

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BACILLUS THURINGIENSIS EM PLANTAS TRANSGÊNICAS NO CONTROLE DE PRAGAS

L.F.A. Alves

Depto. de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, CEP 85814-110, Cascavel, PR, Brasil.

RESUMO

É feita uma abordagem sobre plantas transgênicas que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas, desde o início do seu desenvolvimento. Abrangem-se as técnicas para sua obtenção, avaliações em laboratório e campo de diferentes culturas agrícolas de interesse econômico. São feitas também, considerações sobre a questão dos riscos e benefícios dessa nova tecnologia.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus thuringiensis*, plantas transgênicas, controle, insetos, pragas.

ABSTRACT

BACILLUS THURINGIENSIS IN TRANSGENIC PLANTS IN PEST CONTROL. The transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* toxins are reviewed. Historical, techniques, laboratory and field evaluations are discussed. Some aspects related to safety of this organisms to the environment are presented.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*, transgenic plants, control, insects, pest.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por alimentos e fibras têxteis torna imprescindível o aumento na produção agrícola.

Os sistemas atuais mostram-se deficientes e às vezes incapazes de atender às necessidades e os problemas tornam-se ainda mais graves quando são introduzidos nestes sistemas, organismos competidores do ser humano: patógenos e artrópodos fitófagos, sem contar outros animais como aves e roedores que também competem pelo produto final.

A necessidade de contornar tais problemas tem feito o homem buscar diferentes soluções, muitas das quais bastante eficientes e tidas como revolucionárias, como ocorreu com o advento dos agroquímicos (herbicidas, fungicidas e inseticidas).

Entretanto, o uso indevido de muitos produtos vem causando problemas graves por intoxicações diretas ao aplicar ou consumir o alimento tratado, ou por danos ao

ambiente, uma vez que muitos organismos não-alvo são também atingidos. O controle biológico tem sido proposto como uma alternativa segura e viável para muitos casos em que os produtos químicos sejam indesejáveis.

Mais recentemente, a biologia molecular tem contribuído decisivamente nesse contexto e baseado nos seus avanços (especificamente de uma das suas áreas, a engenharia genética) as plantas vêm sendo manipuladas geneticamente, de forma que são incorporadas em seu genoma, informações genéticas exógenas que lhes confere resistência às pragas.

Hoje são conhecidos diversos casos de sucesso e, no tocante ao controle de insetos, já existem plantas com genes de *Bacillus thuringiensis* cuja expressão leva à produção de d-endotoxina na planta, letal a diferentes espécies de insetos, principalmente da ordem Lepidoptera. Inclui-se ainda no controle de pragas as plantas que expressam inibidores enzimáticos, com destaque para proteases e venenos de artrópodos, sendo de obtenção mais recente.

Sem dúvida, trata-se de uma nova técnica para o incremento da produção agrícola, seja por conferir às plantas características de resistência a patógenos, insetos e condições ambientais desfavoráveis, aumento na produtividade ou introdução de uma determinada característica nutricional.

Contudo, deve ser vista com cuidado, pois dada a sua novidade (os primeiros casos de sucesso foram obtidos em meados da década de 80) pouco se conhece a respeito dos efeitos adversos e riscos que oferecem ao homem e ao ambiente.

PLANTAS TRANSGÊNICAS

Os estudos de transferência de genes entre microrganismos iniciaram-se na década de 70 e sendo uma área da ciência bastante recente o entendimento de alguns termos faz-se necessário para melhor compreensão dos métodos e trabalhos desenvolvidos.

Segundo RIBEIRO *et al.* (1991) planta transgênica é aquela que possui genes que originalmente não constituem seu genoma, isto é, sofreram uma transferência genética. Ainda segundo os autores, embora a transferência genética possa ser feita partindo-se de genes naturais, a possibilidade de alterar-se o DNA através da engenharia genética (DNA recombinante) abriu caminho para novos avanços, pois selecionam-se determinadas características expressas nos segmentos que são manipulados e transferidos, levando as informações para a expressão no hospedeiro.

A obtenção de plantas transgênicas surgiu como uma tentativa para a obtenção do melhoramento das culturas, que até então era feito através das técnicas demoradas de cruzamento clássico, há muito conhecidas e utilizadas pelo homem (BOTTERMAN, 1991).

Até 1983, o melhoramento da qualidade e produção das culturas era possível de ser obtido por meio da recombinação sexual, seguida por seleção ou, em menor intensidade, por mutações, ao acaso ou induzidas. Os programas assim determinados, embora muito frutíferos, são demorados e cansativos, requerendo anos de trabalho. Por meio dos métodos tradicionais, muitos cultivares foram desenvolvidos e são difundidos em todo o mundo, sendo utilizados em diversas culturas como soja, milho, algodão e trigo.

