



PLANTAS TRANSGÊNICAS QUE SINTETIZAM TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* E OUTRAS

Lidia Mariana Fiúza

Engenheira Agrônoma (UPF), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS), Doutora em Ciências Agronômicas (ENSAM-Montpellier) e Pós-Doutora em biotecnologia Vegetal (CIRAD-Montpellier).

Laura Massochin Nunes Pinto

Bióloga (PUCRS) e Mestre e Doutoranda em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

No contexto das aplicações biotecnológicas do entomopatógeno *B. thuringiensis*, aqui se encontram dados bibliográficos sobre a transformação genética de plantas, com genes de *B. thuringiensis* e outros, que conferem resistência ou tolerância das plantas hospedeiras aos insetos-praga. As espécies vegetais apresentam naturalmente uma resistência aos insetos fitófagos, diferenciando assim os grupos de pragas em função das plantas hospedeiras. A resistência vegetal está baseada em vários mecanismos de defesa, incluindo uma gama de metabólitos secundários nocivos produzidos pelas plantas. A biotecnologia vegetal, através do desenvolvimento de técnicas de biologia celular e molecular de vegetais superiores oferece novas possibilidades ao melhoramento de plantas cultivadas, facilitando a obtenção de plantas resistentes ao ataque dos insetos. A transformação genética e a regeneração *in vitro* de plantas, somadas à disponibilização de genes de interesse agrônomico, destinados a introdução em plantas, têm permitido a geração de plantas transgênicas com características específicas, sem o rompimento de combinações genéticas já selecionadas pelos programas convencionais de melhoramento genético de plantas cultivadas. A transformação de plantas com genes de origem microbiana, vegetal e animal, os quais codificam especificamente toxinas com efeito inseticida,

vem sendo considerada uma alternativa relevante junto aos métodos de controle de insetos-praga das plantas de interesse econômico, onde se destacam as plantas-Bt resistentes a diversas ordens de insetos, principalmente aos lepidópteros e coleópteros.

1.1 Genes de *B. thuringiensis* em plantas

B. thuringiensis apresenta um genoma de 2,4 a 5,7 milhões de pares de bases, com elementos extracromossômicos lineares ou circulares (Carlson *et al.*, 1994). Os genes *cry* estão localizados em plasmídios, sendo esses responsáveis pela síntese de diferentes proteínas inseticidas, cuja clonagem e caracterização desses genes em 1981 (Schnepf & Whiteley, 1981) revelou novas perspectivas de aplicação do entomopatógeno. Entre essas se encontra a transgenia que permite introduzir os genes de *B. thuringiensis* codificadores das toxinas nos genomas dos vegetais, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta e atingindo, assim, apenas os insetos-praga que se alimentam dos tecidos (de Maagd *et al.*, 1999). A primeira geração de plantas transgênicas resistentes a insetos foi desenvolvida com o uso de genes codificadores de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* (Fischhoff, 1987; Vaeck *et al.*, 1987).

Os genes *cry* de *B. thuringiensis* são talvez os exemplos mais conhecidos de genes exógenos para os quais tem sido difícil obter um nível satisfatório de expressão em plantas transgênicas (Diehn *et al.*, 1996). A baixa expressão dos genes de *B. thuringiensis* em plantas tem sido associada à instabilidade das moléculas de mRNA, uma característica amplamente observada da expressão destes genes em plantas é o pouco ou nenhum acúmulo de mRNA mesmo quando sob controle de promotores fortes. Para tan-

to várias modificações têm sido testadas para aumentar a eficiência de expressão destes genes, como adaptar os códons preferenciais de bactérias para códons preferenciais de plantas e/ou aumentar o conteúdo de G/C nas seqüências codificantes (Perlak *et al.*, 1991), retirada de sítios de *splicing*, modificações dos sinais de poliadenilação dentro da região codificante (Koziel *et al.*, 1993), inserção de íntrons na região 5' da seqüência não traduzida (Jouanin *et al.*, 1998) bem como a inserção de genes nativos em cloroplastos inicialmente restrita a tabaco (McBride *et al.*, 1995).

Genes parcialmente ou totalmente sintéticos têm sido construídos, nestes genes a seqüência de nucleotídeo é modificada sem a troca da seqüência de aminoácido, a expressão destes genes em plantas aumentou significativamente (de menos de 0,001% de proteína solúvel na folha para até 1%), sendo os genes totalmente sintéticos os mais eficientes em testes de campo (Jouanin *et al.*, 1998).

Os estudos iniciais se basearam em plantas como tabaco e tomate (Barton *et al.*, 1987; Fischhoff *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987) devido às facilidades de transformação, cultivo em casa de vegetação e crescimento rápido. Vários genes quiméricos contendo um gene promotor de origem vegetal; a seqüência completa do gene *cry* e uma região de poliadenilação foram introduzidos em tabaco e tomate, porém nenhuma expressão foi detectada em tabaco e níveis muito baixos foram observados em tomate (Perlak *et al.*, 2001).

