalb DKB390 e Agrocere AG8088, que expressam a proteína Cry1Ab. O delineamento foi em blocos casualizados, com dois fatores (híbrido e gene *cry1Ab*). A concentração da proteína Cry1Ab foi determinada pela técnica ELISA em caules, folhas e grãos dos milhos OGM. Em média, a concentração da proteína associada ao gene *cry1Ab* foi superior nas folhas e caules em comparação com a concentração presente nos grãos e, em média, superior no milho OGM AG8088 relativamente ao milho OGM DKB390. Não foram encontradas diferenças no nível de danos causados por lagartas de *H. zea* no milho AG8088 OGM e NOGM, após 71, 78 e 85 dias da semeadura. Conclui-se que embora os milhos OGM tenham sido eficientes na limitação das duas pragas, foram mais eficientes na limitação de *S. frugiperda* em comparação com *H. zea* resultado que estará associado à maior concentração da proteína nas folhas e caules, em comparação com a existente no grão. O teste ELISA foi eficiente na quantificação da proteína Cry1Ab em tecidos vegetais de milho.

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

CRY1AB PROTEIN QUANTIFICATION IN LEAVES, STEMS AND GRAINS, AND EFFECTIVENESS TO CONTROL *SPODOPTERA FRUGIPERDA* AND *HELICOVERPA ZEA* ON TWO HYBRIDS OF GENETICALLY MODIFIED CORN

SUMMARY

A study was carried out to evaluate the infestation and associated damages to the presence of the *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* caterpillars, in two genetically modified (GM) corn, Dekalb DKB390 and Agrocere AG8088, expressing the *cry1Ab* protein. For this objective, a split-plot design with two factors (hybrid x gene). The concentration of the protein Cry1Ab was determined by the ELISA technique in stems, leaves and grains of GM corns. On average, the concentration of

⁽¹⁾ Pesquisa financiada pela FAPESP ⁽²⁾ Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Avenida Bandeirantes 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP. geraldobalieiro@apta.sp.gov.br, jrn@apta.sp.gov.br, branco@apta.sp.gov.br, terezinha@apta.sp.gov.br ⁽³⁾ Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal. frei@uevora.pt, mrf@uevora.pt

Cry1Ab protein was significantly superior in leaves and stems in comparison with the grain and, on average, superior in the GM AG8088 corn comparatively to GM DKB390 corn. No differences were found on level damages caused by caterpillars of *H. zea* in GM and NoGM AG8088 corns, after 71, 78 and 85 days of sowing. In conclusion, GM corns were more efficient in the limitation of *S. frugiperda* in comparison with *H. zea*, a result that can be associated to the largest Cry1Ab protein concentration observed in leafs and stems in comparison to the existent in the grain. Also, ELISA technique proved to be very efficient in Cry1Ab protein quantification on corn.

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

INTRODUÇÃO

Os resultados relativos à concentração da toxina *Bt* são controversos, pois vários autores encontraram variações nas concentrações das toxinas *Bt* em comparação com os dados publicados pela Monsanto (2002). Há uma ausência quase completa de informações sobre a expressão da proteína Cry1Ab nos eventos MON 810[®], em diferentes estádios de crescimento da planta. Contudo, as análises comumente realizadas informam somente se a proteína existe ou não nas plantas OGM da amostra, não havendo no momento um protocolo padrão para a determinação da concentração da proteína Cry1Ab. O objetivo deste trabalho foi avaliar a infestação natural e os danos provocados pelas lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) em híbridos de milho DKB390 e AG8088 contendo o gene *cry1Ab* e nos seus respectivos pares convencionais, bem como a determinação da concentração de proteína Cry1Ab pelo teste ELISA, no colmo, folhas e grãos de cada um dos híbridos em teste.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio experimental foi realizado no Polo Regional Centro Leste da APTA. foi realizada uma única aplicação de deltametrina a 2,8%, aos 40 dias após a semeadura, nos talhões de milho convencional (NOGM), enquanto que nenhuma aplicação de inseticida foi realizada nos talhões de milho geneticamente modificado (OGM). Foi utilizado um delineamento experimental em blocos ao acaso com um arranjo fatorial 2 x 2, com cinco repetições. Os fatores em teste foram a cultivar (AG8088 e DKB390) e a presença/ausência da proteína Cry1Ab.