Progressos recentes em Biologia Molecular (DNA-recombinante) e celular (cultivo de células "in vitro") têm ampliado grandemente os horizontes e novas características podem ser obtidas para o melhoramento das plantas. É possível hoje transferir-se genes de muitos organismos para plantas sem a concorrência do cruzamento sexual.

Embora a década de 70 seja o marco no início das pesquisas com transferência genética entre os microrganismos procariontes, somente em 1983 foi obtida a primeira planta resistente (fumo) a qual continha em seu genoma genes de resistência a antibiótico, introduzidos por meio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Com o domínio das técnicas de cultura de células e tecidos "in vitro" para a regeneração das plantas, a tecnologia das plantas transgênicas expandiu-se sensivelmente, de modo a se conhecer atualmente mais de 20 espécies destas plantas, dentre as quais muitas de interesse econômico, como culturas agrícolas (algodão, soja, milho, arroz, alface, feijão, centeio, batata, tomate, morango, canola e outras brássicas, uva, trigo, noz, maçã e beterraba) e florestais (álamo).

Detalhes sobre definições e particularidades das técnicas envolvidas no processo de obtenção das plantas transgênicas podem ser encontrados em SOUZA (1987), WEBB & MORRIS (1992).

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO

Transformação indireta

A forma mais usual e utilizada para as dicotiledôneas é através da bactéria *A. tumefaciens* e *A. rhizogens*. Tais bactérias são há muito conhecidas pelo homem como causadoras da galha da coroa, pois a planta (dicotiledônea) infectada apresenta calos ou tumores no colo (WEBB & MORRIS, 1992). RIBEIRO *et al.* (1991) apresentam uma revisão sobre o modo de ação desta bactéria, detalhando-se o ciclo de infecção.

Atualmente, como técnica de inoculação do plasmídeo, além da danificação da planta, também pode ser incluído o co-cultivo de células bacterianas com células das plantas, discos foliares, embriões e sementes.

Detalhes da elaboração de um vetor plasmidial e as técnicas de inserção nos tecidos da planta hospedeira podem ser encontrados, respectivamente, em RITCHIE & HODES (1993) e RIBEIRO *et al.* (1991).

Transformação direta

Não envolve a presença de vetores (plasmídios) e atende à necessidade de se obter plantas transgênicas que não sejam infectadas por *A. tumefaciens* (principalmente as monocotiledôneas). Algumas técnicas diretas vêm sendo aplicadas com sucesso para obtenção, principalmente de monocotiledôneas, como milho e arroz, e têm sido mais utilizadas para a inserção de genes de *B. thuringiensis*.

A construção do plasmídio de *B. thuringiensis* inicia-se pela sua fragmentação em pontos específicos, por meio de enzimas de restrição, e são deletadas e incluídas seqüências de bases sintetizadas e, em seguida, polimerizado. Faz-se a clonagem da nova seqüência que contém também um gene (fator) de expressão e genes marcadores.

Neste tipo de transformação, existem técnicas desenvolvidas para protoplastos enquanto outras adaptam-se melhor às células e tecidos.

a) Microinjeção: consiste em introduzir no interior da célula o material exógeno, usando micropipetas ou microagulhas, vencendo mais facilmente as barreiras biológicas. As células a serem tratadas podem ser intactas, isoladas ou na forma de protoplasto, o qual é menos suscetível ao rompimento quando se faz a introdução do aparato (RIBEIRO *et al.*, 1991).

Algumas considerações sobre particularidades desta técnica aplicadas às monocotiledôneas podem ser encontradas nos trabalhos de REICH *et al.* (1986) e DING *et al.* (1994).

b) Biolística (balística biológica): segundo RIBEIRO *et al.* (1991) este processo consiste em uma série de processos nos quais materiais genéticos são arremessados nas células, constituídas em alvos. Para tal, micro-partículas de tungstênio ou ouro são impregnadas com DNA em solução de espermidine e CaCl_2 , e dispostas em um aparelho que sob condições de vácuo arremessa-as sobre o aparato onde estão as células (isoladas ou em tecidos, como discos foliares, embriões, calosidades ou cotilédones). O arremesso pode ser provocado eletrostaticamente ou por ar comprimido. O vácuo é de extrema importância, dado o pequeno tamanho dos projéteis, que poderiam sofrer desaceleração caso houvesse ar durante o processo.

A técnica é bastante simples e rápida, permitindo a transformação direta da planta, podendo substituir outros métodos usados em casos de pequeno êxito.