A truncagem da seqüência codificadora do gene *cry* por eliminação da metade 3' desta seqüência aumentou a expressão para níveis detectáveis de proteína e mRNA (Estruch *et al.*, 1997). Os primeiros testes de campo com versões truncadas do gene *cry* foram eficientes no controle de *Helicoverpa zea* no caso do tomate (Perlak & Fischhoff, 1993), porém não no controle de *Heliothis virescens* no caso do algodão (Jenkins *et al.*, 1991). Os resultados mais efetivos foram obtidos utilizando genes sintéticos (Perlak *et al.*, 1990; Perlak *et al.*, 1991; Van der Salm *et al.*, 1994).



Tabela 1. Genes de *B. thuringiensis* utilizados na engenharia genética de plantas

Plantas	Genes	Insetos-Alvo	Referências
Álamo	<i>cry1Aa</i>	<i>Lymantria dispar</i> (L.)	McCown <i>et al.</i> (1991)
	<i>cry3Aa</i>	<i>Chrysomela tremulae</i> F.	Cornu <i>et al.</i> (1996)
Alfafa	<i>cry1Ca</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> (Boiusduval)	Sthrizhov <i>et al.</i> (1996)
Algodão	<i>cry1Ab</i>	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i>	Perlak <i>et al.</i> (1990)
	<i>cry1Ac</i> e <i>cry2Ab</i>	<i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> (Walker)	Adamczyk <i>et al.</i> (2001)
	<i>cry1F</i> e <i>cry1Ac</i>	<i>Helicoverpa zea</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Estigmene acrea</i> , <i>Bucculatrix thurberiella</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Spodoptera ornithogalli</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i>	EPA (2008)
	<i>cry1Ab</i> e <i>Vip3Aa</i>	-	EPA (2008)
	<i>cry1Ac</i>	lepidópteros	USDA (2008)
Amendoim	<i>cry1Ac</i>	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Singsit <i>et al.</i> (1997)
Arroz	<i>cry1Aa</i>	<i>Chilo suppressalis</i>	Breitler <i>et al.</i> (2004)
	<i>cry1Ab</i>	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> , <i>Chilo suppressalis</i> , <i>Scirpobaga incertulas</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i> , <i>Herpilogamma licarialis</i> , <i>Sesamia inferens</i> , <i>Naranga anescens</i> , <i>Mycalasis gotama</i> , <i>Parnara guttata</i> .	Shu <i>et al.</i> (2000), Ye <i>et al.</i> (2003), Wunn <i>et al.</i> (1996), Datta <i>et al.</i> (1998), Ghareyazic <i>et al.</i> (1997), Alam <i>et al.</i> (1998), Wu <i>et al.</i> (1997), Husnain <i>et al.</i> (2002)
	<i>cry1Ac</i>	<i>Chilo suppressalis</i> , <i>Nilaparvata lugens</i> , <i>Scirpobaga incertulas</i>	Loc <i>et al.</i> (2002), Khanna e Raina (2002), Nayak <i>et al.</i> (1997), Han <i>et al.</i> (2007)
	<i>cry1Ab</i> e <i>cry1Ac</i>	<i>Chilo suppressalis</i> , <i>Scirpobaga incertulas</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Cheng <i>et al.</i> (1998), Ahmad <i>et al.</i> (2002), Tu <i>et al.</i> (2000)
	<i>cry1B</i>	<i>Chilo suppressalis</i>	Breitler <i>et al.</i> (2000 e 2001)
	<i>cry1C</i>	<i>Scirpobaga incertulas</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Tang <i>et al.</i> (2006)
	<i>cry2A</i>	<i>Scirpobaga incertulas</i> , <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	Maqbool <i>et al.</i> (1998), Chen <i>et al.</i> (2005)
Batata	<i>cry1Ab</i>	<i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller)	Peferoen <i>et al.</i> (1992), Rico <i>et al.</i> (1998)
	<i>cry1Ab</i>	<i>Heliothis armigera</i> (Hübner)	Chakrabarti <i>et al.</i> (2000)
	<i>cry3Aa</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Adang <i>et al.</i> (1993), Perlak <i>et al.</i> (1993), Coombs <i>et al.</i> (2002)
Berinjela	<i>cry1Ab</i>	<i>Leucinodes orbonalis</i> Guenée	Kumar <i>et al.</i> (1998)
	<i>cry3A</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say)	Jelenkovic <i>et al.</i> (1998)
	<i>cry3B</i>	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Iannacone <i>et al.</i> (1997)
Brócolis	<i>cry1C</i>	<i>Plutella xylostella</i> (L.)	Zhao <i>et al.</i> (2001)
Canola	<i>cry1Ac</i>	<i>Thrichoplusia ni</i> (Hübner), <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner), <i>Heliothis virescens</i> (Fabr.), <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie)	Stewart <i>et al.</i> (1996b)
	<i>cry1Ac</i>	<i>Plutella xylostella</i>	Halfhill <i>et al.</i> (2001)
Fumo	<i>cry1Aa</i>	<i>Manduca sexta</i> (L.)	Barton <i>et al.</i> (1987)
	<i>cry1Ab</i>	<i>Manduca sexta</i>	Vaeck <i>et al.</i> (1987)
	<i>cry1Ab</i> e <i>cpTI</i>	<i>Manduca sexta</i>	Perlak <i>et al.</i> (1991)
	<i>cry1Ab</i>	<i>Manduca sexta</i>	Williams <i>et al.</i> (1993)
	<i>cry1Ac</i>	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Spodoptera littoralis</i>	McBride <i>et al.</i> (1995)
	<i>cry1C</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	Strizhov <i>et al.</i> (1996)
	<i>cry2A</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Spodoptera exigua</i>	Selvapandiyar <i>et al.</i> (1998); Kota <i>et al.</i> (1999)
Milho	<i>cry1Ab</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner)	Kozziel <i>et al.</i> (1993)
	<i>cry9c</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Janssem <i>et al.</i> (1997)
	<i>cry1F</i>	<i>Diatraea grandiosella</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i>	EPA (2008)
	<i>cry1Ac</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	EPA (2008)
	<i>cry3Bb1</i>	<i>Diabrotica virgifera</i> , <i>Diabrotica barberi</i>	EPA (2008)
	<i>cry34Ab1</i> e <i>cry35Ab1</i>	<i>Diabrotica virgifera</i>	EPA (2008)
	<i>cry1Ab1</i> e <i>cry3Bb1</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Diatraea grandiosella</i> , <i>Diatraea crambidoides</i> , <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Elasmopalpus lignosellus</i> , <i>Diabrotica virgifera</i> , <i>Diabrotica barberi</i>	EPA (2008)
	<i>cry1F</i> + <i>cry34Ab1</i> e <i>cry35Ab1</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Agrotis ipsilon</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>Elasmopalpus lignosellus</i> , <i>Diabrotica virgifera</i> , <i>Diabrotica barberi</i> , <i>Diatraea crambidoides</i> , <i>Diatraea grandiosella</i> , <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Striacosta albicosta</i>	EPA (2008)
	<i>cry3A</i> e <i>cry1Ab</i>	<i>Diabrotica virgifera</i> , <i>Diabrotica barberi</i>	EPA (2008)
	<i>cry1A</i> e <i>cry2Ab2</i>	-	EPA (2008)
	<i>cry1A</i> + <i>cry2Ab2</i> e <i>cry3Bb1</i>	-	EPA (2008)
	<i>cry1Ac</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	USDA (2008)
	<i>cry3A</i>	<i>Diabrotica virgifera</i> , <i>Diabrotica barberi</i>	USDA (2008)
Repolho	<i>cry1Ab</i>	<i>Plutella xylostella</i>	Bhattacharya <i>et al.</i> (2002)
Soja	<i>cry1Ac</i>	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Pseudoplusia includens</i>	Stewart <i>et al.</i> (1996a)
Tomate	<i>cry1Ab</i>	<i>Heliothis virescens</i>	Fischolff <i>et al.</i> (1987)
	<i>cry1Ac</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Mandaokar <i>et al.</i> (2000)

