



# MILHO Bt

Alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga

## Leandro Lopes Loguercio

Pb.D. Biologia Molecular  
leandro@uesc.br  
Dept. Ciências Biológicas  
Universidade Estadual de Santa Cruz  
Ilhéus, BA

## Newton Portilho Carneiro

Pb.D. Biologia Molecular  
newtonc@cpqms.embrapa.br

## Andréa Almeida Carneiro

Pb.D. Biologia Molecular  
andrea@cpqms.embrapa.br  
EMBRAPA Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG

Fotos cedidas pelos autores

**Figura 1:** Resultado da ação da “lagarta-do-cartucho” (*Spodoptera frugiperda*) alimentando-se em folhas de milho

No Brasil, são produzidas, em média, 30 milhões de toneladas de grãos de milho (*Zea mays*) por ano, provenientes de, aproximadamente, 57% da área nacional ocupada com cultivo de cereais. Por ser uma fonte barata de carboidratos, proteínas e óleo, com uma ampla distribuição geográfica, o milho não somente é utilizado de forma direta na dieta humana e de animais, como também tem valor industrial para produção de bebidas, medicamentos, tintas, plásticos, explosivos, etc. Assim, considerada como uma importante cultura para as necessidades atuais da sociedade moderna, a demanda de consumo e de mercado de milho vem sofrendo contínuo aumento, tanto em níveis nacionais como mundiais. A própria elevação do consumo de derivados de aves e suínos exige indiretamente aumento na disponibilidade de milho, devido à sua incorporação nas rações de crescimento. Para enfrentar tal situação com auto-suficiência e independência tecnológica, é necessário incrementar a produtividade da

cultura por área plantada, tanto com estratégias de redução de custos quanto com a incorporação de novas tecnologias ao processo de produção; nesse contexto, torna-se fundamental o desenvolvimento de germoplasma mais produtivo e adaptado aos diversos sistemas de cultivo, bem como a condições edafo-climáticas marginais, sujeitas a inúmeros fatores bióticos e abióticos de estresse à cultura.

Raças adaptadas da ‘lagarta-do-cartucho’ (ordem: Lepidoptera; espécie: *Spodoptera frugiperda*) compõem uma das mais importantes pragas que afetam genótipos tropicais de milho (Figura 1), chegando a causar até 34% de redução na produção dessa cultura no Brasil (Cruz, 1995). Tradicionalmente (pós-‘Revolução Verde’), o controle de tal praga é realizado com base em inseticidas químicos, que, intrinsecamente, podem trazer consequências colaterais negativas em termos de toxicidade ao homem dos animais e ao meio-ambiente em geral. Historicamente, o uso abusivo e impróprio desses produtos sintéticos nos últimos 40 anos causaram vários problemas ambientais e de saúde, ameaçando sobremaneira a sustentabilidade do sistema de produção agrícola convencional. Como alternativa a essa sistemática de controle, há o chamado ‘Manejo Integrado de Pragas’ (MIP), que consiste na utilização inteligente das várias medidas de controle disponíveis, visando a atingir eficiência econômica com consciência ecológica e social. Dentre essas medidas, o ‘Controle Biológico’ (CB) figura como importante sistema que aproveita os ‘inimigos naturais’ das pragas – insetos predadores e parasitoides, fungos e bactérias parasitas, e as substâncias e produtos deles derivados –, compreendendo sua biologia e utilizando adequa-



**Tabela 1:** Principais eventos de transformação de milho Bt disponíveis no mercado

eventos	nome comercial	empresa fornecedora
176	<i>KnockOut</i>	Novartis
	<i>NaturGard</i>	Mycogen
Bt 11	<i>YieldGard</i>	Novartis
Mon810	<i>YieldGard</i>	Monsanto
DBT418	<i>Bt-Xtra</i>	Dekalb
CBH351	<i>StarLink</i>	Aventis

mente os mecanismos ecológicos de interação entre eles. Dessa forma, ganha-se na redução dos custos de produção, na não-intoxicação do aplicador de produtos químicos, na não-poluição e degradação das áreas agrícolas e relacionadas, e, portanto, na preservação da saúde pública e ambiental. Apesar de todos esses benefícios, contudo, apenas 1% das pragas e doenças da agricultura, infelizmente, tem sido controlado por CB, como veremos a seguir. Nesse contexto, a ação da pesquisa torna-se fundamental para a reversão do quadro.