Entretanto, devido à própria novidade do processo, muitas dúvidas prevalecem, como tipo do suporte mais adequado para o alvo e número e velocidade dos projéteis. Isto tem reflexo direto na variação dos resultados obtidos (RIBEIRO *et al.*, 1991; WEBB & MORRIS, 1992).

As técnicas descritas vêm sendo utilizadas com o intuito de melhorar as culturas sob diferentes pontos e são dominadas por grupos de pesquisadores, principalmente, na América do Norte (EUA e Canadá), Europa (Inglaterra e Bélgica), Oceania (Austrália e Nova Zelândia) e Extremo Oriente (Japão e China), geralmente ligados a empresas de biotecnologia ou grandes produtoras de insumos agrícolas (sementes e produtos fitossanitários).

POTENCIAL DA BIOENGENHARIA NA OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

MEESEN & WARREN (1989) citam 4 vantagens do uso da tecnologia de plantas transgênicas com *B. thuringiensis*:

1) independências do controle das pragas em relação ao clima, seja chuvoso para aplicações terrestres ou ventos e chuvas para aéreas;

2) proteção das partes das plantas que são difíceis de serem atingidas com as aplicações (raízes e partes muito baixas ou internas);

3) vantagem do controle permanente livrando o agricultor de vistorias e aplicações eventuais, além de eliminar os insetos tão logo comecem a se alimentar, após a eclosão;

4) em função dos altos preços dos inseticidas químicos e dos custos das aplicações sucessivas, como nas culturas de algodão e tomate, as plantas podem ser uma alternativa mais viável e econômica para o produtor.

Fumo

As primeiras plantas foram obtidas por VAECK *et al.* (1987). Foi constatada a presença de δ -endotoxina, uma vez que 6 dias após alimentação com as folhas das plantas transgênicas as lagartas de *Manduca sexta* apresentaram entre 75 e 100% de mortalidade, variando conforme o gene contido na planta ou sua construção quimérica. Foi observado também que o gene Bt_2 íntegro não se expressou; assim somente genes truncados têm possibilidade de serem usados nesta

tecnologia, não sendo detectada a razão pela qual os genes intactos não se expressaram.

BARTON *et al.* (1987) usando vetor *A. tumefaciens* verificaram a alta toxidez das plantas transgênicas regeneradas com genes de *B. thuringiensis* para larvas de *M. sexta*, havendo, tal como no anterior, variações de acordo com os genes recombinantes. Observaram também a transferência para F_1 , mantendo a resistência e o nível de mortalidade aos insetos.

Contudo, utilizando o mesmo vetor (*A. tumefaciens*), WARREN *et al.* (1992) conseguiram introduzir em discos foliares de fumo (cv. Havana-38), genes CryIA de *B. thuringiensis*. Além disso, analisou-se a concentração de proteínas nos tecidos. As plantas regeneradas foram selecionadas para o campo a partir de testes em casa de vegetação contra *Heliothis virescens* e *M. sexta* e, nestas condições, apresentaram eficiência de 90 a 100%, para ambas as espécies.

Os estudos com plantas de fumo expressando toxinas de *B. thuringiensis* foram bastante explorados e, atualmente, têm sido menos frequentes pois buscam-se novas moléculas para serem expressas nas plantas e que sejam ativas e possam resolver os problemas causados por insetos não suscetíveis ao patógeno. Neste sentido, será discutido adiante a inserção de genes responsáveis pela síntese e expressão de inibidores enzimáticos e venenos de artrópodos.

Algodão

UMBECK *et al.* (1987) registraram o primeiro caso de plantas transgênicas de algodão, sendo a primeira vez que esta tecnologia é aplicada em uma planta de grande importância econômica. Segundo os autores, a primeira tentativa de se introduzir DNA exógeno no algodão foi feita com injeção mas não foi bem sucedida. O sucesso foi alcançado pelo uso do vetor *A. tumefaciens*.

PERLAK *et al.* (1990) em estudos iniciais com plantas de algodão modificadas, contendo genes de *B. thuringiensis* dos "strains" HD-1 e HD-73, verificaram uma baixa expressão dos genes nas plantas, num total de 0,001% das proteínas solúveis totais das plantas. Posteriormente, através da modificação na sequência original do gene previamente à sua introdução na planta, PERLAK *et al.* (1991) obtiveram expressão gênica nas plantas, alcançando maior con-

centração de toxinas nas plantas e, consequentemente, maior controle dos insetos testados.