Genes de *B. thuringiensis* codificados de proteínas Cry foram isolados e introduzidos em plantas agronomicamente importantes utilizando diferentes métodos de transformação genética como aqueles que empregam *Agrobacterium*, transformação direta de protoplastos e bombardeamento de partículas ou biobalística. No início dos anos 80, o primeiro gene *cry* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (Schnepf & Whitley, 1981), sendo no final dessa década produzida a primeira planta de tomate com genes de *B. thuringiensis* (Fischhoff, 1987). O milho Maximizer™ da Novartis, o algodão Bollgard™ e a batata Newleaf™ da Monsanto foram introduzidas no mercado norte-americano em 1995, sendo genericamente conhecidas como *plantas-Bt* (Jouanin et al., 1998). Atualmente, o *milho-Bt* é a planta transgênica mais cultivada no mundo, ocupando 15% da área global cultivada com transgênicos em países como EUA, Canadá, Argentina, África do Sul, Espanha e França. O *algodão-Bt* ocupa o segundo lugar em áreas plantadas, representando aproximadamente 7% da área cultivada com transgênicos (James, 2000). Além do milho, da batata, do tomate e do algodão, outras plantas cultivadas expressam uma ou várias proteínas Cry para o controle de lepidópteros e coleópteros (Tabela 1) e outras *plantas-Bt* de espécies cultivadas estão em fase de desenvolvimento em laboratórios ou em testes de campo (Oecd, 2001).

Atualmente estão registradas mais de 300 seqüências de genes *cry*, indicando que a próxima geração de *plantas-Bt* deverá apresentar múltiplos genes *cry*, oferecendo aos produtores um maior espectro de proteção contra diferentes insetos-praga e reduzindo a probabilidade dos mesmos desenvolverem resistência.