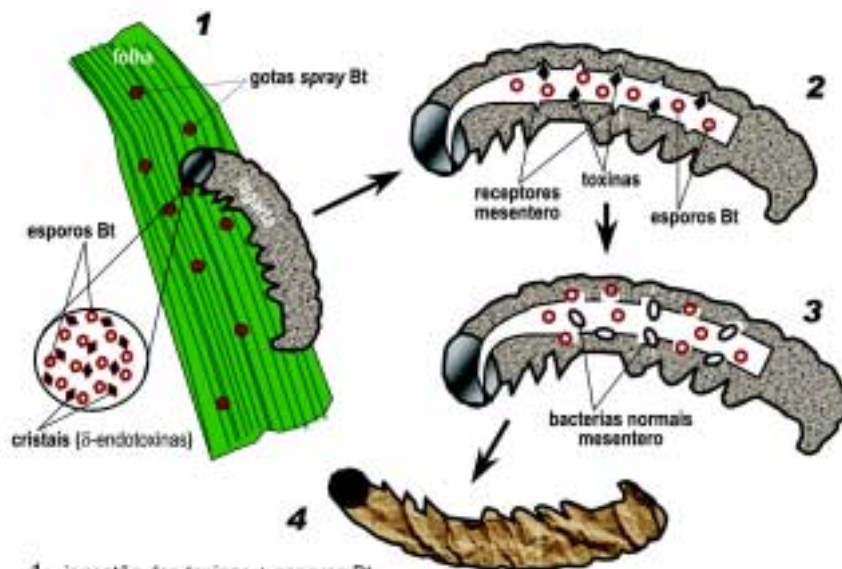
### Controle Biológico (CB) e *Bacillus thuringiensis* (Bt)

A espécie bacteriana de solo *Bacillus thuringiensis*, muito conhecida pela sua forma abreviada 'Bt', é de ocorrência cosmopolita, sendo encontrada nos mais diversos ecossistemas do planeta. O gênero *Bacillus* possui uma fase de esporulação característica no seu desenvolvimento, na qual o esporo bacteriano e cristais protéicos são simultaneamente formados, sendo estes últimos sob forma de inclusões parasporais. Tais cristais em Bt, também chamados de 'δ-endotoxinas' ou 'ICPs' (do inglês *insecticidal crystal proteins*), e codificados pelos chamados genes *cry*, vêm sendo utilizados na formulação de *sprays* bioinseticidas comerciais, que forneceram níveis adequados e consistentes de CB para diversas espécies de insetos-praga na agricultura (Estruch *et al.*, 1997; Schnepf *et al.*, 1998). Essas formulações inseticidas, que incluem misturas de esporos e de cristais de Bt produzidos em grandes volumes de culturas bacterianas tiveram seu início na década de 1930 mas somente a partir do fim dos anos 50 foi que se iniciou sua produção em larga escala industrial, com o lançamento comercial do *spray* inseticida 'Thuricide™', imediatamente

te seguido por produtos similares de outras empresas (Maagd *et al.*, 1999). Uma das principais e importantes características das proteínas inseticidas CRY é sua alta especificidade em relação às espécies-alvo de insetos afetados. A especificidade dessas toxinas deve-se a uma co-evolução de proteínas receptoras de superfície no intestino médio (mesentero) dos insetos-alvo sensíveis; esses receptores ligam-se de forma específica às δ-endotoxinas, modificando sua conformação e causando vazamento de íons e dano osmótico das células, o que conduz, conseqüentemente, à desintegração do mesentero e a morte do inseto (Figura 2). Esse efeito tóxico seletivo não se estende a outros organismos que não tenham tais receptores compatíveis, tornando as ICPs inertes a seres humanos, peixes, animais selvagens e a outros insetos benéficos (inimigos naturais), que podem auxiliar no

CB da praga-alvo, além de outras.