WILSON *et al.* (1992) testaram, em condições de campo, 3 linhagens de algodão transgênico, derivadas da cultivar Coker 312, quanto ao seu efeito sobre a população de lepidópteros pragas da cultura nos EUA. Foi constatado que o número de botões florais em roseta causados pela *Pectinophora gossypiella* foi 95% menor nas parcelas com as plantas transformadas. Com relação às maçãs, estas foram igualmente penetradas nos 2 tipos de plantas, porém, nenhuma lagarta foi recuperada das maçãs de plantas transgênicas e o dano nas sementes foi reduzido em 97 a 99%. Outras pragas avaliadas mostraram-se bastante suscetíveis às linhagens desenvolvidas, como *Buculatrix thurberiella*, *Estigma aeraea* e *Spodoptera exigua* (espécies filófagas), sendo as plantas de cultivares comerciais intensivamente danificadas pelas espécies citadas.

BENEDICT *et al.* (1993) verificaram que plantas transgênicas de algodão causaram não somente mortalidade elevada em lagartas de *H. virescens* e *Helicoverpa zea* mas, também, efeitos no comportamento dos insetos. As lagartas passaram maior tempo nestas plantas em "spin-down" que nas não transformadas, sendo principalmente localizadas nas últimas folhas.

Em recente trabalho de campo, RUMMEL *et al.* (1994) determinaram o efeito da presença de genes de *B. thuringiensis* em plantas de algodão sobre a infestação natural de *H. zea*. Foi constatada a redução dos danos nas parcelas de plantas transgênicas, comparativamente às parcelas de plantas normais (cultivares comerciais). Além disso, não foi necessária qualquer aplicação de inseticidas químicos para a proteção das parcelas transgênicas, o que repetido nas parcelas comerciais levou a perdas da ordem de 150 kg de pluma/ha.

Da mesma forma que ocorreu com o fumo, o algodão é hoje uma das plantas mais estudadas pela engenharia genética e o desenvolvimento de linhagens com genes de *B. thuringiensis* tem sido menos intenso que os estudos de linhagem expressando outras substâncias. Além disso, por estarem em fase conclusiva de estudos e assim aptas à comercialização, as linhagens têm sido submetidas a testes de campo em diferentes regiões dos EUA, em sistemas de manejo integrado, visando sua recomendação para o controle de pragas da cultura.

Em testes realizados no estado do Texas e Mississippi, as linhagens apresentaram bom desempe-

nho nos testes realizados entre 1990-1991 e 1992-1995, controlando efetivamente as lagartas mais importantes que atacam a cultura nos EUA, não tendo efeito sobre outras pragas (pulgões e percevejos) (RUMMEL *et al.*, 1994).

Tomate

FISCHHOFF *et al.* (1987) obtiveram êxito na integração de genes de *B. thuringiensis*, via *A. tumefaciens*, em células de tomate. Os genes incorporaram-se e transmitiram-se à progênie (F_1). Com relação à toxidez, observaram 100% de mortalidade nos ensaios de laboratório, utilizando larvas de *H. zea*, *H. virescens* e *M. sexta*, alimentadas com folhas das plantas modificadas. Verificaram que houve baixa expressão dos genes nos frutos, entretanto, *H. virescens* alimenta-se inicialmente das folhas passando posteriormente ao fruto. Dessa forma, a expressão no fruto não precisa ser elevada. *M. sexta* foi mais suscetível e *H. zea* a mais resistente, embora todas as larvas sobreviventes de ambas as espécies apresentassem distúrbios relacionados ao desenvolvimento.

As melhores linhagens obtidas foram avaliadas por DELANNAY *et al.* (1989), em condições de campo, sob infestações naturais e artificiais de *H. zea*, *M. sexta* e *Keiferia lycopersicella*. No primeiro experimento com *M. sexta*, a infestação artificial com ovos resultou em baixa desfolha nas plantas transgênicas, sendo tais resultados confirmados no ano seguinte, nos dois tipos de infestação. Os testes com *H. zea* mostraram maior suscetibilidade que anteriormente, em função provavelmente da maior expressão dos genes nas condições de campo. Com relação à *K. lycopersicella*, esta foi menos suscetível em campo que em laboratório, em função da concentração de d-endotoxina nos frutos ser considerada baixa para esta espécie.

O tomateiro, sob influência direta dos estudos realizados com plantas de fumo (igualmente uma solanácea), é uma das culturas mais estudadas nesta área e, atualmente, além de *B. thuringiensis*, outras moléculas vêm sendo estudadas visando sua expressão no genoma da planta, conforme discutido no item adiante. Por esta razão é que também existem trabalhos de campo com as linhagens contendo *B. thuringiensis* já desenvolvidas e aptas à comercialização, envolvendo também a questão da segurança de tais organismos no ambiente.