As pesquisas também estão voltadas para o incremento da expressão dos genes de *B. thuringiensis* em plantas, na seleção de novas variantes de *B. thuringiensis* mais ativas e/ou na modificação das seqüências dos genes *cry* de maneira a aumentar a produção de toxinas no interior das plantas. Nesse sentido, Schuler et al. (1998) relata que uma estratégia para a maior efetividade tóxica das *plantas-Bt* contra insetos seria a introdução de genes nativos de *B. thuringiensis* no genoma dos cloroplastos, o que resulta num elevado nível de expressão. A natureza procariótica dos plastídios vegetais permite a transcrição dos genes de *B. thuringiensis* e a tradução e processamento dos mRNAs de forma mais eficiente. Nesse caso, alguns autores mencionam que o entrave estaria associado à transformação de cloroplastos a qual se restringe apenas a algumas plantas-modelo, como por exemplo tabaco e tomate (Jouanin et al., 1998; Kota et al., 1999).

1.2 Outros genes em plantas

Considerando outros genes de interesse à engenharia genética de plantas, os inibidores de proteinases vegetais são polipeptídios ou proteínas que se encontram naturalmente nas plantas e fazem parte do sistema de defesa das mesmas contra herbívoros. Nos insetos as proteinases são classificadas em diferentes grupos, variando conforme a ordem ou espécie, sendo estas responsáveis pela digestão dos alimentos de onde são assimilados nutrientes essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento dos mesmos.

Os inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas vêm sendo mencionados como inibidores do crescimento e do desenvolvimento de alguns insetos das ordens lepidóptera e coleóptera, respectivamente. A atividade antimetabólica dos inibidores não foi bem elucidada, podendo estes: inibir as enzimas digestivas diretamente; provocarem a hipersecreção de enzimas no intestino provocando o esgotamento dos aminoácidos essenciais; afetarem o balanço hídrico, as trocas e a regulação enzimática dos insetos (Schuler et al., 1998).

Inibidores de alfa-amilases podem ser considerados um segundo inibidor de enzimas, também utilizados na transformação de plantas (Tabela 2). Ensaio realizado com *Callosobruchus* sp. e *Bruchus* sp. mostram que esses inibidores, como alfa-AI-Pv oriundo do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), são glicoproteínas termolábeis que inibem alfa-amilases no intestino médio desses coleópteros pragas de grãos armazenados, bloqueando assim o seu desenvolvimento larval (Schuler et al., 1998).

As lectinas são proteínas naturalmente produzidas por plantas, principalmente pelas leguminosas, como *Glycine max* e *Canavalia ensiformis*, respectivamente. O modo de ação destas proteínas vegetais não foi bem elucidado, mas alguns resultados de pesquisa sugerem que estas se ligam às células epiteliais do intestino dos insetos (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

Dados de pesquisa mostram que várias lectinas identificadas têm efeito inseticida contra diversas ordens de insetos, principalmente coleópteros, hemípteros e homópteros, porém algumas apresentam efeito tóxico para mamíferos, enfatizando assim a necessidade de maiores investigações nessa área (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

Alguns genes de quitinases, peroxidases e triptofano-descarboxilases vêm sendo introduzidos em plantas visando principalmente à resistência a insetos da ordem Homoptera (Schuler et al., 1998). Por outro lado, os conhecimentos sobre os mecanismos de ação desses produtos são restritos devido à elevada complexidade

do sistema.

No controle de pragas de importância agrícola, observa-se que, a possibilidade de obtenção de plantas que sintetizam toxinas letais aos insetos através da transformação vegetal com genes oriundos de outras plantas, microrganismos e animais, abriu novas perspectivas ao Manejo Integrado de Pragas. Outro aspecto importante são as novas alternativas de controle de insetos de difícil acesso através dos métodos convencionais, seja pelo modo de vida subterrâneo ou endofítico da praga alvo.

A utilização de plantas transgênicas resistentes permite o acúmulo do produto (toxina) entomotóxico nos tecidos vegetais, afetando diretamente a espécie alvo quando a mesma se alimenta do tecido transgênico, sem causar danos às espécies não alvo, representando assim um método alternativo para o controle de pragas das plantas cultivadas associado à preservação do meio ambiente.

1.3 Segurança das plantas transgênicas

A liberação comercial das plantas geneticamente modificadas com genes *cry* de *B. thuringiensis*, relatada na publicação de Dunwell (1999), revela que os produtores norte-americanos têm adotado as plantas transgênicas como um elemento chave no aumento da produção vegetal. Esse marco histórico só chegou ao Brasil em 2005, através da regulamentação e liberação do cultivo e comercialização das plantas transgênicas. Para maior detalhamento sobre esse assunto consultar os seguintes sites:

- www.ctnbio.gov.br (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança)
- www.anbio.org.br (Associação Nacional de Biossegurança)

Os dados de revisão de Fontes et al. (2002) relatam a segurança, riscos ambientais e eficiência no controle de pragas através do emprego das *plantas-Bt*. Também os trabalhos de revisão de Bobrowski et al. (2003) e Polanczyk et al. (2003) citam alguns benefícios do uso dessa tecnologia, como:

- Diminuição dos efeitos ambientais sobre as toxinas;
- Segurança na utilização;
- Redução do uso de inseticidas químicos;
- Eficiência no controle das pragas;
- Proteção vegetal;
- Preservação dos inimigos naturais;
- Redução de doenças fúngicas.