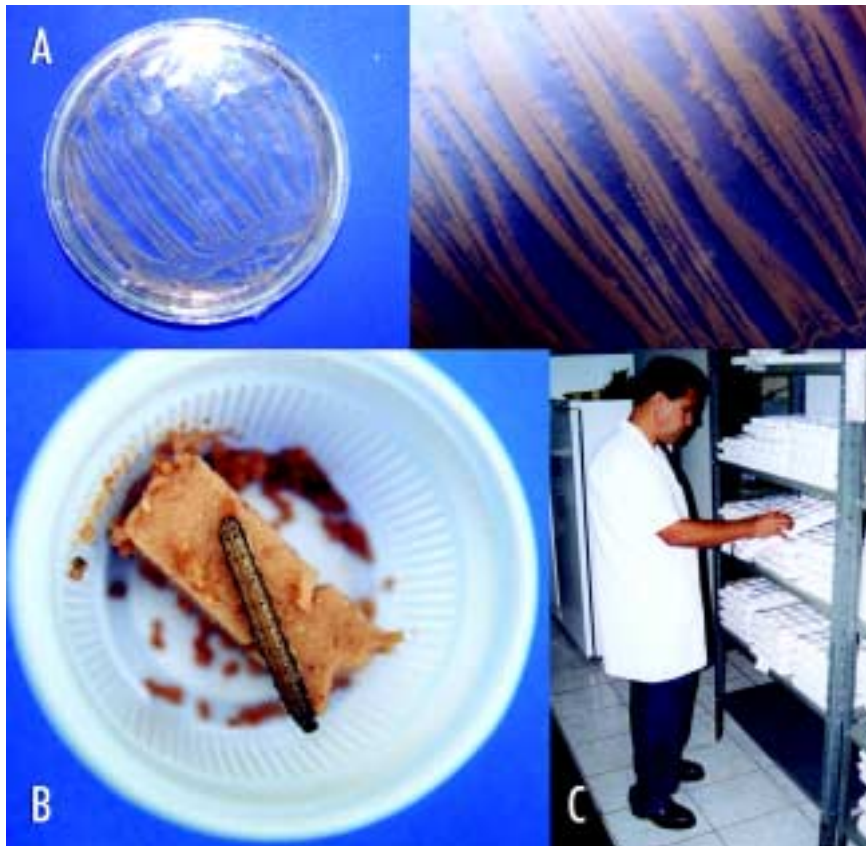
Diversas formas dessas δ-endotoxinas são sintetizadas em diversas combinações por várias diferentes cepas de Bt já identificadas e catalogadas (Crickmore *et al.*, 1998), os quais possuem distintos espectros, especificidades e eficiências de ação inseticida. Contudo, apesar do custo baixo e da segurança ambiental oferecido por esse sistema de CB, os *sprays* bioinseticidas do tipo 'Thuricide™' nunca ocuparam uma fatia significativa do mercado de inseticidas, tendo sido predominantemente utilizados em sistemas de agricultura orgânica e manejo de florestas. Algumas razões servem para explicar tal fato, tais como (I) a reduzida persistência das toxinas puras sobre a planta por tempo suficiente para a ação entomocida eficaz, (II) o difícil acesso da toxina à praga, pelas suas características físico-químicas, e (III) os ainda elevados custos de fabricação desses bioinseticidas (Maagd *et al.*, 1999). Nesse contexto, visando a aprimorar a eficácia das formulações inseticidas e a reduzir custos, percebe-se a necessidade premente de se continuar identificando novas cepas de Bt e novas toxinas com espectro de ação e eficácia diferenciadas, além de testar diferentes combinações delas em relação a insetos-alvo específicos.



- 1 - ingestão das toxinas + esporos Bt
- 2 - ligação das toxinas com receptores específicos do intestino médio
- 3 - degradação das paredes do mesentero e invasão de bactérias e esporos
- 4 - morte por fome + infecção generalizada (septicemia)

**Figura 2:** Esquema da ação das toxinas Bt no intestino médio de insetos suscetíveis





**Figura 3:** Aspectos da sistemática de bioensaios de mortalidade de lagartas-do-cartucho em laboratório. (A) crescimento de *Bacillus thuringiensis* (Bt) em meio sólido (para produção de cristais entomotóxicos); (B) lagarta crescida individualmente em dieta artificial, onde são aplicados os tratamentos inseticidas; (C) visão geral do laboratório de criação de insetos, mostrando suportes contendo as lagartas-do-cartucho utilizadas nos bioensaios

### Expressão heteróloga de genes 'Bt' em plantas

O progresso atual dos conhecimentos no campo da Engenharia Genética e da Biotecnologia Moderna tem permitido o desenvolvimento de alternativas concretas para viabilizar um emprego mais amplo do CB de pragas na cultura do milho. Dentre elas, destaca-se a possibilidade de obtenção e uso de plantas transformadas que contêm genes codificadores das entomotoxinas de Bt. Os níveis e localização da expressão dos genes Bt na planta transformada podem ser regulados, permitindo a presença contínua da toxina em todo o corpo da planta ou somente nas partes relevantes, dependendo dos hábitos de ataque do(s) inseto(s)-alvo; resolver-se-ia, assim, muitos dos problemas citados de persistência da(s) toxina(s) e do acesso da praga. Outro resultado importante desse processo seria a incorporação de novos genes ao

pool utilizado pelo melhoramento genético clássico, ampliando as perspectivas de desenvolvimento de variedades de milho mais produtivas, mais protegidas, e com perspectiva de um sistema de produção menos agressivo ao ambiente.