Batata

CHENG *et al.* (1992) obtiveram através do vetor *A. tumefaciens*, plantas de batata transgênicas que expressavam elevada concentração de toxina. As plantas transformadas e regeneradas foram comparadas com não transformadas em casa de vegetação e percebeu-se a redução do consumo foliar de *M. sexta*, de 1,86 cm² para 0,61 cm².

Resultados mais consistentes obtiveram JANSEN *et al.* (1995) inserindo sequência gênica cryIA(b) de *B. thuringiensis*. Em testes realizados com folhas fornecidas a lagartas de *P. operculella* e *M. sexta*, selecionaram as linhagens que resultaram em elevado percentual de mortalidade. Estas foram avaliadas em casa-de-vegetação e os danos às folhas, provocados por *P. operculella* foram significativamente menores que nas testemunhas (plantas não-transformadas). Além disso, na avaliação dos danos aos tubérculos infestados pelos insetos e armazenados por 2 meses, o controle foi de 100%, sendo este o mesmo valor encontrado para tubérculos infestados com larvas após serem armazenados por 7 meses, demonstrando a estabilidade da toxina nos tecidos dos tubérculos.

Arroz e Milho

FUJIMOTO *et al.* (1993) obtiveram por eletroporação, as primeiras plantas de arroz transgênicas, contendo genes de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1). As plantas transformadas e regeneradas pertencentes à R_2 , foram fornecidas a *Chilo supresalis* e *Cnaphalocrosis medinalis*. Avaliou-se, além da mortalidade, o peso dos insetos ao longo de 7 dias de alimentação. Constatou-se que uma das linhagens (F2-11) causou de 10 a 40% de mortalidade e redução de 60 a 80% no peso de *C. supresalis*, enquanto a linhagem B2-9 provocou de 10 a 50% de mortalidade e a mesma faixa de redução no peso. Entretanto, *C. medinalis* foi menos suscetível à linhagem F2-11, com apenas 20% de mortalidade e 30% de redução no peso, bem como à B2-9, com 40% de mortalidade e sem redução no peso. Os autores ressaltaram a necessidade de serem conduzidos testes complementares utilizando plantas mais desenvolvidas, em condições de campo ou laboratório, para assim se avaliar todo o potencial destas plantas.

Assim como para o arroz, o número de casos de

sucesso na obtenção de plantas de milho transgênicas, contendo genes de *B. thuringiensis* é muito pequeno, dada as dificuldades impostas pelas próprias características das monocotiledôneas. Entretanto, os poucos resultados existentes são muito positivos e encorajam novos estudos.

Plantas de milho foram obtidas por KOZIEL *et al.* (1992) através da biolística, arremessando partículas de ouro contendo a seqüência gênica recombinante do *B. thuringiensis* sobre embriões de milho. A partir de plantas regeneradas em estufas foram obtidas novas plantas (T_1) para testes de campo, onde foram intensamente infestadas com larvas recém-eclodidas de *O. nubilalis*. Verificou-se que nas plantas transformadas, houve redução no dano foliar e, principalmente, no tunelamento. Também, a porcentagem de mortalidade foi bastante elevada entre as diferentes linhagens testadas, variando de 65 a 100%.

O interesse econômico pela cultura do milho tem levado a recentes resultados que confirmam as previsões iniciais e demonstram, em condições de campo, a possibilidade de se utilizar o milho transgênico com o mínimo de danos provocados por lagartas em espigas e caule das plantas.

Álamo e outras espécies arbóreas

Os trabalhos desenvolvidos com a tecnologia de plantas transgênicas envolvem basicamente culturas de pequeno porte e ciclo de vida relativamente curto. Contudo, alguns estudos com sucesso envolvendo plantas de porte arbóreo foram desenvolvidos, mas são muito recentes e portanto incompletos, principalmente devido ao tempo necessário para regeneração das plantas a partir dos calos (geralmente 2 a 3 anos), o que não tira sua importância, pois são marcos iniciais.

Neste sentido, ROBINSON *et al.* (1994) obtiveram por eletroporação, clones de álamo (*Populus* spp) que expressavam o gene de *B. thuringiensis*. Os testes foram conduzidos em laboratório, usando lagartas de *Lymantria dispar* e *Malacosoma disstria* (importantes pragas desfolhadoras de florestas no Hemisfério Norte), mantidas em folhas de plantas transformadas e não transformadas, regeneradas à partir de cultivo de tecidos. As avaliações de mortalidade e consumo foliar para ambas as espécies revelaram que *M. disstria* foram afetadas na

sobrevivência pela toxina do patógeno presente na planta e que não houve efeito destas plantas sobre *L. dispar* no que se refere a este parâmetro.