1.4 Considerações e perspectivas

Os dados de pesquisa têm revelado que certas espécies de insetos, principal-

Tabela 2. Outros genes utilizados na obtenção de plantas transgênicas resistentes aos insetos (adaptado de Schuler et al., 1998)

GENES / PRODUTOS	INSETOS-ALVO	PLANTAS TRANSFORMADAS / PRODUTOS
CMe (cevada); CMTI (abóbora); MTI-2 (mostarda); PI-IV (soja); KTi3 e SKTI (soja); inibidor de proteinase I e II (tomate); SI (animal); α 1AT(animal)	Lepidoptera	fumo, <i>arabidopsis</i> , batata, alfafe, beladona, tomate
Pot PI-I e Pot PT-II (batata); BPTI (pâncreas bovino); C-II (soja); CpTI (<i>cowpea</i>)	Lepidoptera, Orthoptera	petúnia, fumo, bétula, alface, arroz, batata, trevo branco
	Coleoptera, Lepidoptera	colza, álamo, batata, fumo, maçã, alface, arroz, morango, girassol, batata-doce, tomate
OC-1 (arroz)	Coleoptera, Homoptera	colza, álamo, fumo
anti-quimi tripsina (<i>Manduca sexta</i>), anti-elastase (<i>M. sexta</i>), anti-tripsina (<i>M. sexta</i>)	Homoptera	algodão, fumo, alfafe
Inibidores de alfa-amilase		
WMAI-1 (cereais)	Lepidoptera	fumo
α AI-Pv (feijão)	Coleoptera	feijão, ervilha, fumo
Lectinas		
GNA (anêmona), p-lec (ervilha)	Lepidoptera, Homoptera	uva, colza, batata, arroz, batata-doce, cana-de-açúcar, girassol, fumo, tomate
WGA (trigo), <i>lectina</i> (arroz), <i>jacalin</i>	Lepidoptera, Coleoptera	milho
Outros		
BCH – quitinase (feijão)	Lepidoptera, Homoptera	batata
Quitinase (<i>Manduca sexta</i>)	Lepidoptera	fumo
Quitinase(tomate), Peroxidase(fumo)	Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera	colza, fumo, tomate
TDC (crisântemo)	Homoptera	fumo
14K-CL (bifuncional) *	Lepidoptera, Coleoptera	fumo

* bifuncional: inibidor de proteinases serínicas e de alfa-amilases

mente lepidópteros, têm adquirido resistência às proteínas Cry de *B. thuringiensis*, reforçando assim o compromisso das futuras pesquisas na identificação de novas toxinas inseticidas. Também são considerados importantes os estudos sobre expressão gênica, espectro de ação e especificidade das proteínas inseticidas, permitindo a disponibilização frequente de novas versões gênicas mais eficazes, mais específicas e com vantagens ainda maiores sobre as práticas convencionais de controle de pragas. Ainda para evitar ou retardar o surgimento de resistência de insetos às plantas transgênicas, recomenda-se a adoção de técnicas de manejo adequadas, sendo algumas já relatadas por Peferoen (1997) há mais de uma década.

A aplicação integrada das plantas transgênicas na agricultura convencional, já ultrapassou a aceitação pública da tecnologia dos transgênicos e atualmente representa uma realidade no incremento da produção de alimentos de origem vegetal, com baixo custo e impacto ambiental.