Promotores de expressão constitutiva (ex: CaMV 35s), induzidos por ferimentos e/ou por agentes químicos e promotores de tecido-específico (ex: subunidade menor da Rubisco) demonstraram eficiência semelhante no acúmulo de elevados níveis de Cry1Ab ou Cry1Ac em transgênicos de milho, oferecendo adequada proteção contra repetidas e extremamente altas infestações do inseto alvo (Kozziel *et al.*, 1993; Maagd *et al.*, 1999). O fato de os promotores de tecido-específico (expressos somente nas partes da planta atacadas pelo inseto) terem funcionado tão eficientemente quanto o constitutivo, os torna a 1ª escolha para um programa de melhoramento que vise a

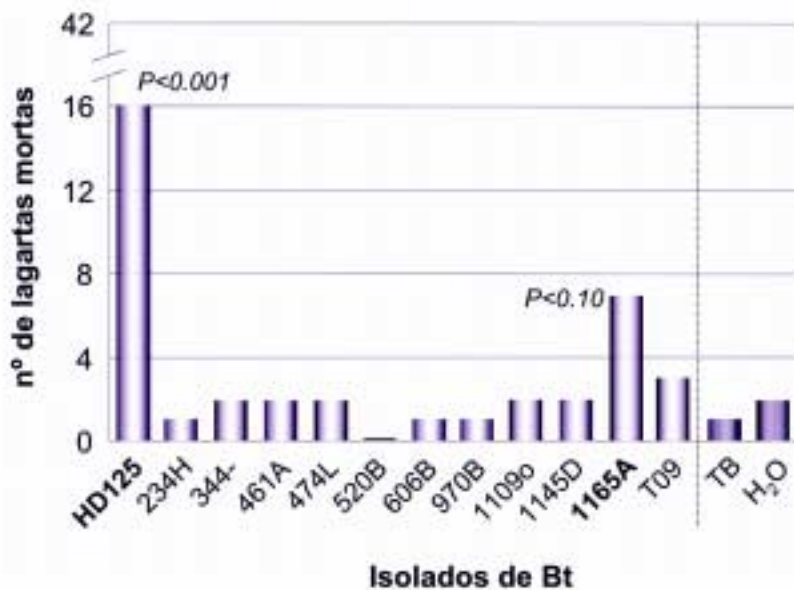
liberação comercial dos transgênicos, já que permite evitar a expressão da toxina em partes da planta a serem usadas para consumo – nesse caso, os grãos de milho. Do ponto de vista de biossegurança e opinião pública, isso é extremamente desejável.

Outro aspecto a considerar refere-se à diferente composição nucleotídica (proporção de bases A+T / G+C) de um gene procaríota – ex: *Cry1Ab* – em relação a genes de plantas. Devido à degeneração do código genético, onde mais de um códon codifica um mesmo aminoácido, genes com composição nucleotídica substancialmente diferente da encontrada num certo organismo terão sua expressão sensivelmente reduzida pela falta de RNA transportadores (tRNAs) apropriados. Foi necessário alterar sinteticamente a composição nucleotídica do *Cry1Ab*, elevando seu conteúdo G+C de 38% (típico de Bt) para 65% (próximo dos valores médios dos genes de milho), para que a sua expressão fosse adequada (Kozziel *et al.*, 1993; Sardana *et al.*, 1996).

Alguns exemplos de eventos de transformação de milho contendo, principalmente, o gene *Cry1Ab* (com e sem alteração de frequência de códons) já foram desenvolvidos e estão disponíveis no mercado, apesar de todos eles serem com especificidade direcionada para a 'broca-européia-do-milho', praga de maior significância econômica para as lavouras norte-americanas e europeias (Tabela 1).

### Banco de isolados tropicais de Bt

Considerando nossas condições específicas de clima, solo, genótipos tropicais de milho, sistemas de produção e pragas mais importantes economicamente, o Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo (NBA/CNPMS) iniciou recentemente um trabalho de coleta de amostras de solo das mais diversas regiões do Brasil, isolando e caracterizando cepas de Bt quanto à sua eficiência no controle de lagartas-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*). Atualmente, esse banco de isolados de Bt possui mais de 3.500 entradas, constituindo-se numa fonte significativa de potenciais toxinas alternativas, bem como de novos espectros e especificidades de ação. A estratégia de caracterização rápida e preliminar desse banco consiste em



**Figura 4:** Efeitos entomotóxicos presentes na proteína total precipitada dos sobrenadantes de 12 isolados de Bt, analisados em bioensaios de mortalidade em laboratório

utilizar, simultaneamente bioensaios de mortalidade de *Spodoptera sp* (Figura 3) e reações de polimerização em cadeia (PCR) com *primers cry*-específicos (Valicente et al., 2000; Loguercio et al., 2001a). Verificou-se a existência de correlações entre presença/ausência de genes *cry* detectados por PCR e maiores/menores efeitos de mortalidade em lagartas-do-cartucho, as quais são alimentadas em laboratório com dietas artificiais embebidas em 'péletes' de culturas de bactérias (cristais + esporos), oriundos dos diferentes isolados de Bt da coleção. Os resultados têm demonstrado uma diversidade genética marcante entre cepas, com diferentes combinações de genes *cry* associadas a distintas eficiências de controle em *Spodoptera sp.*, conforme exemplificado nas Tabelas 2 e 3. Ou-

tros resultados interessantes referem-se à significativa associação encontrada entre presença do gene *cryIE* e elevados índices de mortalidade dessas lagartas em bioensaios de laboratório (Loguercio et al., 2001a). Espera-se, como consequência desses estudos, definirem-se genes *cry* mais eficientes em CB para nossas condições de cultivo e agroecossistemas, não somente em relação à lagarta-do-cartucho, mas também para outras pragas de importância econômica para o milho (Cruz et al., 1999), cuja pesquisa se encontra em fase de implantação no CNPMS.