Foram realizadas avaliações da infestação e dos danos associados à presença da lagarta-do-cartucho nos dias 15, 22, 29, 36 e 42 dias após a semeadura correspondendo aos estádios fenológicos entre V3 e V8. Em cada avaliação foram colhidas cinco plantas por parcela totalizando 25 plantas por tratamento e observada a quantidade e o tamanho das lagartas. Para a avaliação dos danos foi utilizada uma escala com cinco níveis, de acordo com Carvalho (1970). As avaliações do nível de

⁽¹⁾ Pesquisa financiada pela FAPESP ⁽²⁾ Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Avenida Bandeirantes 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP. geraldoballeiro@apta.sp.gov.br, jrn@apta.sp.gov.br, branco@apta.sp.gov.br, terezinha@apta.sp.gov.br ⁽³⁾ Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal. frei@uevora.pt, mrff@uevora.pt

infestação e respectivos danos provocados pela lagarta-da-espiga foram realizadas nos dias sete 57, 71, 78 e 85 dias após a semeadura, abrangendo os estádios fenológicos entre V12 e R4. A cada avaliação foram colhidas igualmente cinco plantas por parcela totalizando 25 plantas por tratamento. Para avaliação de danos foi utilizada a escala proposta por Widstrom (1967). Na última avaliação da infestação pela lagarta-da-espiga, ocorrida no estágio fenológico R4, procedeu-se à amostragem de folhas, colmos e grãos de plantas de milho OGM dos dois híbridos, que foram imediatamente congelados. No dia seguinte as amostras foram submetidas ao processo de secagem por liofilização. As amostras liofilizadas, depois de moídas, foram analisadas quanto à concentração da proteína Cry1Ab no Laboratório de Virologia do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, Portugal. O método utilizado para detecção da proteína Cry1Ab em sementes e folhas foi o teste ELISA através do kit AP-003-CRBS da Envirologix[®]. Para o teste quantitativo, foi realizada uma curva de calibração diluindo-se a concentração de 50 g/kg de proteína Cry1Ab fornecida pela European Commision Joint Research Centre. A transformação da porcentagem de OGM para ng/g de proteína Cry1Ab foi realizada utilizando-se a equação obtida por Volpe *et al.* (2006) ($y = 2,06x + 0,01$, $R^2 = 97$). Os valores de leitura em espectrofotômetro das folhas e colmos de milhos OGM foram subtraídos dos valores de leitura das amostras NOGM de colmo e folhas dos mesmos híbridos, utilizadas como controles negativos. No caso do grão, tendo sido constatada a presença da proteína Cry1Ab nos milhos NOGM, subtraiu-se do valor das leituras das amostras OGM, o valor da leitura do controle negativo (NOGM). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo módulo PROC GLM do SAS (1985) e a interação entre transgenia e híbridos foi desdobrada comparando-se a transgenia dentro de cada híbrido. Médias do nível de infestação, danos e concentração da proteína Cry1Ab foram comparadas pelos testes Kruskal-Wallis, Mann-Whitman U e Tukey, respectivamente, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não se verificou interação significativa entre milhos NOGM e entre OGM quanto ao número ou tamanho das lagartas encontradas nas plantas e danos associados (Tabela 1), ou entre os danos avaliados a cada período de observação (Figura 1). Contudo, os híbridos OGM não foram plenamente eficientes na limitação de *H. zea*, tendo-se verificado uma interação significativa entre milhos OGM e entre NOGM. Efetivamente o híbrido AG8088 NOGM registrou menor número de lagartas menores que 15 mm que o híbrido DKB390 NOGM (Tabela 2). Não houve diferença significativa do número de lagartas menores que 15 mm entre milhos OGM e NOGM (Tabela 2). Todavia a proteína Cry1Ab foi eficaz na redução do número de lagartas maiores que 15 mm e dano associado na espiga dos milhos OGM (Tabela 2). Provavelmente, as lagartas menores que 15 mm sofrem apenas redução de biomassa e não no número de lagartas e, posteriormente, seriam intoxicadas de forma letal, ocasionado menor número de lagartas maiores que 15 mm. De acordo com Mendes *et al.* (2011), a proteína Cry1Ab causa baixa mortalidade nas lagartas,

(¹) Pesquisa financiada pela FAPESP (²) Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Avenida Bandeirantes 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP. geraldoballeiro@apta.sp.gov.br, jrn@apta.sp.gov.br, branco@apta.sp.gov.br, terezinha@apta.sp.gov.br (³) Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal. frei@uevora.pt, mrff@uevora.pt

no entanto causa redução da biomassa das lagartas, o que pode ter contribuído com a ausência de diferenças significativas nos insetos menores que 15 mm.

Nas avaliações após 57 dias da semeadura os milhos OGM dos dois híbridos tiveram menores danos causados pela Lagarta-da-espiga, no entanto, nas avaliações aos 71, 78 e 85 dias de idade somente o híbrido DKB390 teve diferença significativa entre milhos OGM e NOGM (Figura 2). Relativamente o híbrido AG8088, com a percentagem de incidência da Lagarta-da-espiga de 56% em milhos NOGM e de 35% nos milhos OGM, a vantagem associada ao milho geneticamente modificada não é muito evidente quanto aos danos provocados pela Lagarta-da-espiga. Isso pode ter ocorrido em função da menor expressão da proteína Cry1Ab no grão.