Embora com variação na expressão genética, WANG *et al.* (1996) obtiveram diferentes linhagens de álamo contendo genes de *B. thuringiensis* inseridos por meio de *A. tumefaciens* (co-cultivo). As plantas regeneradas que apresentavam boas características silviculturais e possuíam d-endotoxinas nos seus tecidos foram avaliadas em bioensaios com lagartas de *L. dispar*. Em função da alta mortalidade, os autores avaliarão os clones em condições de campo.

Soja

As lagartas constituem um importante grupo de pragas na cultura da soja em diferentes regiões onde é cultivada. Sendo suscetíveis a *B. thuringiensis*, existe a possibilidade de se obter plantas expressando suas toxinas e, conseqüentemente, aumentar a eficiência do controle na cultura.

Neste contexto, STEWART *et al.* (1996b) desenvolveram um dos primeiros trabalhos com soja expressando alta concentração de toxinas. A técnica utilizada foi de bombardeamento de microprojéteis (2 mm de diâmetro) contendo genes de *B. thuringiensis*, sobre embriões de soja (cv. Jack). As plantas regeneradas e sua progênie foram testadas extraíndo-se discos dos folíolos que foram fornecidos a lagartas de *H. virescens* e *H. zea* levando, nas linhagens com maior expressão da toxina, à maior mortalidade dos insetos.

Canola e outras brássicas

As brássicas constituem atualmente a terceira fonte de óleo, sendo precedida pela soja e certas palmáceas. À medida em que a importância cresceu nos últimos 10 anos, os problemas relacionados com pragas acompanharam a tendência.

Por meio de co-cultivo de tecidos embrionários dos hipocótilos de *Brassica napus* com *A. tumefaciens* contendo genes de *B. thuringiensis*, STEWART *et al.* (1996a) obtiveram plantas transformadas que foram fornecidas a lagartas de *S. exigua* e *H. zea*. Os autores consideraram que este primeiro trabalho com canola transgênica apresentou resultados excelentes no que se refere à toxina presente nos tecidos (0,4% de todas as proteínas extratíveis). As

larvas de *H. zea* foram mais suscetíveis e não houve diferença significativa na eficiência das diferentes linhagens com concentração variável de toxina, fato que foi verificado para *S. exigua* com maior mortalidade nas linhagens com mais toxina. Por outro lado, os efeitos antibióticos nos sobreviventes não foram verificados em nenhuma circunstância.

Embora os estudos com canola sejam mais avançados, outras brássicas, como couve, brócolis, repolho e couve-flor vêm sendo pesquisadas e algumas linhagens contendo genes de *B. thuringiensis* com elevada atividade contra *Plutella xilostella* e outros lepidópteros pragas da cultura já foram obtidas (METZ *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1995)

IMPLICAÇÕES NO USO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

Existem 2 pontos básicos a serem considerados no âmbito da utilização das plantas transgênicas: segurança ambiental e resistência dos insetos às plantas.

Nos EUA, em 1994/95, o governo, por intermédio da EPA, cedendo a pressões de grupos interessados, liberou um registro provisório para testes prévios à comercialização, com o qual Ciba Seeds, Mycogen Plant Sciences e Monsanto receberam sinal verde para testes de campo com algodão, milho e batata, abrangendo cerca de 25.000 ha, em diferentes estados daquele país.

As opiniões sobre a validade de tais testes são variadas. Há aqueles que consideram que a segurança demonstrada nos testes de campo predizem a segurança na escala comercial. Entretanto, uma avaliação mais pormenorizada dos trabalhos desenvolvidos e apresentados pode revelar que os dados não são suficientes e, portanto, não correspondem à certeza por alguns afirmada.

A resistência é, sem dúvida, um dos maiores problemas e tem levado a muitas discussões. Existem especulações sobre a real possibilidade de ocorrer, pois tem-se como exemplos os casos já conhecidos de insetos resistentes a *B. thuringiensis*, resultado, em sua maioria de pressão de seleção em laboratório, mas que indicam prováveis problemas futuros decorrentes do mau uso da técnica.

McGAUGHEY & WHALON (1992) discutem as prováveis estratégias que poderiam ser adotadas no manejo da resistência. Segundo os autores a rotação ou

alternância de plantas transgênicas com *B. thuringiensis* com outras plantas portadoras de genes de inibidores ou outras moléculas ou ainda controle cultural, químico ou outro agente de controle biológico poderiam integrar o manejo. Tudo estaria dependente da capacidade da população retornar à suscetibilidade na ausência da pressão de seleção, presumindo-se que os genes de resistência conferem maior valor adaptativo (genes pleiotrópicos). Assim, na ausência, a reversão ocorreria pois os insetos resistentes teriam um custo maior para sobreviver. Isto é verdadeiro quando a resistência está no início e é instável. Casos em que a resistência já atingiu níveis elevados, a reversão não ocorre.

Sugerem ainda a mistura de toxinas ou outras proteínas na mesma planta ou a mistura de sementes no plantio (plantio em linhas ou mesmo misturas casuais). Entretanto, a mistura de genes é limitada pela dificuldade e demora na busca, inserção e expressão dos genes e, principalmente, por estarem duas fontes de resistência agindo na mesma planta, o que resulta em correr o risco de se desenvolver resistência para ambos e todo o trabalho é perdido.

Uma estratégia estabelecida não somente pelos autores citados, mas também por ALSTAD & ANDOW (1995) baseia-se na manutenção de refúgios que garantem a sobrevivência dos indivíduos suscetíveis (plantas não transformadas). Aqui também parte-se do princípio da pleiotropia dos genes, na qual os indivíduos suscetíveis terão melhor êxito nas plantas não transformadas. Além disso, tais refúgios podem servir a indivíduos que migrem para a cultura, trazem genes de suscetibilidade e, com isso, abaixe o nível de resistência na população. Ainda segundo McGAUGHEY & WHALON (1992), esta estratégia pode ser complementada com a expressão, nas plantas transformadas, de genes que promovam uma alta concentração de toxinas nos tecidos que, assim, eliminaria não somente os indivíduos suscetíveis homozigotos mas também os heterozigotos que são na maioria das vezes portadores dos genes de resistência.

Entretanto, o estabelecimento de refúgios deve ser estudado, pois caso contrário servirão apenas para multiplicação dos prejuízos, pois nestes as pragas se desenvolverão livremente. Este alerta foi dado por ALSTAD & ANDON (1995) que realizaram um estudo hipotético para o manejo da resistência de *O. nubilalis* a plantas transgênicas expressando toxinas de *B. thuringiensis*.

Neste estudo, desenvolveram um modelo matemático que permitiu concluir que os refúgios feitos casualizadamente tendem a levar a maior pressão de seleção, pois para combater os prejuízos nas áreas não protegidas pelas toxinas são adotadas medidas de redução populacional que reduzem o tamanho desta população, aumentando a pressão de seleção.

De qualquer forma, o valor desta tecnologia é inegável e, por sua importância, deve continuar sendo investigada. Mas antes que se torne uma panacéia, ou algo parecido com o “fenômeno do século

lo”, é necessário que se busque racionalizar seu uso, pesquisando também outras estratégias de controles mais seguras, mais próximas da natureza e com menos chances de se tornarem obsoletas pelo desenvolvimento de resistência. Em certos casos de insetos de difícil controle (sugadores e broqueadores), pode ser uma alternativa viável. Ainda assim, é recomendável que esta estratégia de controle seja encarada dentro da filosofia do MIP e não como uma simples ferramenta para o extermínio das populações de pragas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSTAD, D.N. & ANDON, D.A. Managing the evolution of insects resistance to transgenic plants. *Science*, v.258, p.1894-1896, 1995.
- BARTON, K.A.; WHITELEY, H.R.; YANG, N. *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*, v.85, p.1103-1109, 1987.
- BENEDICT, J.H.; SACHS, E.S.; ALTMAN, D.W.; RING, D.R.; STONE, T.B.; SIMS, S.R. Impact of d-endotoxin producing transgenic cotton on insect-plants interactions with *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environm. Entomol.*, v.22, p.1-9, 1993.
- BOTTERMAN, J. Improvements of agricultural crops by genetic engineering. In: BLAZEJ, A. & PRIVAROVAM, V. (Eds.) *Environmental Biotechnology*, Elsevier: Amsterdam, 1991. p.379-385.
- CHENG, J.; BOLYARD, M.G.; SAXENA, R.C.; STICKLEN, M.B. Productions of insect resistant potato by genetic transformation with d-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Plant Science Limerick*, v.81, p.83-91, 1992.
- DELANNAY, X.; LAVALLEE, B.J.; PROKSCH, R.K.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; MARRONE, P.G.; DODSON, R.B.; AUGUSTINE, J.J.; LAYTON, G.J.; FISCHHOFF, D.A. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology*, v.7, p.1265-1269, 1989.
- DING, Q.X.; XIE, Y.J.; DAI, J.R.; MI, J.J.; LI, T.Y.; TIAN, Y.C.; QIAO, L.Y.; MANG, K.Q.; LIU, B.L.; WANG, Y.; FENG, P.Z. Introduction *B.t.* genes into maize with ovary injection. *Science in China*, Series B, v.37, p.563-72, 1994.
- FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; McCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGE, R.S.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology*, v.5, p.807-813, 1987.
- FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generate by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, v.11, p.1151-1155, 1993.
- JANSEN, S.; CORNELISSEN, M.; CLERCQ, R. de; REYNAERTS, A.; PEFFEROEN, M. *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance in potato by expression of the *Bacillus thuringiensis* cryIa(b) insecticidal crystal protein. *J. Econ. Entomol.*, v.88, n.5, p.1469-1476, 1995.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOLUMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; McPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIS, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGTH, M.; EBORA, R.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, v.11, p.194-200, 1992.
- LI, X.B.; MAO, H.Z.; BAI, Y.Y. Transgenic plants of rutabaga (*Brassica napobrassica*) tolerant to pest insects. *Plant Cell Reports*, v.15, n.1/2, p.97-101, 1995. Resumo em *CAB Abstracts on CD-ROM*, 1996-97.