#### Toxinas alternativas de Bt com ação inseticida - proteínas 'VIP'

Na tentativa de explorar o potencial máximo desses bioinseticidas de baixís-

simo impacto no meio-ambiente e de torná-los economicamente viáveis de forma que se incentive seu uso, bancos e coleções de Bt têm sido aproveitados como base para buscas de novas cepas que contenham toxinas com novas especificidades e em espectros alternativos de espécies sensíveis de insetos-praga, já que a plasticidade genética em Bt é marcadamente elevada devido a elementos transponíveis e a genes para conjugação bacteriana presentes em plasmídeos portadores de genes *cry* (Schnepf et al., 1998). O objetivo seria não somente aumentar a eficiência e reduzir os custos de formulações de *sprays* ICPs tradicionais, mas também fornecer alternativas úteis e importantes para sua utilização em estratégias biotecnológicas de CB. Recentemente, uma nova classe de proteínas entomocidas foi identificada como sendo secretada no sobrenadante de culturas de certas cepas de Bt em fase logarítmica de crescimento (Estruch et al., 1996; Yu et al., 1997). Essas proteotoxinas receberam a denominação de 'VIPs' (do inglês *vegetative insecticidal proteins*), tendo demonstrado ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparadas a muitas  $\delta$ -endotoxinas (proteínas CRY). Além disso, são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando assim sua obtenção. A forma de ação das VIPs é similar à das CRY, isto é, destruição da função digestiva dos insetos-alvo (Figura 2), apesar de os tipos de receptores de membrana das células do intestino médio parecerem ser de natureza distinta (Yu et al., 1997).

Em bioensaios de mortalidade de lagartas-do-cartucho recentemente realizados em nosso laboratório, foi identificada uma cepa contendo significativa ação entomocida na fração proteínica total precipitada a partir de seu sobrenadante de cultura (Figura 4). Análise por PCR utilizando primers *Vip3A*-específicos, desenhados para amplificar o gene completo e 2 fragmentos sobrepostos revelaram uma única banda de tamanho esperado para as combinações de primers testadas, cuja identidade com gene *Vip3A* previamente descrito (Estruch et al., 1996) foi confirmada por seqüenciamento de DNA (Figura 5). Cromatografia de troca-iônica dessa proteína total em colu-

**Tabela 2.** Distribuição de 3.408 isolados tropicais de Bt em diferentes classes de mortalidade contra lagarta-do-cartucho

Mortalidade (%) *	nº de isolados de Bt
0	1.218
1 - 25	1.605
25 - 50	298
50 - 75	176
75 - 96	86
100	25

\* % média de, pelo menos, 2 experimentos com bioensaios de mortalidade, cada um com 24 lagartas alimentadas individualmente com dietas artificiais embebidas em suspensão de esporos, cristais e cápsulas bacterianas de cada cepa (24 lagartas/cepa)

**Tabela 3.** Distribuição de 60 isolados de Bt em diferentes classes de mortalidade contra lagartas-do-cartucho e respectivas combinações de 3 genes *cry* detectados por PCR

Mortalidade lagartas (%)	nº de isolados de Bt	nº de isolados contendo <i>cry</i> :				
		nenhum*	1C	1C+1D	1C+1E	1C+1D+1E
0 - 10	25	4	18	-	3	-
10 - 20	8	3	4	1	-	-
20 - 40	9	5	3	1	-	-
40 - 60	2	1	1	-	-	-
60 - 75	2	1	-	-	1	-
75 - 90	1	-	-	-	1	-
90 - 100	13 (1) §	-	3	1	7	2

\* Isolados onde nenhum dos quatro genes *cry* estudados (1C, 1D, 1E and 1F) foram detectados.