1.5 Referências

- ADAMCZYK, J.J.; ADAMS, L.C.; HARDEE, D.D. 2001. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *Journal of Economic Entomology*, 94:1589-1593.
- ADANG, M.J.; BRODY, M.S.; CARDINEAU, G.; PETERSEN, L.J.; PARKER, G.B.; MCPHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D. E FISCHHOLF, D.A. 1993. The reconstruction and expression of *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Molecular Biology*, 21:1131-1145.
- AHMAD, A.; MAQBOOL, S.B.; RIAZUDDIN, S. E STICKLEN, M.B. 2002. Expression of synthetic *CRYIAB* and *CRYIAC* genes in Basmati rice (*Oryza sativa* L.) variety 370 via *Agrobacterium*-mediated transformation for the control of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38(2):213-220.
- ALAM, M.F.; DATTA, K.; ABRIGO, E.; VASQUEZ, A.; SENADHIRA, D. E DATTA, S.K. 1998. Production of transgenic deep water indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. *Plant Science*, 35:25-30.
- BARTON, K.A.; WHITELEY, R.H. E YANG, N.S. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*, 85:1103-1109.
- BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI. 2003 Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, p.843-50.
- BHATTACHARYA, R.C.; VISWAKARMA, N.; BHAT, S.R.; KIRTI, P.B. E CHOPRA, V.L. 2002. Development of insect-resistant transgenic cabbage plants expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Current Science*, 83:146-150.
- BREITLER, J.C.; CORDERO, M.J.; ROYER, M.; MEYNARD, D.; SAN SEGUNDO, B. E GUIDERDONI, E. 2001. The "689/+197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound inducible expression of the *cryIB* gene which protects transgenic rice plants from stem-borer attack. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 7:259-274.
- BREITLER, J.C.; MARFA, V.; ROYER, M.; MEYNARD, D.; VASSAL, J.M.; VERCAMBRE, B.; FRUTOS R.; MESSEGUER, J.; GABARRA, R. E GUIDERDONI, E. 2000. Expression of a *Bacillus thuringiensis cryIB* synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Reports*, 19:1195-1202.
- BREITLER, J.C.; VASSAL, J.N.; CATALA, M.D.M.; MEYNARD, D.; MARFA, V.; MELE, E.; ROYER, M.; MURILLO, I.; SEGUNDO, S.B.; GUIDERDONI, E.E.; MESSEGUER, J. 2004. *Bt* rice harboring *cry* genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter, protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 2:417-430.
- CARLSON, C.R.; CAUGANT, D.A. & KOLST, A.B. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, p. 1719-1725.
- CARLINI, C. & GROSSI-DE-SÁ, M. F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515-39.
- CHAKRABARTI, S. K.; MANDAOKAR, A. D.; SHUKLA, A.; PATTANAYAK, D.; NAIK, P. S.; SHARMA, R. P.; KUMAR, P. A. 2000. *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ab genes confers resistance to potato against

- Helicoverpa armigera* (Hübner). *Potato Res.*, 43: 143 – 152.
- CHEN, H.; TANG, W.; XU, C.; LI, X.; LIN, Y. E ZHANG, Q. 2005. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *Theoretical and Applied Genetics*, 111:1330–1337.
- CHENG, X.; SARDANA, R.; KAPLAN, H. E ALTOSAAR, I. 1998. *Agrobacterium* transformed rice plants expressing synthetic *cry1Ab* and *cry1Ac* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95:2767–2772.
- COOMBS, J.J.; DOUCHES, D.S.; LI, W.B.; GRAFIUS, E.J. E PETT, W.L. 2002. Combining engineered (*Bt-cry3A*) and natural resistance mechanisms in potato for control of Colorado potato beetle. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127:62-68.
- CORNU, D.; LEPLÉ, J.C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; ROSS, A.; AUGUSTIN, S.; DELPLANQUE, A.; JOUANIN, L. E PILATE, G. 1996. Expression of proteinase inhibitor and a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic poplar, p.131-136. In: *Proceedings IUFRO Meeting on Somatic Cell Genetics and Molecular Genetic of Trees*. Kluwer, Dordrecht, 287 p.
- DATTA, K.; VASQUEZ, A.; TU, J.; TORRIZO, L.; ALAM, M.F.; OLIVA, N.; ABRIGO, E.; KHUSH, G.S. E DATTA, S.K. 1998. Constitutive and tissue-specific differential expression of the *cry1A(b)* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theoretical and Applied Genetics*, 97:20-30.
- DE MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Sciences*, London, v.4, p.9-13.
- DIEHN, S.H., DE ROCHER, E.J., GREEN, P.G. 1996. Problems that can limit the expression of foreign genes in plants: lessons to learned from *Bt* toxin genes. In: Setlow, J.K., ed., *Genetic Engineering: Principles and Methods*, v.18, New York, NY, Plenum Press, p. 83-89.
- DUNWELL, J.M. 1999. Transgenic crops: the next generation, or an example of 2020 vision. *Annals of Botany*, Kent, v.84, p.269-277.
- EPA. United State Environmental Protection Agency. Plant Incorporated Protectants: Insect Resistance Management. 2008. Disponível: <http://www.epa.gov/oppbpd1/biopesticides/pips>. Acessado em: 30 de nov. de 2008.
- ESTRUCH, J.J., CAROZZI, N.B., DESAI, N., DUCK, N.B., WARREN, G.W., KOZIEL, M. 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*, 15: 137-141.
- FISCHHOLFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KATZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G. E FINLEY, R.T. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *BioTechnology*, 5:807-813.
- FONTES, E.M.G.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.; PANIZZI, A.R. 2002. Tehe environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. *Neotropical Entomology*, 31 (4): 497-513.
- GHAREYAZIE, B.; FARAMARZ, A.; CORAZON, A.M.; RUBIA, L.G.; PALMA, J.M.; LIWANAG, E.A.; COHEN, M.B.; KHUSH, G.S. E BENNETT, J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cry1A(b)* gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 5:401-414.
- HALFHILL, M.D.; RICHARDS, H.A.; MABON, S.A.; STEWART, C.N.Jr. 2001. Expression of *GFP* and *Bt* transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet*. 103:659–667.
- HAN, L.; WU, K.; PENG, Y.; WANG, F. E GUI, Y. 2007. Efficacy of transgenic rice expressing *Cry1Ac* and *CpTI* against the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(1): 71-79.
- HUSNAIN, T.; ASAD, J.; MAQBOOL, S.B.; DATTA, S.K. E RIAZUDDIN, S. 2002. Variability in expression of insecticidal *Cry1Ab* gene in Indica Basmati rice. *Journal Euphytica*, 128(1):121-128.
- IANNACONE, R.; GRIECO, P.D. E CELLINI, F. 1997. Specific sequence modifications of a *cry3B* endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance. *Plant Molecular Biology*. 34: 485–496.
- JAMES, C. 2000. Global status of commercialized transgenic crops: 2000. ISAAA Briefs, ISAAA, Ithaca, n.21, p.45.
- JANSEN, S.; VANVLIEET, A.; DICKBURT, C.; BUYSE, L.; PIENS, C.; SAEY, B.; DE WULF, A.; GOSSELE, V.; PAEZ, A. E GOBEL, E. 1997. Transgenic corn expressing a *cry9C* insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. *Crop Sci.*, 37:1616-1624.
- JELENKOVIC, G.; BILLINGS, S.; CHEN, Q.; LASHOMB, J. HAMILTON, G. E GHIDIU, G. 1998. Transformation of eggplant with synthetic *cryIIIA* gene produces a high level of resistance to the Colorado potato beetle. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123:19-25.
- JENKINS, J.N., PARROT, W.L., MCCARTY, J.C., JR, CALLAHAN, F.E., BERBERICH, S.A., DEATON, W.R. 1991. Growth and survival of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton containing a truncated form of the delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *Journal Economic Entomology*, 86:181-185.
- JOUANIN, L. et al. 1998. Transgenic plants for insect resistance – review. *Plant Science*, Shannon, v.131, p.1-11.
- KHANNA, H.K. E RAINA, K. 2002. Elite Indica transgenic rice plants expressing modified *Cry1Ac* endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Transgenic Research*, 11:411-423.
- KOTA, M.; DANIELL, H.; VARMA, S.; GARCZYNSKI, S.F.; GOULD, F. E MOAR, W.J. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) *cry2Aa2* protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and *Bt*-resistant insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96:1840-1845.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, M.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; MC PHERSON, D.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M. E EVOLA, S.V. 1993. Field performance of elite transgenic corn plants expressing insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *BioTechnolog*, 11:194-200.
- KUMAR, P.A.; MANDAOKAR, A.; SREENIVASU, K.; CHAKRABARTI, S.K.; BISARIA, S.; SHARMA, S.R.; KAUR, S. E SHARMA, R.P. 1998. Insect-resistant transgenic brinjal plants. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*. 4:33-37.
- LOC, N.T.; TINJUANGJUN, P.; GATEHOUSE, A.M.R.; CHRISTOU, P. E GATEHOUSE, J.A. 2002. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 9:231-244.
- MANDAOKAR, A.D.; GOYAL, R.K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHARMA, R.P.; ALTOSAAR, I. E KUMAR, P.A. 2000. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hübner). *Crop Protection*, 19:307-312.
- MAQBOOL, S.B.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S.; MASSON, L. E CHRISTOU, P. 1998. Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel δ -endotoxin *cryIIIA* *Bacillus thuringiensis* gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 6:1-7.