O menor efeito da proteína Cry1Ab no controle da Lagarta-da-espiga quando comparado com o controle verificado da Lagarta-do-cartucho, foi coerente com a menor concentração da toxina Cry1Ab no grão em comparação com a sua concentração na folha (Tabela 3). Além disso, a ausência de efeito entre os híbridos OGM e NOGM do híbrido AG8088, foi coerente com a menor concentração da toxina Cry1Ab no grão dos milhos OGM AG8088 quando comparado os milhos OGM DKB390 (Tabela 3). Como a expressão do gene *cry1Ab* pode ser influenciada por vários fatores tais como o estágio fisiológico da planta e interações entre ambiente e genótipo, são espectáveis diferenças nas concentrações de toxina em diferentes híbridos. Os valores das concentrações de proteína Cry1Ab nas folhas, no estágio fenológico R4, foram coerentes aos mencionados pela AGBIOS (2002) de 7,93 a 10,34 ug/g de tecido fresco e aos encontrados por Székács *et al.* (2010), entre 4,82 e 10,05 ug/g de tecido fresco (Tabela 3). Os valores de concentração da proteína Cry1Ab nos grãos são condizentes com os valores encontrados por Sanders *et al.* (1998), nomeadamente entre 0,31 e 0,57 ug/g de tecido fresco. Todavia, os valores de concentração da proteína Cry1Ab no colmo estiveram acima do limite superior de 2,61 ug/g de tecido fresco em colmos encontrado por Nguyen & Jehle (2007) (Tabela 3). Considerando que atualmente não existe um protocolo padrão para análise da concentração da proteína *Bt* e que esse fato dificulta a replicação e comparação de resultados, a coerência dos resultados e eficiência do método ELISA, utilizado para quantificar a toxina Cry1Ab neste trabalho, demonstram inequivocamente que o mesmo protocolo pode ser adotado em outras pesquisas.

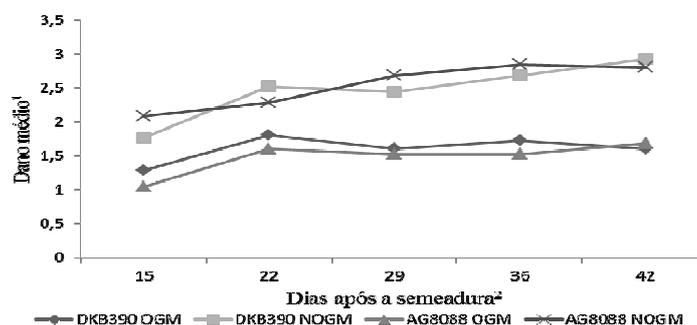
Tabela 1. Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* por planta e dano associado, em dois híbridos de milho, convencionais e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) (Transgênico), contados aos dias 15, 22, 29, 36 e 42 após a semeadura.

	Natural				OGM							
	DKB		AG		DKB		AG		Natural	OGM		
	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE	SE				
<15mm	0.67 ^a	±0.08	0.60 ^a	±0.07	0.23 ^a	±0.05	0.11 ^a	±0.03	0.64 ^a	±0.05	0.17 ^b	±0.03
>15mm	0.18 ^a	±0.04	0.19 ^a	±0.04	0.02 ^a	±0.01	0.04 ^a	±0.02	0.18 ^a	±0.03	0.03 ^b	±0.01
Dano	2.46 ^a	±0.07	2.53 ^a	±0.08	1.60 ^a	±0.07	1.47 ^a	±0.06	2.50 ^a	±0.05	1.54 ^b	±0.04

(¹) Pesquisa financiada pela FAPESP (²) Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Avenida Bandeirantes 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP. geraldobalheiro@apta.sp.gov.br, jrn@apta.sp.gov.br, branco@apta.sp.gov.br, terezinha@apta.sp.gov.br (³) Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal. frei@uevora.pt, mrf@uevora.pt

Médias com letra diferente são significativamente diferentes ($p < 0.005$; $*p < 0.0001$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis

Figura 1. Danos associados a lagartas de *Spodoptera frugiperda* presentes em dois híbridos de milho (DBK390 e AG8088), convencionais (NOGM) e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) (OGM), aos dias 15, 22, 29, 36 e 42 após a semeadura.



(¹) Média do dano verificado em cada data de observação segundo uma escala de danos de 0 a 5 correspondendo a: 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 e 5 - plantas mortas (Carvalho, 1970). (²) Ensaio em blocos casualizados, média de 25 plantas por tratamento.