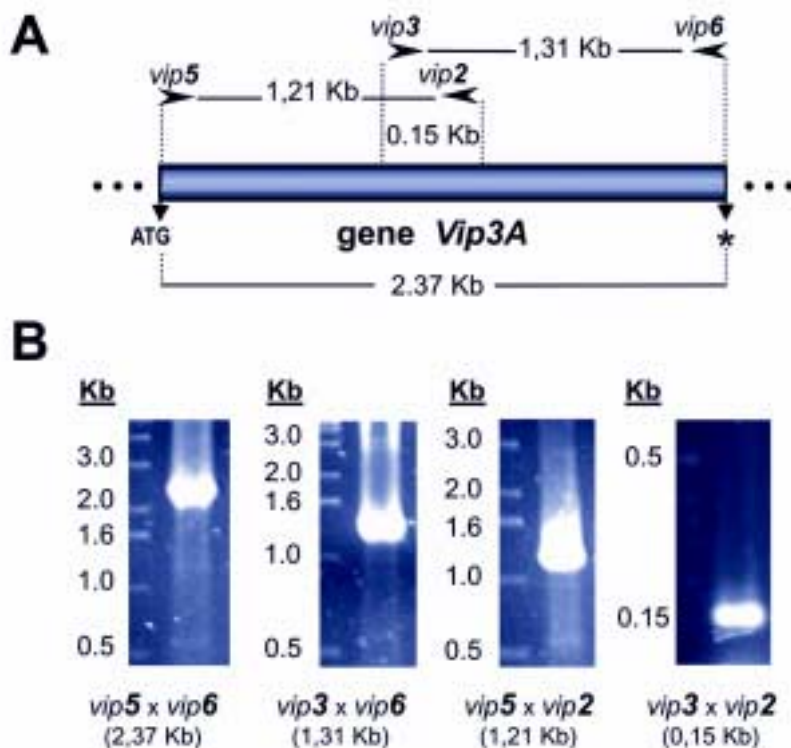
§ O nº entre parêntesis corresponde à proporção real de isolados de Bt encontrados para a respectiva classe de mortalidade, dentro de uma amostra aleatória de 48 isolados; outros 12 isolados foram adicionados com base nos dados de mortalidade para aumentar o tamanho relativo da classe

na de DEAE-celulose permitiu a separação preliminar da fração contendo o peptídeo de peso molecular correspondente à VIP, sendo que a sua atividade inseticida foi confirmada por novos bioensaios, utilizando dietas artificiais embebidas nessa fração eluída da coluna. O gene completo foi obtido por PCR (Figura 5) e clonado em vetor apropriado para expressão em plantas

(Figura 6), conforme metodologia previamente descrita (Carneiro et al., 2000). Atualmente, plantas de milho transformadas com esse gene isolado, 99,8% idêntico ao *Vip3A*, estão sendo testadas em experimentos de bioensaio de mortalidade de lagartas-do-cartucho, utilizando as folhas *in natura* dessas plantas transformadas como fonte exclusiva de alimento. Alguns

resultados preliminares têm sugerido uma ação entomocida relativamente baixa, apesar de perfeitamente justificáveis pelo fato da seqüência de nucleotídeos do gene bacteriano isolado e clonado não ter sido alterada para satisfazer a freqüência de códons (tRNAs) existente nas células de milho; experimentos de transformação de cloroplastos de milho (cuja freqüência de códons e tRNAs é mais semelhante às normalmente encontradas em bactérias) deverão permitir uma ação inseticida mais eficiente. Cabe salientar, contudo, que uma ação entomocida menos vigorosa que não elimine indivíduos suscetíveis, mas, sim, apenas aumente o ciclo vital da praga, reduzindo significativamente os níveis de dano econômico, poderá ser útil em estratégias de prevenção de desenvolvimento da resistência às toxinas Bt pelos insetos-alvo (ver adiante).

A técnica de PCR nas condições empregadas permitiu a detecção de outras seqüências com alta identidade de nucleotídeos em relação ao gene *Vip3A*, em diversos outros isolados de nossa coleção. Contudo, ao menos em bioensaios realizados diretamente com a fração protéica total de seus sobrenadantes, não foi possível detectar efeitos entomotóxicos na lagarta-do-cartucho (ex. - Figura 4). Alinhamento múltiplo dessas seqüências evidenciou uma maior dissimilaridade em relação ao *Vip3A* previamente descrito, apesar de a identidade global de nucleotídeos ser ainda muito alta. Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que, apesar de freqüente a presença de genes *Vip3A* em germoplasma tropical de Bt, tais genes são distintos



**Figura 5:** (A) Esquema da localização relativa no gene dos primers utilizados para os experimentos de PCR e o isolamento do 'Vip3A'; (B) Resultados de amplificação para a cepa HD125, confirmando a presença do gene, que demonstrou ser 99,8% idêntico à seqüência de nucleotídeos publicada para o gene *Vip3A(a)* (Estruch et al., 1996)