- MCBRIDE, K.E.; SVAB, Z. SCHAAF, D.J.; HOOGAN, P.S.; STALKER, D.M. E MALIGA, P. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal pre-protein in tobacco. *BioTechnology*, 13:362-365.
- MCCOWN, B.H.; MCCABE, D.E.; RUSSELL, D.R.; ROBISON, D.J.; BARTO, K.A. E RAFFFA, K.F. 1991. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 9:590-594.
- NAYAK, P.; BASU, D.; DAS, S.; BASU, A.; GHOSH, M. E SEN, S.K. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94:2111-2116.
- OECD, 2001. Transgenic plants registration. Capturado da internet em dezembro de 2001. On-Line. Disponível no site: <http://www.oecd.gov>.
- PEFEROEN, M. 1992. Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. In: A.M.R.; Hilder, V.A. e Boulter, D. (eds), *Plant Genetic Manipulation for Crops Protection*, Wallingford, UK: CAB. p. 135-153.
- PEFEROEN, M. 1997. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. *Trends in Biotechnology*, Cambridge, v.15, p.173-177.
- PERLAK, F.J., DEATON, R.W., ARMSTRONG, T.A., FUCHS, R.L., SIMS, S.R., GREENPLATE, J.T., FISCHHOFF, D.A. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/technology*, 8: 939-943.
- PERLAK, F.J., FISCHHOFF, D.A. 1993. Insect resistant cotton: from the laboratory to the marketplace. In: Kim, L. ed., *Advanced Engineered Pesticides*, New York, NY/Basel/Hong Kong: Marcel Dekker, p.199-211.
- PERLAK, F.J., FUCHS, R.L., DEAN, D.A., MCPHERSON, S.L., FISCHHOFF, D.A. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect cotton protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88: 3324-3328.
- PERLAK, F.J., OPPENHUIZEN, M., GUSTAFSON, K. VOTH, R., SIVASUPRAMANIAM, S., HEERING, D., CAREY, B., IHRING, R.A., ROBERTS, J.K. 2001. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA – early promises versus today's reality. *The Plant Journal*, 27 (6): 489-501.
- POLANCZYK, R.A.; MARTINELLI, S.; OMOTO, C.; ALVES, S.B. 2003. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 31: 18-27.
- RICO, E.; BALLESTER, V. E MENSUA, J.L. 1998. Survival of two strains of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on transgenic potatoes expressing a *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Agronomie*, 18:151-155.
- SCHNEPE, E.; WHITELEY, H.R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Washington, v.78, p.2893-2897.
- SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, Cambridge, v.16, p.168-174.
- SELVAPANDIYAN, A.; REDDY, V.S.; KUMAR, P.A.; TEWARI, K.K.; BHATNAGAR, R.K. e 1998. Transformation of *Nicotiana tabacum* with a native *cryIIa5* gene confers complete protection against *Heliothis armigera*. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 4:473-478.
- SHU, Q.Y.; YE, G.Y.; CUI, H.R.; CHENG, X.Y.; XIANG, Y.B.; WU, D.X.; GAO, M.W.; XIA, Y. W.; HU, C.; SARDANA, R. E ALTOSAAR, I. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 6:433-439.
- SINGSIT, C.; ADANG, M.J.; LYNCH, R.E.; ANDERSON, W.F.; WANG, A.; CARDINEAU, G. E OZIAS-AKINS, P. 1997. Expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer. *Transgenic Research*. 6(2):169-176.
- STEWART. C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; BOERMA, H.R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D. E PARROT, W.A. 1996a. Genetic transformation recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene. *Plant Physiology*, 112:121-129.
- STEWART. C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; RAMACHANDRAN, S. E PARROTT, W.A. 1996b. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene. *Plant Physiology*, 112:115-120.
- STRIZHOV, N.; KELLER, M.; MATHUR, J.; KONCZ-KALMAN, K.; BOSCH, D.; PRUDOVSKY, E.; SCHELL, J.; SNEH, B.; KONCZ, C. E ZILBERSTEIN, A. 1996. A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93:1512-15017.
- TANG, W.; CHEN, H.; XU, C.; LI, X.; LIN, Y. E ZHANG, Q. 2006. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C** gene. *Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement*, 18(1):1-10.
- TU, J.M.; ZHANG, G.A.; DATA, K.; XU, C.G.; HE, Y.Q.; ZHANG, Q.F.; KHUSH, G.S. E DATTA S.K. 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nature Biotechnology*, 18:1101-1104.
- USDA. United State Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service. U.S. Database of Completed Regulatory Agency Reviews. 2008. Disponível: <http://usbiotechreg.nbio.gov>. Acessado em: 30 de nov. de 2008.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DEBEUCKLEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M. E LEEMANS, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 327:33-37.
- VAN DER SALM, T., BOSCH, D., HONEE, G., FENG, L., MUNSTERMAN, E., BAKKER, P., STIEKEMA, W.J., VISSER, B. 1994. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* cryIA (b) and cryIC genes: a resistance management strategy. *Plant Molecular Biology*, 26: 51-59.
- WILLIAMS, S.; FRIEDRICH, L.; DINCHER, S.; CAROZZI, N.; KESSMANN, H.; WARD, E. E RYALS, J. 1993. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expression in transgenic plants. *BioTechnology*, 7:194-200.
- WU, C.; FAN, Y.; ZHANG, C.; OLIVA, N. E DATTA, S.K. 1997. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified *cryIAb* gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports*, 17:129-132.
- WUNN, J.; KLOTI, A.; BURKHARDT, P.K.; BISWAS, G.C.C.; LAUNIS, K.; INGLESIAS, V.A. E POTRYKUN, I. 1996. Transgenic indica rice breeding line IR 58 expressing a synthetic *cryA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective pest control. *BioTechnology*, 14:171-176.
- YE, G.Y.; YAO, H.W.; SHU, Q.Y.; CHENG, X.; HU, C.; XIA, Y.W.; GAO, M.W. E ALTOSAAR, I. 2003. High level of stable resistance in transgenic rice with a *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) under field conditions. *Crop Protection*, 22:171-178.
- ZHAO, J.Z.; LI, Y.X.; COLLINS, H.L.; CAO, J.; EARLE, E.D. E SHELTON, A.M. 2001. Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin *cryIC*. *Journal of Economic Entomology*, 94:1547-1552.