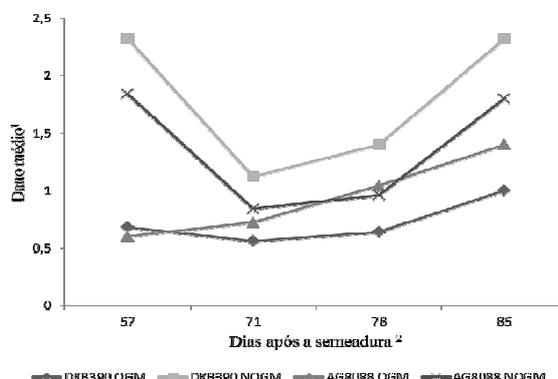
Tabela 2. Número de lagartas de *Helicoverpa zea* por planta e dano associado, em dois híbridos de milho, convencionais e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) (Transgênico), contados nos dias 57, 71, 78 e 85 após a semeadura.

	Natural				OGM			
	DKB	AG	DKB	AG	Natural	OGM	DKB	AG
<15mm	0.76 ^a	0.56 ^b	0.49 ^a	0.45 ^a	0.66 ^a	0.47 ^a	0.49 ^a	0.45 ^a
>15mm	0.44 ^a	0.30 ^a	0.14 ^a	0.16 ^a	0.37 ^a	0.15 ^b	0.14 ^a	0.16 ^a
Dano	1.79 ^a	1.36 ^b	0.72 ^a	0.94 ^a	1.58 ^{a*}	0.83 ^{b*}	0.72 ^a	0.94 ^a

Médias com letra diferente são significativamente diferentes ($p < 0.005$; $*p < 0.0001$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis

Figura 2. Danos associados a lagartas de *Helicoverpa zea* presentes em dois híbridos de milho (DBK390 e AG8088), convencionais (NOGM) e geneticamente modificados com o gene de *Bacillus thuringiensis* (*cry1Ab*) (OGM), aos dias 57, 71, 78 e 85 após a semeadura.

(¹) Pesquisa financiada pela FAPESP (²) Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Avenida Bandeirantes 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP. geraldobalheiro@apta.sp.gov.br, jrn@apta.sp.gov.br, branco@apta.sp.gov.br, terezinha@apta.sp.gov.br (³) Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal. frei@uevora.pt, mrff@uevora.pt



(1) Média do dano verificado em cada data de observação segundo uma escala de danos de 0 a 4 correspondendo a: 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 e 4 - o inseto penetrou até o sabugo, não se aprofundando mais que 3 cm (Widstrom, 1967).⁽²⁾ Ensaio em blocos casualizados, média de 25 plantas por tratamento.

Tabela 5. 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	Desvio	Std Error	Mínimo	Máximo	Anova
AG 8088	8,764 ^a	0,254	0,084	8,34	9,16	p<,0001
DKB 390	7,361 ^b	0,442	0,147	6,60	7,89	
Colmo (ug/g de tecido fresco)						
	Média	Desvio	Std Error	Mínimo	Máximo	Anova
AG 8088	5,695 ^a	0,438	0,146	5,06	6,27	p=0,450
DKB 390	5,558 ^a	0,301	0,100	5,16	6,12	
Grão (ug/g de tecido fresco)						
	Média	Desvio	Std Error	Mínimo	Máximo	Anova
AG 8088	0,326 ^b	0,068	0,022	0,23	0,42	p=0,039
DKB 390	0,419 ^a	0,103	0,034	0,31	0,59	

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa

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

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

CONCLUSÃO

Os híbridos de milho *Bt* expressando a proteína Cry1Ab foram eficientes na limitação da praga *S. frugiperda*. No entanto, relativamente a *H. zea*, a eficiência é reduzida em função da menor expressão do gene *cry1Ab* nos grãos dos milhos geneticamente modificados testados. As concentrações da proteína Cry1Ab na folha

⁽¹⁾ Pesquisa financiada pela FAPESP ⁽²⁾ Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Avenida Bandeirantes 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP. geraldobalheiro@apta.sp.gov.br, jrn@apta.sp.gov.br, branco@apta.sp.gov.br, terezinha@apta.sp.gov.br ⁽³⁾ Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal. frei@uevora.pt, mrff@uevora.pt

e grão foram coerentes com os danos provocados pelas duas pragas em avaliação indicando a eficiência do método utilizado para quantificar a proteína Cry1Ab em milhos geneticamente modificados.

LITERATURA CITADA

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.

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.

⁽¹⁾ Pesquisa financiada pela FAPESP ⁽²⁾ Pesquisador Científico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Avenida Bandeirantes 2419, CEP 14030-670, Ribeirão Preto, SP. geraldobalheiro@apta.sp.gov.br, jrn@apta.sp.gov.br, branco@apta.sp.gov.br, terezinha@apta.sp.gov.br ⁽³⁾ Prof. Dr. Auxiliar do Departamento de Fitotecnia do ICAAM / Universidade de Évora, Portugal. frei@uevora.pt, mrf@uevora.pt