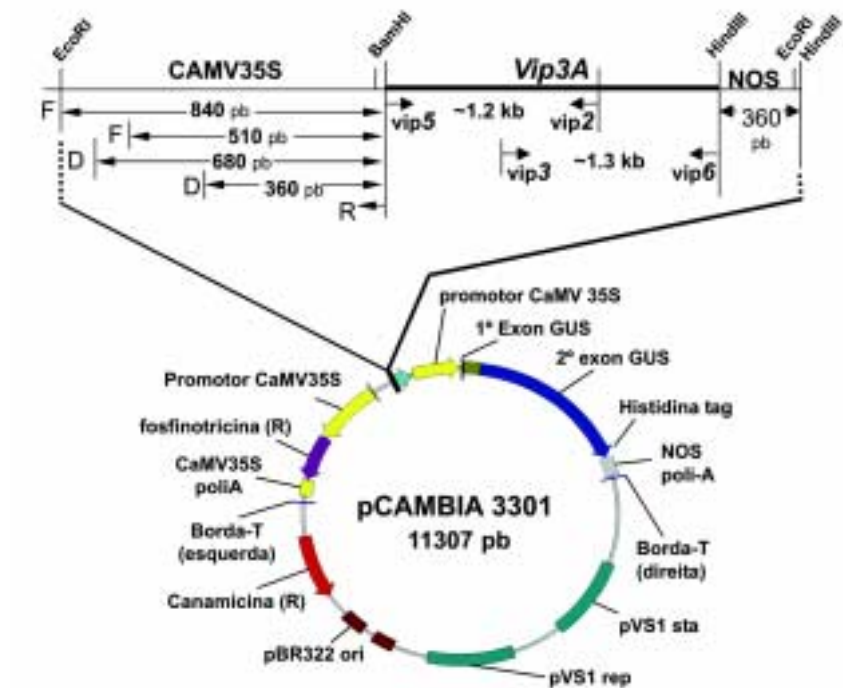


estruturalmente entre si, sendo que somente alguns dos respectivos isolados demonstraram maior atividade inseticida (Loguercio et al., 2001b). O isolamento desses genes e sua expressão em sistemas bacterianos heterólogos para produção de grandes quantidades purificáveis de toxinas VIP permitirá uma melhor avaliação do potencial de utilização dessas proteínas em estratégias de CB. Estudos posteriores identificarão a necessidade, ou não, de se resintetizar o gene para ajustá-la à frequência de tRNAs de milho para expressão em plantas.

### Estratégias de uso do milho Bt

A escolha e utilização de híbridos de milho contendo genes codificados de entomotoxinas de Bt para uso em MIP, em uma determinada área, depende de vários aspectos importantes a considerar: (I) qual o sistema de produção utilizado e o nível de produtividade e retorno econômico esperado?; (II) qual(is) a(s) principal(is) praga(s) que podem prejudicar a(s) lavoura(s)?; (III) qual o potencial de infestação da(s) mesma(s)?; (IV) quais os métodos disponíveis para o controle?; (v) com qual(is) método(s) obter-se-ia uma maior eficiência econômica?; (VI) quais os riscos de desenvolvimento de resistência pelas populações de insetos-praga?; entre outros. Sabe-se que o uso amplo e indiscriminado de um mesmo genótipo não é recomendável devido ao problema de uniformização genética; da mesma forma que para inseticidas químicos usados continuamente em áreas geográficas determinadas, populações de campo de várias pragas são capazes de desenvolver resistência à  $\delta$ -entoxinas de Bt, seja na forma de formulações comerciais tradicionais do tipo *sprays*, seja na forma de toxinas expressas pela planta. Em alguns casos, a evolução da resistência de insetos a certos grupos de toxinas Bt demonstrou ser surpreendentemente maior que o inicialmente imaginado (Tabashnik et al., 1997).

Outro importante aspecto a ser considerado é o potencial efeito adverso das toxinas Bt sobre os inimigos naturais das pragas (importante estratégia para MIP, como se viu anteriormente), mesmo levando-se em consideração a evidenciada especificidade



**Figura 6:** Construção gênica utilizada para transformação de milho com gene *Vip3A* de Bt, cepa HD125

das toxinas Bt para insetos nos níveis taxonômicos de 'ordem' e 'família'. Para o caso específico da lagarta-do-cartucho, testes de toxicidade são imprescindíveis para os seguintes inimigos naturais, com eficiência comprovada de controle sobre essa praga de milho: *Doru luteipes* (predador), *Trichogramma spp*, *Telenomus sp*, *Cheilonus insularis*, e *Campoletis flavicincta* (parasitóides)(Cruz, 1995). A necessidade de tais testes torna-se ainda mais evidente se considerarmos a controvérsia existente sobre potenciais efeitos adversos de toxinas Bt em espécies de inseto não-alvo, como a da borboleta 'monarca' (Sears et al., 2001).

Quanto à questão do desenvolvimento de resistência por parte dos insetos às toxinas Bt, já existem algumas estratégias recomendadas para conter ou retardar esse evento, as quais foram testadas em relação à broca-européia-do-milho. Uma delas sugere o uso de híbridos de milho com alta expressão das toxinas (alta dose), de modo que produza toxina suficiente para eliminar insetos parcialmente resistentes; a outra, baseia-se no uso de parte da área de lavoura com milho-Bt (bordaduras ou fileiras intercaladas) plantadas com milho não-Bt - os chamados "refúgios" -, visando a amenizar

a pressão de seleção em favor dos indivíduos resistentes às toxinas Bt. Dessa forma, os insetos sensíveis alimentar-se-iam nesses refúgios, permanecendo vivos e reprodutivos na área; tal estratégia baseia-se na diluição da frequência dos alelos de resistência, permitindo, assim, a manutenção da susceptibilidade geral da população.