- McGAUGHEY, W.H. & WHALON, M.E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, v.258, 1451-1455, 1992.
- METZ, T.D.; DIXIT, R.; EARLE, E.D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*). *Plant Cell Reports*, v.15, n.3/4, p.287-292, 1995. Resumo em *CAB Abstracts on CD-ROM*, 1996-97/
- MEENSEN, R.L. & WARREN, G. Insect control with genetically engineered crops. *Ann. Rev. Entomol.*, v.34, p.373-81, 1989.
- PERLAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.A.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREEPLATE, J.T.; FISCHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*, v.8, p.939-943, 1990.
- PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.A.; McPHERSON, S.L.; FISCHHOFF, D.A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p.3324-3328, 1991.
- REICH, T.J.; IYER, V.N.; MIKI, B.L. Efficient transformation of alfafa protoplasts by intranuclear microinjection of Ti-plasmids. *Bio/Technology*, v.4, p.1001-1004, 1986.
- RIBEIRO, R.C.S.; CROCOMO, O.; COSTA, C. Plantas transgênicas. In: CROCOMO, O.; SHARP, W.R.; MELLO, M. (Eds.) *Biotechnology para produção vegetal*. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 495-539.
- RITCHIE, S.W. & HODGES, T.K. Cell culture and regeneration of transgenic plants. In: KUNG, S. & WU, R. (Eds.) *Transgenic plants*, San Diego: Academic Press, 1993. p. 147-178.
- ROBINSON, D.J.; McCOWN, B.H.; RAFFA, K.F. Responses of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) to transgenic poplar, *Populus* spp., containing a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin gene. *Environm. Entomol.*, v.23, p.1030-1041, 1994.
- RUMMEL, D.R.; ARNOLD, M.D.; GANNAWAY, J.R.; OWEN, D.F.; CARROLL, S.C.; DEATON, W.R. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* resistant of injury from bollworm implications for pest mangement in the Texas southern high plains. *Southwestern Entomol.*, v.19, p.199-207, 1994.
- SOUZA, E.C. Plasmídios bacterianos. In: COSTA, S.O.P. (Ed) *Genética Molecular e de Microrganismos - os fundamentos da engenharia genética*. São Paulo: Manole, 1987. 559 p.
- STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; RAMACHANDRAN, S.; PANNOTT, W.A. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIac Gene. *Plant Physiol.*, v.12, n.1, p.115-120, 1996a.
- STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; BOERMA, H.R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PANNOTT, W.A. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIac Gene. *Plant Physiol.*, v.12, n.1, p.121-129, 1996b.
- UMBECK, P.; JOHNON, G.; BARTON, K.; SWAIN, W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology*, v.5, p.263-266, 1987.
- VAECK, M.; REYMAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSEN, S.; DEBEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, v.328, p.33-37, 1987.
- WANG, G.J.; CASTIGLIONE, S.; CHEN, Y.; LI, L.; HAN, Y.F.; TIAN, Y.C.; GABRIEL, D.W.; HAN, Y.N.; MANH, K.Q.; SALA, F. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. *Transgenic Research*, v.5, p.289-301, 1996. /Resumo em *CAB Abstracts on CD-ROM*, 1996-97.
- WARREN, G.W.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; KOZIEL, M.G. Field evaluation of transgenic tobacco containing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J. Econ. Entomol.*, v.85, p.1651-1659, 1992.
- WEBB, K.J. & MORRIS, P. Methodologies of plant transformation. In: GATEHOUSE, A.M.R.; HILDER, V.A.; BOULTER, D. (Eds.) *Plant genetic manipulation for crop protection*. Oxon: CAB International, 1992. p. 7-43.
- WILSON, F.D. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects. *J. Econ. Entomol.*, v.85, p.1516-1521, 1992.

Recebido para publicação em 21/8/97