Como o milho é parte integrante de rações utilizadas na indústria de criação e processamento de animais, levantam-se algumas questões de biossegurança relacionadas com o uso do milho-Bt. Segundo informações disponíveis publicamente (<http://www.monsanto.com.br/biotecnologia/publicacoes/teseguranca06.htm>), experimentos de campo e de alimentação não detectaram diferenças de comportamento e crescimento entre animais alimentados com milho-Bt e com milho convencional. Além disso, é interessante citar um benefício indireto na qualidade dos grãos de milho-Bt e, por conseguinte, na segurança de alimentos e rações, que é a redução drástica de danos causados por insetos em espigas, os quais conduzem a ocorrência de bolores produtores de 'fumosina' - uma micotoxina perigosamente tóxica a animais e humanos.

## Conclusões e Perspectivas

A cultura do milho é de vital importância para a economia nacional e mundial, e ocupa uma área agrícola significativa. Nessas condições, tende a ser uma lavoura tecnificada, cujo sistema de produção baseie-se na mecanização e na elevada utilização de insumos fertilizantes e de defensivos agrícolas. Tais circunstâncias, ao longo das últimas 5 ou 6 décadas, trouxeram sérias conseqüências e impactos ambientais e de saúde pública, das mais diversas naturezas, para as quais necessita-se urgentes atitudes e políticas recuperadoras. Considerando, contudo, que alterações infra-estruturais nos sistemas vigentes de produção agrícola são extremamente difíceis e lentas, tem-se que o emprego de tecnologias mitigadoras e minimizadoras desses impactos possuem alta relevância. Assim, o desenvolvimento de híbridos de milho comerciais (bem como o de variedades e cultivares de outras espécies agrícolas) que expressem entomotoxinas de Bt aparece como uma dessas alternativas, visto que trazem um enorme potencial de emprego no MIP dessa e de outras culturas. Como em qualquer desenvolvimento tecnológico, vários problemas potenciais e riscos de utilização existem e, como tais, devem ser abordados adequadamente, visando sempre assegurar níveis aceitáveis de segurança pública nos âmbitos alimentar e ambiental. O horizonte potencial de utilização e de benefícios do sistema de "plantas Bt" é enorme e dinâmico, e tenderá a oferecer mais e melhores alternativas de manejo agrícola sustentável quanto mais conhecimento científico e técnico a ele for agregado.

## Referências Bibliográficas:

- CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P.; CARVALHO, C.H.S.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E.; LOPES, M.A. Milho Transgênico – melhoria da qualidade nutricional do grão. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 15, p. 42-46. 2000.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pest strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology** (submetido), 2001 (b).
- MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, p.9-13. 1999.
- SARDANA, R.; DUKIANDJIEV, S.; GIBAND, M.; CHENG, X.; COWAN, K.; SAUDER, C.; ALTOSAAR, I. Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences *CryIA (b & c)* by expression in maize endosperm culture. **Plant Cell Reports**, v.15, p.677-681. 1996.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.62, p.775-806. 1998.
- SEARS, M.K.; HELLMICH, R.L.; STANLEY-HORN, D.E.; OBERHAUSER, K.S.; PLEASANTS, J.M.; MATTILA, H.R.; SIEGFRIED, B.D.; DIVELY, G.P. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.98, p.11937-11942. 2001.
- TABASHNIK, B.E.; LIU, Y-B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D.G. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v.94, p.1640-1644. 1997.
- VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, M.J.V.; FIGUEIREDO, J.E.F.; PAIVA, E. PCR identification of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* strains that are efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, p.147-153. 2000.
- YU, C-G.; MULLINS, M.A.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.532-536. 1997.
- ticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.62, p.807-813. 1998.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS, 1995 (EMBRAPA/CNPMS, **Circular Técnica**, 21).
- CRUZ, I.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J.M. Manejo das pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos. Sete Lagoas, EMBRAPA/CNPMS, 1999 (EMBRAPA/CNPMS, **Circular Técnica**, 31).
- ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; DUCK, N.B.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, v.15, p.137-141. 1997.
- ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.93, p.5389-5394. 1996.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, D.; MADDOX, D.; MCPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v.11, p.194-200. 1993.
- LOGUERCIO, L.L.; SANTOS, C.G.; BARRETO, M.R.; GUIMARAES, C.T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, p.362-367. 2001 (a).
- LOGUERCIO, L.L.; BARRETO, M.R.; ROCHA, T.L.; SANTOS, C.G.; TEIXEIRA, F.F.; PAIVA, E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis*